

Aus dem Friedrich-Loeffler-Institut
eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Peptid-Mikroarray-basierte serologische Diagnose und Typisierung
von *Toxoplasma gondii*-Infektionen bei Menschen und Katzen in
Deutschland**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Pavlo Maksimov
aus Korobotschkine, Ukraine

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3631

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Franz Josef Conraths
Zweiter Gutachter: PD Dr. Jürgen Krücken
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Toxoplasma gondii, immunodiagnosis, classification, peptides, cats,
man, Germany

Tag der Promotion: 05.06.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-329-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Моїй сім'ї

Diese Arbeit wurde aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Verbundprojekte Toxonet 01 und Toxonet 02 (Teilprojekt 6, Förderkennziffer 01KI0765 und 01KI1002F zu G. Schares) gefördert.

Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits vorab als Vortrag auf wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt:

1. P. Maksimov, J. Zerweck, A. Maksimov, A. Hruzik, U. Groß, K. Spekker, W. Däubener, S. Werdermann, O. Niederstrasser, E. Petri, M. Mertens, R. G. Ulrich, F. J. Conraths, G. Schares

Peptide microarray-based serologic strain-typing of *Toxoplasma gondii* in infected humans from Germany

In: Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, National Research Platform for Zoonoses (Hrsg.):

National Symposium on Zoonoses Research 2010: Programme and Abstracts, Berlin, 07.-08.10.2010; Berlin: TMF, 2010. Seite 122-123. Poster
2. P. Maksimov, J. Zerweck, A. Maksimov, A. Hruzik, U. Groß, K. Spekker, W. Däubener, S. Werdermann, O. Niederstrasser, E. Petri, M. Mertens, R. G. Ulrich, F. J. Conraths, G. Schares

Peptide-microarray analysis of *in-silico* predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* in infected humans.

Session Methods and diagnostics. Symposium-Nationale Forschungsplattform für Zoonosen 10/2011

In: Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, National Research Platform for Zoonoses (Hrsg.):

National Symposium on Zoonoses Research 2011: Programme and Abstracts, Berlin, 07.-08.10.2011; Berlin: TMF, 2011. Seite 38-39. Vortrag.

3. P. Maksimov, J. Zerweck, J.P. Dubey, N. Pantchev, C.F. Frey, A. Maksimov, M. Hosseininejad, F.J. Conraths, G. Schares

Serologische Typisierung von *Toxoplasma gondii*-Infektionen bei Hauskatzen (*Felis silvestris catus*) aus Deutschland.

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe
Parasitologie und parasitäre Krankheiten, Hannover, 02.-04.07.2012. Seite 59.
Vortrag.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	7
2	Einführung.....	13
3	Literaturübersicht.....	15
3.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	15
3.2	Geschichtliche Aspekte.....	15
3.3	Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	16
3.3.1	Gewebezysten-induzierter Lebenszyklus in der Katze.....	17
3.3.2	Oozysten-induzierter Lebenszyklus in der Katze.....	17
3.3.3	Tachyzoiten-induzierter Lebenszyklus in der Katze.....	18
3.3.4	Entwicklungsabschnitte im Zwischenwirt.....	18
3.4	Morphologie von <i>T. gondii</i>	20
3.4.1	Tachyzoiten.....	20
3.4.2	Bradyzoiten und Gewebezysten.....	21
3.4.3	Oozysten.....	21
3.5	Populationsstruktur von <i>T. gondii</i>	23
3.6	Virulenz von <i>T. gondii</i>	25
3.7	Bedeutung des Parasitengenotyps für die Krankheitsbilder bei Menschen.....	27
3.8	<i>T. gondii</i> -Infektion in Katzen.....	30
3.9	Immunabwehr bei <i>T. gondii</i> -Infektionen.....	31
3.10	<i>T. gondii</i> -Antigene.....	33
3.11	Typisierung von <i>T. gondii</i>	35
3.11.1	Isoenzym-Analyse.....	35

3.11.2	Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs)	35
3.11.3	Mikrosatelliten.....	36
3.11.4	RAPD-PCR.....	37
3.11.5	Serotypisierung.....	38
3.12	Verfahren für die serologische Diagnose von <i>T. gondii</i> -Infektionen	39
3.13	Peptid-Mikroarray.....	41
3.14	Bioinformatische Vorhersage immunreaktiver B-Zell-Epitope	43
4	Publikationen.....	45
4.1	Publikation 1	45
4.1.1	Zusammenfassung der Publikation 1 (Übersetzung des Abstrakts der Originalpublikation).....	45
4.2	Publikation 2.....	47
4.2.1	Zusammenfassung der Publikation 2 (Übersetzung des Abstrakts der Originalpublikation).....	47
4.3	Zur Veröffentlichung vorgesehenes Manuskript	49
4.3.1	Zusammenfassung des Manuskriptes (Übersetzung des Abstrakts des Originalmanuskriptes).....	49
5	Übergreifende Diskussion	51
5.1	Serotypisierung von <i>T. gondii</i> -Infektionen bei Menschen und Katzen in Deutschland	53
5.2	Diagnose der <i>T. gondii</i> -Infektion beim Menschen mit Hilfe von bioinformatisch-vorhergesagten Epitopen unter Verwendung eines Peptid-Mikroarrays	59
6	Zusammenfassung.....	63
7	Summary	65
8	Ausführliche Darstellung der Publikationen.....	67
8.1	Publikation 1	67

8.2	Publikation 2.....	79
8.3	Zur Veröffentlichung vorgesehenes Manuskript	91
8.3.1	Abstract.....	92
8.3.2	Introduction	93
8.3.3	Materials and methods.....	96
8.3.4	Results	103
8.3.5	Discussion	116
8.3.6	Acknowledgments.....	119
8.3.7	References.....	120
8.3.8	Table 1. Positive and negative TgSAG1 immunoblot reactions versus reciprocal <i>Toxoplasma gondii</i> IFAT titers in feline field and reference sera (n=166).....	127
8.3.9	Table 2. Means of cut-off normalized mean reaction values in peptide and cat groups analyzed by ANOVA/LSD Post-Hoc-Test	128
9	Literaturverzeichnis	129
10	Publikationsliste	151
11	Danksagung.....	153
12	Eigenständigkeitserklärung:.....	155

Die vorliegende Dissertation wurde nach § 8 Abs. 2 der Promotionsordnung der Tierärztlichen Fakultät der Freien Universität Berlin vom 28.06.2007 als kumulative Dissertation gestaltet. Die im Abschnitt 8.1 und 8.2 dargestellten Ergebnisse wurden in den englischsprachigen peer-reviewed Zeitschriften (PLOS-ONE und Clinical and Vaccine Immunology) publiziert. Kapitel 8.3 dieser Arbeit wird derzeit von den Koautoren begutachtet und wird bei dem Journal PLOS-ONE eingereicht.

Veröffentlichte Publikation 1:

Titel: Analysis of Clonal Type-Specific Antibody Reactions in *Toxoplasma gondii* Seropositive Humans from Germany by Peptide-Microarray

Autoren: Pavlo Maksimov, Johannes Zerweck, Aline Maksimov, Andrea Hotop, Uwe Groß, Katrin Spekker, Walter Däubener, Sandra Werdermann, Olaf Niederstrasser, Eckhardt Petri, Marc Mertens, Rainer G. Ulrich, Franz J. Conraths, Gereon Schares

Zeitschrift: PLOS ONE 7(3): e34212.

DOI: 10.1371/journal.pone.0034212.

Eigener Anteil an der Veröffentlichung:

Selbstständige Versuchsplanung, Entwicklung, Durchführung und Auswertung aller dargestellten Daten und Ergebnisse, Erstellen des Manuskripts.

Veröffentlichte Publikation 2:

Titel: Peptide Microarray Analysis of *In Silico*-Predicted Epitopes for Serological Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans

Autoren: Pavlo Maksimov, Johannes Zerweck, Aline Maksimov, Andrea Hotop, Uwe Groß, Uwe Pleyer, Katrin Spekker, Walter Däubener, Sandra Werdermann, Olaf Niederstrasser, Eckhardt Petri, Marc Mertens, Rainer G. Ulrich, Franz J. Conraths, Gereon Schares

Zeitschrift: Clinical and Vaccine Immunology

DOI: 10.1128/CVI.00119-12.

Eigener Anteil an der Veröffentlichung:

Selbstständige Versuchsplanung, Entwicklung, Durchführung und Auswertung aller dargestellten Daten und Ergebnisse, Erstellen des Manuskripts.

Publikation im Veröffentlichungsprozess 3:

Titel: Serotyping of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis silvestris catus*) reveals predominance of type II infections in Germany

Autoren: Pavlo Maksimov, Johannes Zerweck, Jitender P. Dubey, Nikola Pantchev, Caroline F. Frey, Aline Maksimov, Ulf Reimer, Mike Schutkowski, Morteza Hosseininejad, Mario Ziller, Franz J. Conraths, Gereon Schares

Wird eingereicht bei dem Journal: PLOS-ONE

Eigener Anteil an dem Manuskript:

Selbstständige Versuchsplanung, Entwicklung, Durchführung und Auswertung aller dargestellten Daten und Ergebnisse, Erstellen des Manuskripts.

2 Einführung

Toxoplasmose ist eine weltweit sehr häufig auftretende parasitäre Zoonose. *Toxoplasma (T.) gondii* ist in der Lage, nahezu alle homoiothermen Lebewesen (Säugetiere und Vögel) zu infizieren (Dubey 2010). Dieses Protozoon weist eine klonale Populationsstruktur auf, die in Nordamerika und Europa aus drei dominierenden klonalen Linien (I, II und III) besteht. Rekombinante und solche Genotypen von *T. gondii*, die nicht den drei klonalen Linien zugeordnet werden können („atypische“ Isolate), kommen in Südamerika sehr häufig vor. In Europa und Nordamerika werden diese nur selten beobachtet (Su, Khan et al. 2012, Walzer und Boyle 2012).

Es wird diskutiert, ob der Krankheitsverlauf einer Toxoplasmose durch die *T. gondii*-Linie beeinflusst wird, mit der ein Mensch oder Tier infiziert ist (Gilbert, Freeman et al. 2008, McLeod, Boyer et al. 2012). Im Allgemeinen verläuft die Toxoplasmose bei immunkompetenten Menschen und Tieren meist klinisch unauffällig. Typ I-, rekombinante und viele atypische *T. gondii*-Stämme rufen bei Mäusen und eventuell auch bei Menschen eine deutlich schwerwiegendere klinische Symptomatik hervor, als *T. gondii* der klonalen Typen II oder III (Gilbert, Freeman et al. 2008, Dubey 2010). Die Mehrzahl der in Europa beim Menschen isolierten *T. gondii* sind dem klonalen Typ II zuzuordnen (Ajzenberg, Banuls et al. 2002, Ajzenberg, Banuls et al. 2004, Demar, Ajzenberg et al. 2007).

Es ist epidemiologisch und eventuell auch klinisch relevant, bei einer Infektion den *T. gondii*-Genotyp zu identifizieren. Der Genotyp könnte einen möglichen Risikofaktor bei klinischen Toxoplasmosen darstellen und die Ergebnisse der Typisierung könnten dabei helfen, die richtigen Wege bei der Behandlung von klinischen Toxoplasmosen einzuschlagen.

Um *T. gondii* einer klonalen Linie zuzuordnen zu können, gibt es neben der Bestimmung des Genotyps mit Nukleinsäuren-basierten Methoden auch die Möglichkeit, eine Serotypisierung durchzuführen (Kong, Grigg et al. 2003, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Sousa, Canada et al. 2010). Zur Bestimmung des *T. gondii*-Serotyps, mit dem ein Tier oder ein Mensch infiziert ist, können *T. gondii*-Typ-spezifische polymorphe Peptide eingesetzt werden. Für die Untersuchung von Humanseren ist dieses Verfahren bereits in Form von ELISA-Tests verwendet worden (Kong, Grigg et al. 2003, Morisset, Peyron et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2009). Die serologische Ermittlung des klonalen Typs, mit dem ein Tier oder Mensch infiziert ist, basiert auf dem

Nachweis von Antikörperreaktionen gegen Epitope, die polymorph und für die klonalen Typen I, II oder III spezifisch sind (Kong, Grigg et al. 2003).

In Deutschland gab es bislang keinerlei Informationen über die Verbreitung bestimmter *T. gondii*-Geno- bzw. Serotypen bei Menschen und es standen nur im begrenzten Umfang Daten über die Prävalenz unterschiedlicher *T. gondii*-Genotypen bei Katzen zur Verfügung (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010).

Die vorliegende Arbeit diente dazu, Serotypisierungstests auf einer Peptid-Mikroarray-Plattform zu entwickeln und diese für eine serologische Typisierung von *T. gondii*-Infektionen bei serologisch positiven Menschen und Katzen in Deutschland einzusetzen. Zusätzlich wurde geprüft, ob bioinformatisch vorhergesagte Epitope in einem Peptid-Mikroarray zur serologischen Diagnose einer *T. gondii*-Infektion bei Menschen eingesetzt werden können.

Epitop-tragende Peptide wurden auf Mikroarray-Slides aufgetragen und die Arrays anschließend in einem ELISA-ähnlichen System eingesetzt, um in den Seren natürlich infizierter Menschen sowie in Seren experimentell- oder natürlich-infizierter Katzen Antikörper gegen diese Epitope nachzuweisen (Nahtman et al., 2007).

Peptid-Mikroarrays ermöglichen es, im Mikrotiterformat, d.h. mit wenigen Mikrolitern Serum, mehrere Tausend Peptide gleichzeitig auf ihre Eignung zur Diagnose oder Typisierung zu untersuchen.

Für die serologische Typisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen wurden insgesamt 54 polymorphe genotypspezifische Peptide, die bereits mit Humanseren geprüft worden waren (Kong, Grigg et al. 2003), im neuen Mikroarray-Format eingesetzt. Für die Serotypisierung der *T. gondii*-Infektionen bei Katzen, wurden 54 bereits publizierte polymorphe Peptide (Kong, Grigg et al. 2003) sowie weitere 47 polymorphe genotypspezifische Peptide, die mit Hilfe einer sogenannten „propensity scale“-Methode identifiziert worden waren, in einem neuen Peptid-Mikroarray-Test eingesetzt.

Für die serologische Diagnose wurden insgesamt 20 potentielle Epitope mit Hilfe eines bioinformatischen Programmes namens ABCpred für die Analyse ausgewählt und die entsprechenden Peptide synthetisiert. Außerdem wurden 18 veröffentlichte Peptide auf ihre Reaktivität mit *T. gondii*-positiven Humanseren untersucht.

Die Antikörperantwort gegen diese Peptide wurde bei Menschen und Katzen erfasst und die Prävalenz der *T. gondii*-Typ-spezifischen Antikörper-Reaktionen geschätzt.

3 Literaturübersicht

3.1 *Toxoplasma gondii*

T. gondii ist ein obligat intrazelluläres Protozoon, das in der Lage ist, alle warmblütigen Vertebraten (Säugetiere einschließlich Mensch und Vögel) zu infizieren. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu einem Drittel der Menschheit chronisch mit *T. gondii* infiziert ist (Tenter, Heckeroth et al. 2000, Dubey 2010). Eine pränatale Infektion mit *T. gondii* kann durch eine diaplazentare Übertragung erfolgen. Eine postnatale Infektion mit dem Parasiten findet in der Regel durch den Verzehr von ungenügend gegartem, zystenhaltigem Fleisch oder durch die orale Aufnahme sporulierter Oozysten statt (Montoya und Liesenfeld 2004). Eine Infektion durch die orale Aufnahme von Tachyzoiten scheint möglich zu sein, z.B. wird vermutet, dass Tachyzoiten in Ziegenmilch zu familiär gehäuft auftretenden Infektionen geführt haben (Sacks, Roberto et al. 1982).

3.2 Geschichtliche Aspekte

Oozysten von *T. gondii*, früher als *Coccidium bigeminum* oder als kleine Form von *Isospora bigemina* bezeichnet, wurden schon von Stiles (1891) und Wenyon (1923) im Katzenkot beschrieben (Stiles 1891, Wenyon 1926).

Die erste genauere Beschreibung des Protozoons erfolgte im Jahre 1908 durch Nicolle und Manceaux, die den Parasiten aus einem nordafrikanischen Nagetier, dem Gundi (*Ctenodactylus gondi*), isolierten und ihn damals als *Leishmania gondii* bezeichneten (Nicolle und Manceaux 1908). In den 1930er Jahren wurde der Parasit dann erstmalig beim Menschen durch Wolf (1939) nachgewiesen (Wolf, Cowen et al. 1939) und im Jahr 1937 berichteten Sabin und Olitsky von der erfolgreichen Isolierung des Erregers der Toxoplasmose beim Tier (Sabin und Olitsky 1937). Im Jahr 1970 erkannte man, dass die Katze als Endwirt und Oozystenausscheider eine Schlüsselfunktion im Lebenszyklus von *T. gondii* hat (Dubey, Miller et al. 1970) und fünf Jahre später war der Lebenszyklus des Erregers nahezu vollständig geklärt (Dubey 2009). Die taxonomische Einordnung von *T. gondii* ist in Tabelle 1 dargestellt (Eckert, Friedhoff et al. 2008).

Tabelle 1 Taxonomische Einordnung von *T. gondii*.

Stamm	Alveolata
Unterstamm	Apicomplexa (Syn. Sporozoa)
Klasse	Coccidea
Ordnung	Eimeriida
Familie	Sarcocystidae
Gattung	Toxoplasma

3.3 Lebenszyklus von *T. gondii*

Im Lebenszyklus von *T. gondii* spielen drei Parasitenstadien eine entscheidende Rolle: i. Tachyzoiten (als Gruppen von Parasiten in so genannten Pseudozysten oder parasitophoren Vakuolen), ii. Bradyzoiten (in Gewebezysten) und iii. Sporozoiten (in Oozysten).

Nur Feliden sind Endwirte von *T. gondii* (Dubey, Miller et al. 1970). Im Darm der Endwirte beginnt der sexuelle Entwicklungsabschnitt von *T. gondii*. Dieser führt dazu, dass diploide unsporulierte Oozysten über den Kot ausgeschieden werden. In der Umwelt finden in den Oozysten Reifeteilungen statt, die zur Entstehung von haploiden und für Zwischenwirte infektiösen Sporozoiten führen (Dubey, Miller et al. 1970, Dubey, Miller et al. 1970, Frenkel, Dubey et al. 1970). Unter optimalen Bedingungen (optimale Feuchtigkeit, Temperatur) dauert diese Sporulation 1-5 Tage. Eine sporulierte Oozyste enthält 2 Sporozysten, in der sich jeweils 4 Sporozoiten befinden (Dubey, Miller et al. 1970).

Zwischenwirte können sich durch die orale Aufnahme von sporulierten Oozysten, Gewebezysten und in seltenen Fällen auch Tachyzoiten infizieren (Sacks, Roberto et al. 1982, Dubey 2001, Dubey 2005). Tachyzoiten können diaplazentar auf die Nachkommen infizierter Zwischenwirte übergehen (Beverley 1959, Dubey, Shen et al. 1997). Bei Organtransplantationen oder Infusionen kann eine *T. gondii*-Infektion des Spenders an den Empfänger übertragen werden (Brinkman, Debast et al. 1998, Hommann, Schotte et al. 2002). Auch Feliden können *T. gondii* als Zwischenwirte dienen, indem sie unterschiedliche Parasitenstadien von *T. gondii* aufnehmen, die sich asexuell als Tachyzoiten/Bradyzoiten-

Stadien in extraintestinalen Organen vermehren bzw. persistieren (Dubey 1996, Dubey 1998).

Nach der Infektion findet zunächst eine Tachyzoiten-Vermehrung statt. Nach Einsetzen der Immunantwort des Wirtes bilden sich Gewebezysten mit darin enthaltenen Bradyzoiten aus. Gewebezysten sind entscheidend für die effiziente Infektion von Zwischen- und Endwirten, da Bradyzoiten/Gewebezysten eine Magenpassage überleben können (Dubey 1998).

Alle drei der oben genannten Stadien (Bradyzoiten, Tachyzoiten, Oozysten) können die sexuelle Entwicklung von *T. gondii* im Darm der Katze induzieren. Eine neue Infektion einer Katze, die bereits *T. gondii*-Oozysten ausgeschieden hatte, kann zur erneuten Oozysten-Ausscheidung führen (Dubey 2005). Offenbar kommt es bei Katzen nach Oozystenausscheidung nicht zu einer dauerhaften Darmimmunität, die die erneute Ausscheidung verhindert (Davis und Dubey 1995, Dubey, Lappin et al. 1995).

Je nachdem, welches Parasitenstadium von der Katze aufgenommen wurde, unterscheidet man unterschiedliche, von den Infektionsstadien abhängende Varianten des Lebenszyklus (Dubey 1998).

3.3.1 Gewebezysten-induzierter Lebenszyklus in der Katze

Nimmt eine Katze zystenhaltiges Körpergewebe (Bradyzoiten) infizierter Zwischenwirte auf, so kommt es zur asexuellen Vermehrung unterschiedlicher, im Detail noch weitgehend unbekannter Schizontenstadien in den Epithelzellen der Dünndarmzottenspitzen. Die intrazelluläre Vermehrung verläuft in Form einer Endopolygenie. Innerhalb von 3-4 Tagen entwickeln sich Makro- und Mikrogamonten, sowie Tachyzoiten. Aus den Makrogamonten differenzieren sich die unbeweglichen Makrogameten und aus den Mikrogamonten begeißelte und bewegliche Mikrogameten. Die Mikrogameten befruchten die Makrogameten, wobei unsporulierte Oozysten entstehen, die mit dem Kot in die Umwelt ausgeschieden werden (Dubey 1998, Dubey 2005). Die Präpatenz (Zeitspanne von der Infektion bis zur Ausscheidung) beträgt ca. 3-7 Tage ab der Gewebezysten- bzw. Bradyzoitenaufnahme. Die Patenz (Dauer der Ausscheidung) dauert ungefähr 1 bis 21 Tage (Dubey 1998, Dubey 2005).

3.3.2 Oozysten-induzierter Lebenszyklus in der Katze

In Abhängigkeit von der Infektionsdosis beträgt die Präpatenz nach der Aufnahme von sporulierten Oozysten durch Katzen 18 bis 41 Tage (Dubey 1996, Dubey 2005). Dabei führt

eine Oozystenaufnahme durch Katzen nicht zwangsläufig auch zu einer Oozysten-ausscheidung bei diesen Tieren. Enteroepitheliale Stadien, welche für die Ausbildung von Gameten verantwortlich sind, wurden nach einer Oozysteninfektion bis 18 Tage nach der Infektion im Katzendarm nicht gefunden (Dubey 2005, Dubey 2010). Es wird vermutet, dass sich die aus den Oozysten freigesetzten Sporozoiten nach der Verdauung im Magen-Darm-Trakt der Katze erst in Tachyzoiten und später in enzystierte Bradyzoiten umwandeln. Kommt es zur Freisetzung der Bradyzoiten aus Zysten, können diese in das Darmepithel zurückkehren und die Ausbildung sexueller Stadien initiieren (Dubey 2005).

3.3.3 Tachyzoiten-induzierter Lebenszyklus in der Katze

Nach der Aufnahme von Tachyzoiten kommt es in der Regel nach mindestens 18 Tagen zur Oozystenausscheidung (Dubey 2005). Eine kürzere Präpatenzperiode deutet darauf hin, dass diese Katzen neben Tachyzoiten auch Bradyzoiten aufgenommen haben (Dubey und Frenkel 1976, Dubey 2005).

Es ist anzunehmen, dass nach einer oralen Aufnahme von *T. gondii*-Tachyzoiten diese die pharyngial-bukkale Schleimhaut durchdringen und somit eine Magenpassage umgehen können (Dubey 2005). Tachyzoiten können eine Pepsinverdauung und daher vermutlich auch eine Magenpassage überleben. Es ist deshalb davon auszugehen, dass eine Infektion über den Verdauungstrakt stattfinden kann (Dubey, Lindsay et al. 1998, Dubey 2005).

3.3.4 Entwicklungsabschnitte im Zwischenwirt

Die Entwicklungsabschnitte, die nach einer Oozysten-induzierten Infektion in Zwischenwirten ablaufen, wurden hauptsächlich im Mausmodell erforscht (Speer, Clark et al. 1998). Wenn ein Zwischenwirt sporulierte *T. gondii*-Oozysten aufnimmt, so werden Sporozoiten im Verdauungstrakt freigesetzt (Dubey 2010). Es gibt leider keine genauen Angaben, welche Fermente im Verdauungstrakt eines Zwischenwirtes für die Freisetzung der Sporozoiten verantwortlich sind (Fritz, Buchholz et al. 2012). Experimentell wurde gezeigt, dass die äußerste Schicht der sporulierten Oozysten mit Hilfe von 1,3%iger Natriumhypochlorid-Lösung (Bleichlauge) zerstört werden kann. Durch die Einwirkung von CO₂ und diversen Enzymen können Gallensalze und Trypsin in die Sporozysten eindringen und die Exzystierung der Sporozoiten aus den Sporozysten stimulieren (Dubey 2010). Diese penetrieren in die Enterozyten des Darms und befallen Zellen der *Lamina propria*. Sporozoiten konnten spätestens zwei Stunden nach der oralen Infektion in parasitophoren Vakuolen in Enterozyten nachgewiesen werden (Dubey, Lindsay et al. 1998). Ebenso

konnten Sporozoiten im peripheren Blutkreislauf vier Stunden nach der Infektion detektiert werden. Jedoch scheinen die meisten Sporozoiten in der *Lamina propria* zu verbleiben. Sie vermehren sich in unterschiedlichen Zellen, insbesondere in Zellen des vaskulären Endotheliums, in Fibroblasten, in mononukleären Zellen und in segment-kernigen Leukozyten, jedoch nicht in Erythrozyten (Dubey, Lindsay et al. 1998). Etwa zwölf Stunden nach der Infektion teilen sich die Sporozoiten in zwei Tachyzoiten. Die Tachyzoiten können lymphogen- und/oder hämatogen in die extraintestinalen Organe wandern, wo in den befallenen Zellen eine Vermehrung durch Endodyogenie stattfindet.

Die sich im Infektionsverlauf ausbildende Immunantwort gegen *T. gondii*-Tachyzoiten begünstigt die Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten und fördert die Ausbildung von Gewebezysten. Eine Gewebezystenbildung kann *in-vitro* auch durch unterschiedliche chemische oder physikalische Stressfaktoren induziert werden (Dubey, Lindsay et al. 1998). Bradyzoiten sind wahrscheinlich in fast allen infizierten Individuen vorhanden, sogar während der akuten Infektion, da diese in experimentell-infizierten Mäusen schon 3 Tage nach der Inokulation nachgewiesen wurden (Dubey 2010).

Der Bradyzoiten-induzierte Zyklus in einem Zwischenwirt ist dem Oozysten-induzierten Zyklus ähnlich, jedoch sind Bradyzoiten für Mäuse weniger infektiös als Sporozoiten. Bereits eine Stunde nach der oralen Inokulation der Mäuse wurden Bradyzoiten in den Enterozyten und in der *Lamina propria* des Darmes nachgewiesen. Zwei Tage nach der Bradyzoiteninfektion geht der Parasit in das Tachyzoitenstadium über. Gewebezysten, die in den Organen lebenslänglich persistieren können, wurden erstmals sechs Tage nach der Infektion nachgewiesen (Dubey 2010).

Gewebezysten sind intrazellulär. Sie entwickeln sich aus der parasitophoren Vakuole und befindet sich im Zytoplasma der Wirtszelle (Dubey 2010). Die Wand der Gewebezyste besteht zum größten Teil aus Glykoproteinen (Zhang, Halonen et al. 2001, Kamerkar und Davis 2012) und wird durch eine Außenmembran abgegrenzt, die vermutlich aus Bestandteilen der Wirtszelle sowie des Parasiten besteht (Dubey 2010). Es wird vermutet, dass die Zystenwand die „Kommunikation“ mit der Wirtszelle vermindert, demzufolge die Antigenpräsentation zum Wirtsimmunsystem limitiert und somit für die lebenslange Persistenz von *T. gondii* in Wirtsgewebe sorgt (Zhang, Halonen et al. 2001, Kamerkar und Davis 2012).

3.4 Morphologie von *T. gondii*

3.4.1 Tachyzoiten

Der Begriff „Tachyzoit“ (*griech.* tachys = schnell) wurde von Frenkel (1973) vorgeschlagen, um das Stadium, indem sich die Parasiten rasch in fast allen kernhaltigen Zellen des Zwischen- und Endwirtes vermehren, zu beschreiben. Tachyzoiten wurden zuvor auch als Endodyozoiten oder Endozoiten bezeichnet. Ansammlungen von mehreren Tachyzoiten werden Klone, terminale Kolonien oder Gruppen genannt.

Tachyzoiten sind halbmondförmig, ungefähr 2 x 6 µm groß und sind durch ein vorderes, spitz zulaufendes (conoidales) Ende und ein hinteres, ovoides Ende charakterisiert. Ultrastrukturell bestehen Tachyzoiten aus verschiedenen Organellen (Dubey, Lindsay et al. 1998):

T. gondii-Tachyzoiten besitzen mehrere sekretorische Organellen (Ngo, Hoppe et al. 2000), die für die obligat intrazelluläre Lebensweise der Stadien von Bedeutung sind. Zwischen dem conoidalen Ende und dem Golgi-Apparat befinden sich acht bis zehn flaschenförmige sekretorische Organellen, die als Rhoptrien (der Name spielt auf die keulenförmige Gestalt an, die dem griechischen Buchstaben *rho* ähnlich ist) bezeichnet werden. Jede Rhoptrie besteht aus einem vorderen (schmalen, bis zu 2,5 µm langen) und einem hinteren („Sack“-ähnlichen, bis zu 1 µm langen) Teil (Carruthers 1999).

Zusätzlich befinden sich am anterioren Ende des Parasiten die sekretorisch aktiven Mikronemen, die aus kleinen mikrovesikulären Röhren bestehen. Eine weitere Gruppe sekretorischer Organellen stellen elektronendichte Granula („dense granules“, Dichte Granula, GRA-Organellen) dar, welche über den gesamten Tachyzoiten verteilt sind (Carruthers 1999).

Alle Organellen sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Invasion des Parasiten in eine Wirtszelle an der Protein-Sekretion beteiligt.

Zudem besitzen Tachyzoiten auch Mitochondrien, Mikroporen, subpelliculäre Mikrotubuli, ein endoplasmatisches Retikulum, einen Golgiapparat, Ribosomen, einen Nukleus, amylopektinhaltige Granula und eine membrangebundene, plastidähnliche Organelle, die auch als Apicoplast bezeichnet wird (Dubey, Lindsay et al. 1998, Speer, Clark et al. 1998). Der Zellkern befindet sich im Zentrum des Tachyzoiten und enthält Chromatin und einen Nukleolus.

Die Pellicula, eine aus Plasmalemma und zwei eng aneinander liegenden Membrankomplexen bestehende Hülle, umgibt den gesamten Parasiten. Dabei enden die inneren

Membranen am vorderen bzw. hinteren Ende in sogenannten Polringen. Ausgehend von diesen beiden Polringen verlaufen Mikrotubuli subpellicular vom apikalen bis zum posterioren Ende um den gesamten Parasiten. Sie sind vermutlich für die Motilität essentiell (Dubey, Lindsay et al. 1998, Morrissette und Sibley 2002). Die Polringe umschließen eine zylindrisch geformte Struktur, das Conoid. Dieses besteht aus 6 bis 8 mikrotubulären Elementen, die sich spiralförmig aufwickeln. Es wird vermutet, dass das Conoid an der Penetration in die Wirtszelle während der Invasion beteiligt ist (Morrissette und Sibley 2002).

3.4.2 Bradyzoiten und Gewebezysten

Die Bezeichnung "Bradyzoit" (*griech.* bradys = langsam) beschreibt das Parasitenstadium innerhalb der Gewebezysten des Wirtes. Bradyzoiten werden auch Zystozoiten genannt (Dubey, Lindsay et al. 1998).

Die Gewebezysten mit den darin enthaltenen Bradyzoiten sind Dauerformen im Lebenszyklus des Parasiten und erreichen in Abhängigkeit von der Gewebeart einen Durchmesser von 10 bis 300 µm. Im Gegensatz zu den Tachyzoiten weisen Bradyzoiten mehrere Amylopektin-Granula auf, die womöglich bei der Energieversorgung der Bradyzoiten eine Rolle spielen (Weiss und Kim 2000). *T. gondii*-Gewebezysten sind von einer argyrophilen Wand umgeben, die schwach PAS- („Periodic acid-Schiff reaction“) positiv ist.

Als stadienspezifische Merkmale haben die Bradyzoiten PAS-positive Granula und einen terminal versetzten Nukleus (Dubey, Lindsay et al. 1998). Im Unterschied zu den Tachyzoiten besitzen Bradyzoiten eine deutlich höhere Resistenz gegen das Verdauungsenzym Pepsin (Dubey 1998). Dies zeigt, dass Gewebezysten eine wichtige Rolle im Lebenszyklus von *T. gondii* spielen, da sich karnivore Tierarten überwiegend durch die Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch infizieren. Es wurde gezeigt, dass Gewebezysten in experimentell-infizierten Mäusen schon drei Tage nach der Tachyzoiten-Inokulation nachweisbar sind (Dubey 1998, Dubey, Lindsay et al. 1998).

3.4.3 Oozysten

Unsporulierte Oozysten haben eine subsphärische bis sphärische Form und einen Durchmesser von 10 x 12 µm. Lichtmikroskopisch erscheint die Oozystenwand als farblose Doppelschicht. Polare Granula sind nicht nachweisbar und der Sporont füllt bei unsporulierten Oozysten fast die gesamte Oozyste aus. Die Sporulation findet außerhalb der

Katze innerhalb von fünf Tagen nach der Ausscheidung abhängig von Sauerstoffzufuhr, Temperatur und Feuchtigkeit statt (Dubey, Lindsay et al. 1998).

Sporulierte Oozysten zeigen eine subsphärische bis ellipsoide Form und sind 11 x 13 µm im Durchmesser. Jede sporulierte Oozyste enthält zwei ellipsoide Sporozysten ohne Stieda-Körperchen. Sporozysten sind im Durchschnitt 6 x 8 µm groß. Jede Sporozyste enthält vier Sporozoiten (Dubey, Lindsay et al. 1998).

Ultrastrukturell sind Sporozoiten den Tachyzoiten ähnlich, jedoch enthalten sie mehr Mikronemen, Rhoptrien und Amylopektin-Granula (Dubey, Lindsay et al. 1998, Speer, Clark et al. 1998).

Obwohl die Sporozoiten, Tachyzoiten und Bradyzoiten ultrastrukturell ähnlich sind, weisen sie Unterschiede in ihren Organellen auf. Tachyzoiten besitzen z. B. nur wenige Mikronemen, während die Sporozoiten einige und Bradyzoiten die höchste Anzahl an Mikronemen enthalten. Dichte Granula sind häufiger in Sporozoiten und Tachyzoiten als in Bradyzoiten zu finden. Amylopektin-Granula sind in Sporozoiten und Bradyzoiten relativ groß und kommen zahlreich vor, während diese in Tachyzoiten deutlich kleiner und nur in geringer Anzahl vorhanden sind (Dubey, Lindsay et al. 1998, Speer, Clark et al. 1998).

3.4.3.1 Ausscheidung und Tenazität von Oozysten in der Umwelt

Katzen können innerhalb von wenigen Tagen Millionen von Oozysten ausscheiden (Dubey 2001). Sporulierte Oozysten überleben unter günstigen Bedingungen für mindestens 4,5 Jahre in der Umwelt (Dubey 1998). Oozysten können auch auf der Oberfläche von Obst, Gemüse oder Kräutern relativ lange (abhängig von den Umweltbedingungen (Dubey 1998)) infektiös bleiben und somit für eine „Schmierinfektion“ verantwortlich sein (Tenter, Heckerth et al. 2000, Kniel, Lindsay et al. 2002, Lass, Pietkiewicz et al. 2012). Schares und Kollegen haben gezeigt, dass *T. gondii*-Oozysten, die möglicherweise durch Koprophagie in den Magendarmtrakt von Hunden gelangt sind, wieder mit dem Kot ausgeschieden werden und dass Hunde als passive Überträger von *T. gondii*-Oozysten dienen können (Scharas, Pantchev et al. 2005). Obwohl die Prävalenz der Katzen, die Oozysten ausscheiden, relativ gering ist (Scharas, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010), sorgt die starke Umweltresistenz und eine große Anzahl ausgeschiedener Oozysten für ein hohes Infektionsrisiko in der Umwelt (Dubey 2010).

3.5 Populationsstruktur von *T. gondii*

Trotz der Existenz der sexuellen Phase im Lebenszyklus von *T. gondii* hat die Population dieses Protozoons in Europa und Nordamerika eine stark ausgeprägte klonale Struktur. Die genetische Typisierung von *T. gondii* in Europa und Nordamerika zeigte, dass ca. 90% der Isolate in drei klonale Linien eingeteilt werden können (Boothroyd und Grigg 2002, Su, Khan et al. 2012), die als Typ I, II und III bezeichnet werden. Typ II wurde oft im Zusammenhang mit *T. gondii*-Infektionen beim Menschen und bei Tieren nachgewiesen (Howe und Sibley 1995, Ajzenberg, Banuls et al. 2004, Schares, Pantchev et al. 2005, Herrmann, Pantchev et al. 2010). Typ-III-*T. gondii* Stämme wurden bei Menschen nur sehr selten beobachtet, bei Tieren sind sie jedoch häufiger zu finden (Howe, Honore et al. 1997, Ajzenberg, Cogne et al. 2002). Allerdings können die Unterschiede in der Verbreitung der Typen II und III z. B. durch regionale Unterschiede in der Verfügbarkeit von Untersuchungsmaterialien von Tieren und Menschen beeinflusst worden sein.

Die meisten Isolate aus Europa und Nordamerika konnten, basierend auf SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-Analysen für insgesamt 8 ausgewählte Intron-Sequenzen, in sechs Haplogruppen (Haplogruppe 1, 2, 3, 7, 11 und 12) eingeordnet werden. Die Vertreter der Haplogruppen 1, 2, 3 und 12 dominierten, wobei erwähnt werden sollte, dass die Haplogruppen 1, 2, und 3 weitgehend mit den zuvor definierten klonalen Typen I, II und III identisch sind (Khan, Miller et al. 2011). Haplogruppe 12 scheint ebenfalls klonal zu sein und wurde kürzlich in Nordamerika beschrieben (Khan, Dubey et al. 2011). Isolate der Haplogruppe 12 wurden hauptsächlich aus Wildtieren in Nordamerika gewonnen (Khan, Dubey et al. 2011).

Da *T. gondii* eine sexuelle Phase in seinem Lebenszyklus aufweist, ist es schwierig, plausible Erklärungen für die oft sehr deutliche klonale Populationsstruktur von *T. gondii* zu finden (Grigg und Suzuki 2003).

Die Dominanz der klonalen *T. gondii*-Linien in Europa und Nordamerika wurde in der Literatur mit Hilfe einer „klonalen Verbreitungstheorie“ erklärt (Grigg und Suzuki 2003). Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Weiterverbreitung über Feliden, die eine sexuelle Rekombination der klonalen Linien von *T. gondii* einschließt, eine untergeordnete Rolle spielt (Grigg und Suzuki 2003), während die „asexuelle“ Verbreitung, etwa durch die Aufnahme von zystenhaltigen Geweben durch karnivore und omnivore Zwischenwirte, sowie eine kongenitale Übertragung offenbar entscheidend für die Weiterverbreitung war und somit zur klonalen Selektion einzelner *T. gondii*-Linien geführt hat (Grigg und Suzuki 2003, Khan, Miller et al. 2011).

Die Analyse des monomorphen Chromosom „Chr1a“, sowie anderer biallelischer Chromosomen im *T. gondii*-Genom deutete auf die Entstehung der klonalen Linien I, II und III nur durch wenige genetische Rekombinationen von frühen Vertretern der *T. gondii*-Haplogruppen 6, 9 und 12 hin (Khan, Miller et al. 2011, Walzer und Boyle 2012). Innerhalb einer klonalen Linie beobachtet man in Nukleotidsequenzen eine sehr geringe Variabilität von nur ca. 0,01%, während zwischen den klonalen Linien I, II und III ein deutlich höherer Anteil an Variabilität zu finden ist. Diese schwankt von 0,01 bis 5%, je nachdem welche Region in dem Genom betrachtet wird (Walzer und Boyle 2012).

In Südamerika, Afrika und China wird ein ganz anderes Bild der Populationsstruktur von *T. gondii* als in Nordamerika und Europa beobachtet (Khan, Miller et al. 2011, Rajendran, Su et al. 2012, Su, Khan et al. 2012). Diese Populationsstruktur schließt deutlich diversere Genotypen von *T. gondii* ein (Khan, Miller et al. 2011). Die erhöhte Diversität der *T. gondii*-Genotypen in Südamerika deutet auf das häufigere Auftreten sexueller Rekombination von *T. gondii* hin.

In Südamerika wurden insgesamt 7 Haplogruppen (Haplogruppe 4, 5, 15, 8, 9, 10 und 6) beschrieben. Die meisten der Haplogruppen weisen eine hohe Diversität zwischen ihren Vertretern auf und sind daher nicht klonal (Khan, Miller et al. 2011). Die Haplogruppen 4 und 8 dominieren in Südamerika (Khan, Dubey et al. 2011, Khan, Miller et al. 2011, Su, Khan et al. 2012).

In Afrika wurden sowohl klonale Typen II und III (Haplogruppen 2 und 3), als auch ein der südamerikanischen Haplogruppe 6 ähnlicher Genotyp, auch bezeichnet als „Afrika 1“, beobachtet. Des Weiteren wurde ein neuer Genotyp (Afrika 3) beschrieben. Dieser Genotyp wurde in einer neueren Studie auch als *T. gondii*-Haplogruppe 14 bezeichnet (Khan, Miller et al. 2011).

In China wurden dort häufig vorkommende *T. gondii*-Isolate beschrieben, die nicht den klonalen Linien I, II oder III zugeordnet werden konnten. Eine genetische Analyse ordnete diese Genotypen einer neuen Haplogruppe 13 zu (Khan, Miller et al. 2011).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden weltweit mindestens 138 unterschiedliche *T. gondii*-Genotypen beschrieben (Su, Khan et al. 2012). Die meisten davon konnten in 15 Haplogruppen eingeordnet werden, die aufgrund ihrer Polymorphismen in den Intronsequenzen, PCR-RFLP-Muster und Mikrosatellitensequenzen in sechs sogenannte „clades“ aufgeteilt wurden (Khan, Miller et al. 2011, Su, Khan et al. 2012).

Genaue Ursachen für die Unterschiede in der Zusammensetzung der *T. gondii*-Populationen in Süd-, Nordamerika, Afrika, China und Europa sind noch nicht bekannt. Allerdings weisen

alle Fakten auf eine wichtige Rolle der grundsätzlich unterschiedlichen Wege der Transmission von *T. gondii* hin (Khan, Miller et al. 2011).

3.6 Virulenz von *T. gondii*

Schon relativ früh wurde beobachtet, dass verschiedene *T. gondii*-Isolate eine unterschiedliche Virulenz für Mäuse besaßen (Sibley und Boothroyd 1992). Bei hochvirulenten Isolaten genügen 1-10 Tachyzoiten, um 100% einer experimentell infizierten Gruppe von Mäusen zu töten ($LD_{100} \leq 10$). Bei mittel- und niedrigvirulenten *T. gondii*-Isolaten sind 100 bis 10.000 Tachyzoiten erforderlich, um bei 50% einer experimentell infizierten Gruppe von Mäusen eine tödlich verlaufende Toxoplasmose hervorzurufen ($LD_{50} \geq 100$). Als avirulent werden *T. gondii*-Isolate bezeichnet, bei denen alle infizierten Labormäuse unabhängig von der Infektionsdosis überleben (Weilhammer und Rasley 2011, Hill und Su 2012). Vertreter des klonalen Typs I sind regelmäßig hochvirulent für Mäuse, während Vertreter der anderen klonalen Linien II und III nur eine geringe Virulenz für Mäuse aufweisen (Hill und Su 2012).

„Maus-Virulenzmodelle“ werden weltweit für die Charakterisierung von *T. gondii*-Isolaten eingesetzt (Pena, Gennari et al. 2008, Weilhammer und Rasley 2011, Hill und Su 2012). Die in diesen Modellen gewonnenen Daten zur Virulenz sind vermutlich nicht auf andere Zwischenwirte übertragbar. Es gibt nur wenige Informationen darüber, wie sich *T. gondii* in anderen Zwischenwirten als Mäusen verhält. Auch sind die Kenntnisse zur Virulenz von unterschiedlichen *T. gondii*-Isolaten beim Menschen sehr begrenzt. Toxoplasmosen beim Menschen äußern sich in pathologischen Veränderungen, die generalisiert auftreten, aber auch auf einzelne Organe beschränkt sein können, wie z.B. bei der okulären, zerebralen und viszeralen Toxoplasmose. Der Mensch kann die Toxoplasmose sowohl vertikal (diaplazentar) als auch horizontal erwerben. Möglicherweise führen die verschiedenen Infektionswege zu Unterschieden in der Manifestationsform der Infektion bzw. Erkrankung. Daher ist es vermutlich unmöglich, ein einziges „Virulenz-Kriterium“ festzulegen, das für alle diese unterschiedlichen Formen der Toxoplasmose des Menschen herangezogen werden kann (Dubremetz und Lebrun 2012).

Labormäuse können nach nur wenigen Tagen an einer *T. gondii*-Infektion sterben, während Laborratten, die auf dieselbe Weise infiziert wurden, die Infektion überleben. Dies ist nur ein Beispiel dafür, dass nicht nur parasitenspezifische, sondern auch wirtsspezifische Faktoren für die Folgen einer Infektion mit *T. gondii* verantwortlich sind (Jamieson, de Roubaix et al. 2008, Jamieson, Cordell et al. 2009, Dubremetz und Lebrun 2012).

Als Virulenzfaktoren von *T. gondii* werden die Genprodukte bezeichnet, die den Schweregrad einer Toxoplasmose beeinflussen. Diese müssen aber nicht entscheidend für eine effiziente Weiterverbreitung des Parasiten sein, z.B. für sein Überleben im Wirt und für seine Übertragung zwischen Wirten (Dubremetz und Lebrun 2012). Die Virulenz wird z.B. durch Unterschiede in der Vermehrungsrate in Wirtszellen beeinflusst. Die intrazelluläre Entwicklung von *T. gondii*, gefolgt von der Reinfektion der Nachbarzellen sowie eine Zystenbildung sind weitere wichtige Virulenzfaktoren, da diese die Proliferationskapazitäten des Parasiten innerhalb des Wirtes steuern (Dubremetz und Lebrun 2012).

Wichtig sind auch Unterschiede in der Aktivierung der Wirtsimmunität. Allerdings ist nur unvollständig bekannt, über welche Mechanismen genetisch unterschiedliche *T. gondii* diesen Prozess beeinflussen (Dubremetz und Lebrun 2012). Diese Fähigkeit von *T. gondii*, die Wirtszellantwort zu modulieren, wird durch eine Vielzahl an Virulenzfaktoren bedingt (Behnke, Khan et al. 2011, Dubremetz und Lebrun 2012). Diese sorgen bei intrazellulären Stadien für eine Resistenz gegen die native Immunantwort des Wirtes oder modulieren die Homöostase des Wirtsimmunsystems, um die gegen die Infektion gerichtete sekundäre Immunantwort zu regulieren. Für diese Zwecke verwendet *T. gondii* ein großes Arsenal an Enzymen, die sowohl einzeln als auch als Gruppen als Virulenzfaktoren bezeichnet werden (Behnke, Khan et al. 2011). Hierzu gehören Rhoprien- und Pseudokinasen (ROP5, 16, 18 und 38). Bei der Invasion von *T. gondii* werden durch diese Proteine die Inflammationsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen moduliert, je nachdem, welches ROP-Protein an der Modulation beteiligt ist. Da diese ROP-Proteine stark polymorph sind, ist eine signifikant unterschiedliche Aktivität der Kinasen und Pseudokinasen bei unterschiedlichen *T. gondii*-Genotypen im Mausmodell zu beobachten (Behnke, Khan et al. 2011, Dubremetz und Lebrun 2012).

Das Aktin-regulierende Protein Profilin spielt beim Eindringen in Wirtszellen eine wichtige Rolle und bewirkt die Freisetzung von Interleukin-12 (IL-12) durch eine Induktion des TLR11 (Toll-Like-Receptor 11) (Plattner, Yarovinsky et al. 2008). Dieses Protein könnte daher ebenfalls als Virulenzfaktor in Betracht gezogen werden (Dubremetz und Lebrun 2012).

T. gondii-Oberflächenproteine und -lipide (SAG1, SAG3, Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)), sowie Mikronemen-Proteine (TgMIC1, 2, 3, 4, 6, 8, TgMIC2-AP, AMA1, Perforin) werden ebenfalls als potentielle Virulenzfaktoren in Betracht gezogen (Blader und Saeij 2009, Dubremetz und Lebrun 2012). Diese Proteine sind hauptsächlich für die Wirtszell-Adhäsion (SAG1, SAG3, MIC2, 2-AP), Immunmodulation (GPI), Invasion (AMA1, MIC1, 3, 4, 6 and 8), Permeabilität der parasitophoren Vakuole und für die Freisetzung von *T. gondii*-Tachyzoiten (Perforin) verantwortlich (Blader und Saeij 2009, Kafsack, Pena et al. 2009,

Dubremetz und Lebrun 2012). Von den Bestandteilen der Dichten Granula (GRA) könnten GRA2 und GRA3 an der Virulenz von *T. gondii* für Mäuse beteiligt sein. Nach einer Deletion der GRA2- und GRA3-Gene war kein oder nur ein sehr geringer Einfluss auf die Entwicklung der parasitophoren Vakuole zu beobachten, wohingegen die Virulenz für Mäuse signifikant abnahm (Dubremetz und Lebrun 2012).

Zahlreiche Studien an Mausmodellen zeigten, dass Virulenzunterschiede vom *T. gondii*-Genotyp abhängig sind (Howe und Sibley 1995, Boothroyd und Grigg 2002, Vaudaux, Muccioli et al. 2010). Die meisten der hochvirulenten *T. gondii* in Nordamerika und Europa können dem klonalen Typ I und atypischen Isolaten zugeordnet werden, während die weniger virulenten Isolate den Typen II und/oder III angehören (Howe und Sibley 1995). Atypische und rekombinante *T. gondii*-Typen in Europa und Nordamerika weisen häufig eine höhere Mausvirulenz auf (Grigg und Suzuki 2003, Khan, Dubey et al. 2011, Herrmann, Bärwald et al. 2012). Unter den Vertretern südamerikanischer und afrikanischer nicht-klonaler Linien beobachtet man auch im Mausmodell sowohl hochvirulente (Genotyp BrI, Afrika1 und Afrika 3), als auch mittelvirulente, niedrigvirulente (Genotyp BrII, Type III-like) und avirulente (Genotyp BrIII) Isolate (Pena, Gennari et al. 2008, Mercier, Devillard et al. 2010).

3.7 Bedeutung des Parasitengenotyps für die Krankheitsbilder bei Menschen

Obwohl *T. gondii* vom Typ I im Gegensatz zu den Typen II und III im Mausmodell hochvirulent sind, gibt es bislang keine deutlichen Hinweise, dass der gleiche Effekt beim Menschen oder anderen Zwischenwirten auftritt.

T. gondii-Infektionen bei Menschen sind weit verbreitet (Tenter, Heckerroth et al. 2000). Weltweit liegt die *T. gondii*-Seroprävalenz bei schwangeren Frauen zwischen 8% und 90% (Tenter, Heckerroth et al. 2000, Groß 2004).

Von Toxoplasmose betroffene Personengruppen lassen sich folgendermaßen einteilen: i. Menschen, die sich pränatal mit *T. gondii* infiziert haben und ii. Menschen, die die Infektion postnatal erworben haben (Boothroyd und Grigg 2002).

Bei einer immunkompetenten Person führt eine *T. gondii*-Infektion nur in 10 bis 20% der Fälle zu klinischen Erscheinungen, die oft nur mild sind (Weiss und Dubey 2009). Die Symptomatik beginnt meist mit Trägheit, Kopf-, Muskel- oder Gelenkschmerzen und geht gelegentlich mit Fieber einher. Diese Erscheinungen können mehrere Wochen anhalten

(Weiss und Dubey 2009). Wegen der unspezifischen Symptome bleibt eine akute Toxoplasmose meistens unerkannt und eine *T. gondii*-Infektion wird oft nur dann in Erwägung gezogen, wenn die Patienten vergrößerte Lymphknoten aufweisen (Weiss und Dubey 2009). Nur in Einzelfällen war es in Europa möglich, *T. gondii* im Zusammenhang mit Toxoplasmosen immunkompetenter Personen zu isolieren und zu typisieren. Diese Patienten wiesen eine Lymphadenopathie auf und die isolierten Parasiten konnten dem klonalen Typ II zugeordnet werden (Dardé 1996).

Okuläre Toxoplasmose (OT) kann durch eine postnatale sowie durch eine pränatal erworbene *T. gondii*-Infektion hervorgerufen werden (Montoya und Remington 1996, Weiss und Dubey 2009). Lange Zeit ging man davon aus, dass die OT meistens auf eine kongenitale *T. gondii*-Infektion zurückzuführen ist. Neuere Untersuchungen zeigten, dass OT auch häufig bei immunkompetenten Personen auftritt, die sich postnatal mit *T. gondii* infiziert haben (Holland, Lewis et al. 2002).

Eine klassische klinische okuläre Toxoplasmose wird von Retinochoroiditis, als eine Folge der Netzhautentzündung begleitet. Diese führt zu Toxoplasmose-typischen Narben in der Netzhaut. Friedmann und Knox (1969) haben drei spezifische Formen von OT-bedingten Retinochoroiditiden beschrieben: i. große destruktive Läsionen, ii. punktierte innere Läsionen und iii. punktierte tiefe Läsionen in der Netzhaut. Bei immunkompetenten Patienten mit akuter OT wird fast immer nur eine fokale aktive Läsion in der Retina beobachtet. Bei immunsupprimierten Patienten ist das Auftreten von multiplen aktiven Läsionen in einem oder auch in beiden Augen nicht selten (Holland 2004).

Zu einer Retinochoroiditis kann es nach einer Neuinfektion oder nach Reaktivierung einer latenten Infektion kommen. In den meisten Fällen treten Symptome wie eingetrübtes Sehen, Skotom, Schmerzen, Photophobie und Epiphora auf und können zur Verminderung oder zum totalen Verlust des Sehvermögens führen (Sheets, Grewal et al. 2009, Weiss und Dubey 2009, Delair, Latkany et al. 2011, Vasconcelos-Santos, Dodds et al. 2011).

Bei Patienten mit OT in Europa, Nord- und Südamerika wurden in vielen Fällen *T. gondii* mit Typ-I-Allelen, mit Mischungen aus Typ-I- und Typ-III-Allelen, sowie *T. gondii*, die nicht den klonalen Typen I, II und III zugeordnet werden konnten, beobachtet (Grigg, Ganatra et al. 2001, Vallochi, Muccioli et al. 2005, Khan, Jordan et al. 2006, Switaj, Master et al. 2006). Bei französischen OT-Patienten überwogen *T. gondii* vom Typ II (Fekkar, Ajzenberg et al. 2011). In Studien aus Südamerika wurden dagegen stets atypische *T. gondii* (vermutlich Vertreter der dort vorkommenden Haplogruppen) bei OT Patienten nachgewiesen (Vallochi, Muccioli et al. 2005; Khan, Jordan et al. 2006).

Eine **kongenitale Infektion, d.h. der diaplazentare Übergang der Infektion auf den Fötus** tritt meistens bei Frauen auf, die sich während einer Schwangerschaft mit *T. gondii* infizieren. Selten findet die kongenitale Übertragung bei Frauen statt, die sich kurz vor der Schwangerschaft infiziert haben (Weiss und Dubey 2009). Die Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmose bei immunsupprimierten schwangeren Frauen kann auch zur diaplazentaren Übertragung der Infektion führen. Diese tritt jedoch selten auf (Montoya und Remington 2008, Weiss und Dubey 2009). Das Risiko einer diaplazentaren Infektion ist gering, wenn die maternale Infektion im ersten Trimester der Schwangerschaft stattfindet (10-15%) und sehr hoch, wenn sie im dritten Trimester auftritt (60-90%) (Montoya und Remington 2008, Weiss und Dubey 2009).

Bei der kongenital erworbenen Toxoplasmose hängt das Ausmaß der klinischen Erscheinungen vom Zeitpunkt der Infektion ab. Je früher die Infektion des Fötus stattfindet, desto schwerer sind die Folgen (Montoya und Remington 2008, Weiss und Dubey 2009). Die Übertragung des Parasiten während einer späteren Schwangerschaftsperiode (26.-40. Woche) kann zu einer latenten Toxoplasmose führen, die erst im Laufe des Lebens klinische Erkrankungen zur Folge hat (Montoya und Remington 2008, Weiss und Dubey 2009). Die klinischen Manifestationsformen können dabei sehr stark variieren. Es kann zum Auftreten von Symptomen wie Chorioretinitis, Strabismus, Blindheit, Epilepsie, psychomotorischen und mentalen Störungen, Anämie, Ikterus, Exanthem, Petechien verursacht durch eine Trombozythopenie, Enzephalitis, Pneumonitis, Mikrozephalie, intrakranielle Kalzifikation, Hydrozephalus, aber auch zu unspezifischen Symptomen wie Diarrhoe und Hypothermie kommen (Weiss und Dubey 2009).

Die meisten *T. gondii*-Isolate, die aus humanen Proben isoliert wurden, stammen aus kongenitalen Infektionen. Für die Isolierung wurden Amnionflüssigkeit, Nabelschnurblut und Gewebe von abortierten Föten herangezogen. Die Ergebnisse einer französischen Studie haben gezeigt, dass in 200 von kongenitalen Infektionen stammenden Proben 85% der *T. gondii*-Isolate dem Typ II zuzuordnen waren (Ajzenberg, Dumetre et al. 2005). Bei den meisten Fällen einer kongenitalen Toxoplasmose mit symptomatischen Folgen in Europa wurde *T. gondii* vom Typ II nachgewiesen (Ajzenberg, Cogne et al. 2002). Nur in wenigen kongenitalen Fällen wurde *T. gondii* vom Typ I isoliert. Obwohl Typ-I-*T. gondii* hochvirulent für Labormäuse sind und eine höhere Vermehrungsrate in Zellkulturen aufweisen (Barragan und Sibley 2002), gab es Fälle, bei denen aus der Plazenta Typ-I-*T. gondii* isoliert wurden, die Neugeborenen aber von dieser Infektion nicht betroffen waren (Ajzenberg, Cogne et al. 2002).

Die Reaktivierung einer latenten *T. gondii*-Infektion oder eine primäre Infektion bei **HIV-infizierten immunsupprimierten Patienten**, sowie bei Patienten, die aus anderen Gründen immunsupprimiert sind, z.B. als Folge einer Organtransplantation, stellen sehr gefährliche Komplikationen dar. Die häufigste klinische Erscheinungsform bei diesen Patienten ist die Enzephalitis. Weitere klinische Symptome sind Kopfschmerzen, Desorientierung, Schläfrigkeit, Hemiparese, komatöser Zustand und Pneumonie (Renold, Sugar et al. 1992).

Bei seronegativen, nicht-infizierten Patienten kann es durch Organtransplantationen oder durch Blutinfusionen zur Infektion mit *T. gondii* kommen (Derouin, Leport et al. 1996).

In den meisten Toxoplasmose-Fällen bei HIV-infizierten und anderen immunsupprimierten Patienten in Frankreich wurde *T. gondii* des klonalen Typs II (75-80%) nachgewiesen (Howe, Honore et al. 1997, Honore, Couvelard et al. 2000). Aspinall und Kollegen (2003) haben über eine Häufung von *T. gondii* des Typs I (50%) in Großbritannien berichtet. In dieser Studie wurden bei Patienten auch gemischte Infektionen (25%) mit unterschiedlichen klonalen *T. gondii*-Typen festgestellt (Aspinall, Guy et al. 2003). Eine ähnliche Dominanz des Typ I (62,5%), sowie eine Beteiligung atypischer Isolate (25%) bei Infektionen immunsupprimierter Patienten zeigten Studien aus den USA (Khan, Su et al. 2005). In Spanien wurden mehrheitlich Typ-II-Infektionen bei HIV-infizierten Patienten beschrieben (Fuentes, Rubio et al. 2001). Allerdings wurde in vielen Studien nur ein PCR-RFLP-Marker (SAG2) zur Genotypisierung (siehe Kapitel 3.11.2) angewendet. Daher besteht die Möglichkeit, dass in diesen Studien manche atypischen oder rekombinanten *T. gondii* nicht als solche erfasst wurden.

3.8 *T. gondii*-Infektion in Katzen

Die meisten Feliden infizieren sich postnatal, überwiegend durch die Aufnahme von Gewebezysten aus rohem, zystenhaltigem Fleisch, oder seltener durch die Aufnahme von sporulierten Oozysten. Es ist auch bekannt, dass eine kongenitale Übertragung des Parasiten bei Katzen möglich ist (Dubey und Jones 2008). Eine *T. gondii*-Infektion verläuft bei Feliden in der Regel subklinisch, jedoch weisen kongenital infizierte Katzenwelpen meistens klinische Symptome einer Toxoplasmose auf. Adulte Katzen können in seltenen Fällen ebenfalls eine klinische Toxoplasmose entwickeln (Dubey und Carpenter 1993).

Allgemeine Symptome einer Toxoplasmose bei Feliden sind erhöhte Körpertemperatur, Augenentzündung, Anorexie, Lethargie, abdominales Unwohlsein und neurologische Störungen (Vollaire, Radecki et al. 2005).

Da Feliden Endwirte von *T. gondii* sind, können sie nach einer Infektion mit dem Parasiten Oozysten ausscheiden. Am häufigsten kommt es nach der Aufnahme von Gewebezysten zur Oozystenausscheidung. Dubey et al. (2009) haben gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Oozystenausscheidung nach einer Infektion mit Oozysten oder Tachyzoiten bei Katzen geringer ist als nach einer Infektion mit *T. gondii*-Bradyzoiten. Die Aufnahme von nur einem Bradyzoiten kann zur Infektion und Ausscheidung von Oozysten führen, während die Infektion mit mindestens 1000 Oozysten notwendig sind, damit Katzen Oozysten ausscheiden (Dubey 1996, Dubey 2009).

Die meisten Katzen scheiden Oozysten vermutlich nur einmalig aus, jedoch haben Experimente gezeigt, dass Katzen in der Lage sind, nach einer wiederholten *T. gondii*-Infektion erneut Oozysten auszuscheiden (Dubey 1995). Die Darmimmunität, die sich nach der Primärinfektion ausbildet und vermutlich eine erneute Oozystenausscheidung nach erneuter Infektion in der Regel verhindert, kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden wie das Alter einer Katze, der Genotyp des Parasiten, das Parasitenstadium, das zur Infektion der Katze führt, die Infektionsroute sowie der Ernährungszustand des Tieres. Zum Beispiel entwickeln experimentell-infizierte Katzen nur selten eine klinische Toxoplasmose nach der oralen Aufnahmen einer hohen *T. gondii*-Dosis, während die intraperitoneale Injektion mit wenigen *T. gondii*-Stadien zu einer letalen Toxoplasmose führen kann (Dubey 1995).

Es wird vermutet, dass die Infektion von Katzen mit einem bestimmten *T. gondii*-Genotyp auch eine vorübergehende Darmimmunität gegen andere *T. gondii*-Genotypen hervorruft. Diese Vermutung wurde aber noch nicht experimentell bestätigt (Dubey 2009).

3.9 Immunabwehr bei *T. gondii*-Infektionen

In einem immunkompetenten Wirt wird eine *T. gondii*-Infektion hauptsächlich durch die zelluläre Immunantwort kontrolliert (Denkers und Gazzinelli 1998), zusätzlich scheint auch der Antikörperantwort eine gewisse Bedeutung bei der Abwehr des Parasiten zuzukommen (Correa, Canedo-Solares et al. 2007, Lang, Groß et al. 2007).

Innerhalb der frühen Infektionsphase sind neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) für die Immunabwehr gegen *T. gondii* verantwortlich. Dabei kommt es zur Phagozytose, zur zellulärer Toxizität und der Produktion von Interferon (IFN)- γ durch NK-Zellen.

Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) präsentieren den CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten Antigene. Aktivierte CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, aber auch Makrophagen und DCs aktivieren eine Differenzierung von T-Helferzellen (TH) des Phänotyps 1 durch die Sekretion von IL-12 und TH des Phänotyps 2 durch die Sekretion von IL-6. Differenzierte TH1-Lymphozyten sezernieren IFN- γ , einen starken Makrophagen-Aktivator. Aktivierte Makrophagen sezernieren TNF- α und Stickoxid (NO) und sorgen so für die verstärkte Zerstörung von *T. gondii*.

IL-12, IFN- γ und TNF- α sind Schlüssel-Zytokine, welche die Parasitenreplikation unter Kontrolle halten (Correa, Canedo-Solares et al. 2007).

IL-10, IL-27 und TGF (Tumor Growth Factor)- β werden von den TH des Phänotyps 3, sogenannten regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) sezerniert und sind für die Kontrolle der TH1-spezifischen Immunantwort zuständig, um autoimmune Schädigung eines Wirtsgewebes zu kontrollieren. (Buzoni-Gatel und Werts 2006, Correa, Canedo-Solares et al. 2007, Lang, Groß et al. 2007, Miller, Boulter et al. 2009). T_{regs} werden durch diverse immunologische Mechanismen kontrolliert, z. B durch die TOLL-like Rezeptoren (TLR), oder durch Antigen-präsentierende Zellen unter Sekretion unterschiedlicher Zytokine und Chemokine (z. B. IFN- γ , IL-6) (Pasare und Medzhitov 2003, Degauque, Mariat et al. 2008, Tang, Adams et al. 2008, Duarte, Zelenay et al. 2009, Wei, Wei et al. 2009). Oldenhove und Kollegen (Oldenhove, Bouladoux et al. 2009) haben gezeigt, dass während einer experimentell hervorgerufenen Toxoplasmose (10 Tage nach der Infektion) bei Labormäusen (C57BL/6 Linie) ein drastischer Abfall der T_{regs} zu beobachten war. Die Ergebnisse der Studie liefern einen zusätzlichen Hinweis, dass die TH1 bedingte zelluläre Immunantwort des Wirtes eine Schlüsselrolle bei *T. gondii*-Infektionen spielen.

Drei bis zehn Tage nach der *T. gondii*-Infektion können Immunglobuline (Ig) der Klasse M unabhängig vom Typ des Parasiten, vom Geschlecht sowie vom Alter des Wirtes im Serum nachgewiesen werden. IgM-Antikörper werden als diagnostische Marker einer akuten Toxoplasmose in serologischen Tests verwendet. Allerdings konnte IgM bei manchen Individuen auch noch Monate und sogar Jahre nach der Infektion nachgewiesen werden. Dieses Phänomen wurde häufiger bei schwangeren Frauen sowie bei Patienten mit Toxoplasmose-bedingter Lymphadenopathie beobachtet (Del Bono, Canessa et al. 1989, Gorgievski-Hrisoho, Germann et al. 1996). Neben IgM wird IgA nachgewiesen, welches bis zu sieben Monate nach der *T. gondii*-Infektion nachweisbar ist. IgA wird auch zusammen mit IgM als diagnostischer Marker für die Diagnose einer akuten/kongenitalen Toxoplasmose bei Patienten bzw. schwangeren Frauen und Neugeborenen eingesetzt (Gorgievski-Hrisoho, Germann et al. 1996, Sensini 2006). Immunglobuline der Klasse E (IgE) werden auch

während der akuten Phase der *T. gondii*-Infektion nachgewiesen. IgE wurde bei bis zu 86% der akut-infizierten Erwachsenen detektiert, wobei die spezifische IgE-Antwort bei Patienten mit klinischer Toxoplasmose lange persistiert (Gorgievski-Hrisoho, Germann et al. 1996, Foudrinier, Villena et al. 2003).

Während der akuten Toxoplasmose in Mäusen werden IgG2a und IgG2b durch IFN- γ induziert; IgG1 wird durch IL-4 und IL-13 aktiviert und als serologischer Marker der chronischen Toxoplasmose betrachtet (Godard, Darcy et al. 1990, Nguyen, Bigaignon et al. 1998).

Bei Menschen ist die Beziehung zwischen Zytokin-Profilen und dem Auftreten bestimmter Antikörper-Isotypen komplexer als im murinen Immunsystem (Correa, Canedo-Solares et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass humane IgG1- und IgG3-Isotypen vom Zytokin-Komplex IFN- γ , IL-10 und TGF- β aktiviert werden. Der IgG2-Isotyp wird unter Einfluss von IL-2 und IL-6 gebildet. Alle drei genannten IgG-Isotypen des Menschen werden meistens bei einer akuten Toxoplasmose nachgewiesen. IgG4 wird dagegen häufig während der chronischen Phase der *T. gondii*-Infektion detektiert und unter der Wirkung von IL-4 und IL-13 gebildet (Correa, Canedo-Solares et al. 2007). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass beim Menschen die Subklasse IgG1 meist der dominierende IgG-Isotyp ist, während zwischen IgG2, IgG3 und IgG4 keine großen Unterschiede im Nachweis festgestellt werden konnten (Ee, Singh et al. 1989, Huskinson, Stepick-Biek et al. 1989, Correa, Canedo-Solares et al. 2007).

3.10 *T. gondii*-Antigene

Antigene von *T. gondii* werden grob in zwei Gruppen eingeteilt: i. Oberflächenantigene und ii. sekretorisch-exkretorische Antigene (Carruthers 1999, Carruthers, Hakansson et al. 2000, Kotresha und Noordin 2010).

Zu den Oberflächenantigenen gehört das immundominante SAG1-Protein, welches tachyzoitenspezifisch ist und früher auch als P30 bezeichnet wurde. Dieses Protein stellt ca. 5% des gesamten Proteinarsenals von *T. gondii*-Tachyzoiten (Burg, Perelman et al. 1988). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sowohl mit monoklonalen Antikörpern aufgereinigtes als auch rekombinantes SAG1 von Antikörpern infizierter Tiere und Menschen erkannt wird (Groß, Roos et al. 1992, Harning, Spenter et al. 1996, Hosseinijad, Azizi et al. 2009, Maksimov, Buschtöns et al. 2011). SAG1 hat sich als einer der besten Kandidaten für die serologische Diagnose der *T. gondii*-Infektion bei Menschen und Tieren erwiesen, da dieses Antigen eine starke Immundominanz und eine geringe Kreuzreaktivität mit Antigenen anderer Erreger aufweist (Lekutis, Ferguson et al. 2001, Jung, Lee et al. 2004, Maksimov,

Buschtöns et al. 2011). SAG2A (P22), ein weiteres Oberflächenantigen, weist eine ebenso starke immundominante Eigenschaft auf. Allerdings wird dieses Antigen in deutlich geringerem Maße vom Parasiten exprimiert (Jung, Lee et al. 2004, Cunha-Júnior, Silva et al. 2010).

Durch die starke Immundominanz spielen SAG2A und SAG1 vermutlich eine wichtige Rolle für die Immunantwort und Unterschiede in den Reaktionen gegen diese Antigene entscheiden möglicherweise über die Virulenz einer Infektion. SAG2A und SAG1 sollen für die Adhärenz von Tachyzoiten an Wirtszellen von Bedeutung sein (Lekutis, Ferguson et al. 2001, Jung, Lee et al. 2004). Die genannten Antigene sind prototypische Vertreter der Familie der Oberflächenantigene von *T. gondii*, zu der mindestens 20 homologe Proteine gehören, die als SRS-Proteine (Proteins with SAG1-Related Sequences) bezeichnet werden (Jung, Lee et al. 2004). In jedem Parasitenstadium sind stadienspezifische Oberflächenantigene zu finden, so sind z.B. SAG1, SAG2A und SAG3 nur in Tachyzoiten nachweisbar, während SAG4, SAG2C,D,X,Y nur in Bradyzoiten gefunden wurden; in Sporozoen gilt SporoSAG1 als spezifisches Oberflächenantigen (Lekutis, Ferguson et al. 2001, Radke, Gubbels et al. 2004, Saeij, Arrizabalaga et al. 2008).

Wie bereits ausgeführt, kommen bei *T. gondii* drei Typen von elektronendichten, sekretorischen Organellen vor. Diese werden als Mikronemen (MIC), Rhoptrien (ROP) und Dichte Granula (GRA) bezeichnet. Sie enthalten zahlreiche immunreaktive sekretorisch-exkretorische Antigene.

MIC-Proteine spielen eine zentrale Rolle in der Anhaftung des Parasiten an die Wirtszelle (Carruthers, Hakansson et al. 2000), ROP-Proteine werden sofort nach der Zellanhaftung aus den Organellen sezerniert und sind an der Invasion in die Wirtszelle und an der Bildung der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) beteiligt (Kotresha und Noordin 2010). GRA-Proteine tragen unter anderem zur Ausbildung der parasitophoren Vakuole (PV) bei, indem sie entweder in die PVM oder in das intravakuoläre Netzwerk der PV eingebaut werden (Mercier, Dubremetz et al. 2002, Kotresha und Noordin 2010). In mehreren Studien wurden die guten diagnostischen Eigenschaften von MIC-, ROP- und GRA-Antigenen gezeigt (Lecordier, Fourmaux et al. 2000, Pfrepper, Enders et al. 2005, Altcheh, Diaz et al. 2006, Holec, Gasior et al. 2008).

Für die meisten beschriebenen Antigene von *T. gondii* wurden rekombinante Proteine mit Hilfe unterschiedlicher Vektoren (*Escherichia coli*, *Pichia pastoris* etc.) hergestellt und in diagnostischen Tests zum Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörper eingesetzt (Klaren und Peek 2001, Beghetto, Buffolano et al. 2003, Beghetto, Spadoni et al. 2006, Igarashi,

Kano et al. 2008, Holec-Gasior, Kur et al. 2009, Kotresha und Noordin 2010). Als Alternative zu nativem Antigen kamen auch synthetische Peptide zum Einsatz, deren Sequenz ein als Antigen dienendes Epitop enthält (Kong, Grigg et al. 2003, Kato, Claveria et al. 2005, Kato, Claveria et al. 2007, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Sousa, Canada et al. 2010).

3.11 Typisierung von *T. gondii*

3.11.1 Isoenzym-Analyse

Die ersten Studien über die Diversität von *T. gondii* wurden mit Hilfe von Isoenzym-Analysen durchgeführt. Dabei wurden sechs polymorphe enzymatische Systeme von *T. gondii* charakterisiert und beschrieben (Aspartataminotransferase, Glutathionreduktase, Amylase, Glukosephosphatisomerase, Azidphosphatase und Propionylesterase). Die Untersuchung verschiedener *T. gondii* zeigte, dass die meisten der untersuchten Isolate in drei Gruppen mit spezifischen Isoenzym-Mustern (Zymodeme) eingeteilt werden konnten (Dardé, Bouteille et al. 1988, Dardé, Riahi et al. 1992, Dardé 1996). Diese Gruppen wurden als Z1, Z2 und Z3 bezeichnet. Später wurden analoge *T. gondii*-Gruppen mit Hilfe von anderen molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen. Die Isoenzym-Analyse zeigte eine hohe Typisierungsauflösung, allerdings war für dieses Typisierung-Verfahren eine große Anzahl von Parasiten erforderlich (ca. 10^6 Tachyzoiten/Enzym). Dies limitierte die Anzahl der Isolate, die untersucht werden konnten, da es zum Einen schwierig ist, ein *T. gondii*-Isolat aus Gewebeproben oder Oozysten zu erhalten, und zum Anderen dauerte es bei manchen dieser *in-vitro* vermehrten Isolate bis zu 2 Monate, bis die erforderliche Anzahl an Tachyzoiten gewonnen waren (Dardé, Riahi et al. 1992, Dardé 1996).

3.11.2 Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs)

SNPs im *T. gondii*-Genom wurden durch die Sequenzierung von single-copy-Genen nachgewiesen. Die meisten der heute bekannten genetischen Marker basieren auf SNPs. Diese Marker wurden in den kodierenden DNA-Sequenzen von immundominanten Antigenen (SRS, GRA, ROP etc.) entdeckt (Sibley und Boothroyd 1992, Parmley, Groß et al. 1994, Grigg, Ganatra et al. 2001, Khan, Taylor et al. 2005). SNPs wurden auch in Genen gefunden, die strukturelle Proteine kodieren (α - und β -Tubulin oder Actin) (Lehmann, Blackston et al. 2000) oder in Genen, die für die Kodierung von Enzymen (z.B. Dehydrofolatreduktase, Dehydropteroatsynthase, Nukleosidtriphosphatase etc.)

verantwortlich sind (Asai, Miura et al. 1995, Binas und Johnson 1998). Zudem wurden Polymorphismen auch in Genen (850, 950, L328, 62B, 226, C19, und B1) mit unbekannter Funktion identifiziert (Sibley und Boothroyd 1992, Grigg und Boothroyd 2001). Khan und Kollegen (2005) beschrieben zusätzlich zu 50 bereits bekannten 200 weitere genetische Marker (Khan, Taylor et al. 2005). Alle publizierten Marker (250) decken im Intervall von 300-kb genetische Merkmale in 14 Chromosomen des *T. gondii*-Genoms ab.

SNPs sind auch in nicht-kodierenden Regionen (so genannten Introns) im *T. gondii*-Genom zu finden. Diese wurden auch zur Analyse der Populationsstruktur des Protozoons sequenziert und mit Mitteln der Bioinformatik analysiert (Khan, Dubey et al. 2011, Khan, Miller et al. 2011, Su, Khan et al. 2012). Die Ergebnisse der Untersuchung von Polymorphismen mit allen beschriebenen Markern wiesen darauf hin, dass es im Wesentlichen nur drei dominante, klonale *T. gondii*-Linien (Typen) in Europa und Nordamerika gibt. Die genetische Analyse zeigte auch, dass für viele Loci dieser drei Linien nur maximal zwei Allele vorhanden sind, was darauf hindeutete, dass die drei klonalen Linien durch wenige Einkreuzungen aus jeweils einer von zwei sehr ähnlichen ursprünglichen *T. gondii*-Linien in eine 3. Linie entstanden sind (Grigg, Bonnefoy et al. 2001, Su, Evans et al. 2003, Su, Khan et al. 2012).

SNPs können zur Typisierung eingesetzt werden. So gilt z. B. die Multilocus-Sequenzierung, basierend auf der gleichzeitigen Analyse mehrerer Loci, als eine der besten Methoden für die Detektion von Polymorphismen und die Untersuchung der Populationsstruktur des Parasiten. Jedoch ist dieses Verfahren teuer.

Eine relativ kostengünstige Methode, die schneller und einfacher als die Sequenzierung durchgeführt werden kann, stellt die Analyse von PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms) dar. Allerdings ist dieses Verfahren weniger aufschlussreich als die Sequenzierung, da nur wenige polymorphe Loci anhand ihrer Restriktionsenzym-Schnittstellen gleichzeitig untersucht werden können (Fazaeli, Carter et al. 2000). Trotz aller Nachteile der PCR-RFLP-Methode ist sie derzeit noch immer eine der am häufigsten verwendeten Methoden für die molekulare Typisierung von *T. gondii*-Isolaten (Sibley und Boothroyd 1992, Schares, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010).

3.11.3 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten (MSs), auch bekannt als „Simple Sequence Repeats (SSRs)“ oder „Short Tandem Repeats (STRs)“, sind kurze nicht kodierende Nukleotid-Sequenzen mit der Länge von zwei bis sechs Nukleotiden. MSs sind die häufigste Form repetitiver DNA-Sequenzen im

Genom von *T. gondii*. Die Anzahl der Repeats unterscheidet sich bei unterschiedlichen klonalen Linien; deswegen gelten die MSs als sehr informative Genotyp-spezifische Marker. Bislang wurden insgesamt 15 MSs identifiziert und für die Genotypisierung von *T. gondii*-Isolaten angewendet (Ajzenberg, Banuls et al. 2002, Ajzenberg, Cogne et al. 2002, Ajzenberg, Collinet et al. 2010). Diese MSs-Marker befinden sich entweder in Introns bekannter Gene (TUB-2, β -Tubulin-Gen; TgM-A, Myosin-A-Gen) oder in Expressed Sequence Tags (ESTs). MSs-Polymorphismen können mit Hilfe der PCR analysiert werden. Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Primern werden Fragmente der Mikrosatelliten-Regionen amplifiziert und ihre jeweilige Größe durch Kapillarelektrophorese bestimmt. Durch Sequenzierung können auch die SNPs innerhalb der MSs sowie in den flankierenden Regionen identifiziert werden (Ajzenberg, Banuls et al. 2002, Ajzenberg, Dumetre et al. 2005, Ajzenberg, Collinet et al. 2010). Es wurde auch eine Multiplex-PCR für 15 MSs Marker entwickelt, die es ermöglicht, gleichzeitig mehrere Loci zu amplifizieren (Ajzenberg, Collinet et al. 2010). Die Genotypisierungsergebnisse der MSs-Analyse korrelieren eng mit den Ergebnissen der Multilocus PCR-RFLP-Typisierung (Ajzenberg, Banuls et al. 2002). Jedoch weisen MSs mehr Polymorphismen auf als SNP-Marker. Daher kann mit dieser Methode die *T. gondii*-Populationsstruktur mit einer höheren Auflösung untersucht werden (Ajzenberg, Collinet et al. 2010).

3.11.4 RAPD-PCR

Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) ist ein Verfahren, bei dem einzelne polymorphe DNA-Regionen von *T. gondii* mit zufällig ausgewählten Primern vervielfältigt werden. Bei der RAPD-PCR werden kurze Primer mit einer Länge von 8–12 Nukleotiden verwendet, deren Sequenz zufällig generiert wurde. Die mit Hilfe dieser Primer amplifizierten Produkte, weisen im günstigsten Fall individuelle Bandenmuster in der Elektrophorese auf, die es erlauben, unterschiedliche Genotypen von *T. gondii* zu unterscheiden. Diese Methode wurde bereits zur Charakterisierung von Maus-virulenten und -avirulenten *T. gondii*-Stämmen verwendet (Guo und Johnson 1995, Guo, Groß et al. 1997, Ferreira Ade, Vitor et al. 2004). Allerdings weist die Methode eine geringe Reproduzierbarkeit auf, was zu Schwierigkeiten in der Analyse von Testergebnissen führte (Ferreira Ade, Vitor et al. 2004).

3.11.5 Serotypisierung

Für die molekulare Typisierung von *T. gondii* ist eine relativ große Menge an Parasiten-DNA erforderlich, die selbst bei klinisch apparenten Toxoplasmosen oft nur schwer oder in unzureichender Konzentration gewonnen werden kann. Für manche Verfahren ist es daher erforderlich, den Parasiten vor der Genotypisierung *in-vitro* zu isolieren, da die DNA-Konzentration im infizierten Gewebe zu gering ist oder die Wirtszell-DNA die Analyse (z.B. Sequenzierungen) unmöglich macht. Um einen Zusammenhang zwischen dem *T. gondii*-Typ und den klinischen Erscheinungen einer Infektion feststellen zu können, ist es aber für den Erfolg von epidemiologischen Untersuchungen entscheidend, solche Infektionen nicht nur bei möglichst vielen Patienten, sondern auch bei gesunden, aber infizierten Individuen typisieren zu können. Daher wurde versucht, Tests für die serologische Typisierung von *T. gondii*-Infektionen zu entwickeln (Kong, Grigg et al. 2003, Peyron, Lobry et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Sousa, Canada et al. 2010).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass typspezifische Polymorphismen innerhalb der verschiedenen klonalen *T. gondii*-Linien relativ selten sind. Auf Aminosäure-Ebene gibt es zwischen den drei klonalen Linien Unterschiede von ca. 1-3%, wobei diese - wie oben bereits erwähnt - oft einen bi-allelischen Charakter aufweisen (Kong, Grigg et al. 2003). In Studien an Mausmodellen wurden von Parmley et al. (1994) und Kong et al. (2003) gezeigt, dass polymorphe Regionen von *T. gondii*-Antigenen immunogen, manche sogar immundominant sein können, und dass daher die humorale Immunantwort gegen eine *T. gondii*-Infektion typspezifisch sein kann (Parmley, Groß et al. 1994, Grigg, Bonnefoy et al. 2001, Kong, Grigg et al. 2003). Die begrenzte Anzahl klonaler Linien, die innerhalb dieser Linien geringe Anzahl unterschiedlicher Allele und die gegen polymorphe Epitope von *T. gondii*-Antigenen gerichtete Antikörperantwort ermöglichte in Nordamerika und Europa eine Serotypisierung. In Südamerika, wo es eine deutlich größere Diversität von *T. gondii* gibt und wo neben stärker klonalen auch weniger klonale Linien existieren, wäre es ungleich schwieriger und eventuell sogar unmöglich, eine Serotypisierung zu etablieren, die zwischen klonalen Linien unterscheiden kann.

Bislang wurden insgesamt 66 Peptidsequenzen veröffentlicht, die polymorphe typspezifische Regionen der *T. gondii* Antigene enthalten (Kong, Grigg et al. 2003, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Xiao, Buka et al. 2009). Für die Serotypisierung wurden auch sechs rekombinante Proteine (Polypeptide) eingesetzt, die polymorphe Abschnitte der Dichte-Granula-Antigene GRA5 und GRA6 beinhalten (Peyron, Lobry et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008). Insgesamt zeigten mehreren Studien zur *T. gondii*-Serotypisierung, dass es erforderlich ist,

mehrere polymorphe, gut definierte Peptide in einem Verfahren einzusetzen, um die typspezifische Antikörper-Peptid-Signatur eines Serums mit ausreichender Sensitivität und Spezifität ermitteln zu können (Kong, Grigg et al. 2003, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Xiao, Buka et al. 2009). Allerdings wurden meist nur wenige typspezifische Peptide und rekombinante Proteine in epidemiologischen Studien zur Bestimmung des *T. gondii*-Typs bei natürlich-infizierten Menschen und Tieren verwendet (Kong, Grigg et al. 2003, Peyron, Lobry et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Xiao, Buka et al. 2009, Sousa, Canada et al. 2010).

Mit den publizierten ELISA-Systemen für die Serotypisierung war es grundsätzlich möglich, Typ-II-Infektionen von nicht Typ-II-Infektionen (I-III) zu unterscheiden. Xiao und Mitarbeiter (2009) veröffentlichten eine typspezifische GRA7-Peptid-Sequenz, die es gestattete, die Antikörper-Antwort Typ-III-infizierter Mäuse, nicht aber die Typ-I-infizierter Mäuse nachzuweisen. Dieses Peptid schien auch in der Lage zu sein, Typ-III-Infektionen beim Menschen zu identifizieren.

3.12 Verfahren für die serologische Diagnose von *T. gondii*-Infektionen

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin gibt es zahlreiche Testsysteme, die für die serologische Diagnose von *T. gondii*-Infektionen geeignet sind. Bei diesen handelt es sich zum Beispiel um Agglutinationstests, Immunosorbent-Agglutination-Assays (ISAGA), Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA), Enzyme-Linked-Fluorescence-Assays (ELFA), Immunfluoreszenstests (IFT), Chemiluminescence Assays (CLIA), verschiedene Immunoblots, den Sabin-Feldman-Test und den Peptid-Mikroarray. In den aufgezählten Nachweismethoden werden ganze Tachyzoiten, Tachyzoiten-Antigenextrakte, einzelne aufgereinigte, native oder rekombinante Tachyzoitenantigene oder synthetische Peptide verwendet.

Der Sabin-Feldman-Test (SFT) ist ein sehr sensitives Nachweisverfahren, das oft zur serologischen Diagnose humaner Toxoplasmosen eingesetzt wurde. In diesem Test werden lebende Tachyzoiten als Antigene zur Detektion von *T. gondii*-spezifischem IgG und IgM verwendet. Da der Test sehr zeitintensiv ist und ein potentiell Infektionsrisiko für das Laborpersonal darstellt, wird er inzwischen nur noch als „Referenzstandard“ bei der Validierung anderer diagnostischer Nachweismethoden eingesetzt (Alexander, Janitschke et al. 1971, Saathoff, Reiter-Owona et al. 1999).

Der IFT wird sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin für die Diagnose sowie als „Referenzstandard“ für die Validierung anderer diagnostischer Nachweisverfahren

genutzt. Die Resultate des IFT und SFT zeigen eine gute Übereinstimmung (Ozkan, Celebi et al. 2008).

Zu den Agglutinationstests gehören mehrere Verfahren, die auf dem Agglutinationsprinzip aufgebaut sind. Der Latex Agglutinationstest (LAT) wird meist in der Humanmedizin angewendet. Dieser Test zeigt eine hohe Sensitivität und eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Als Antigen werden in diesem Test native lösliche Tachyzoitenantigene oder rekombinante Varianten dieser Antigene verwendet, die an Latexpartikel gekoppelt sind (Woldemichael, Fontanet et al. 1998, Dawoud, Ageely et al. 2009).

Der direkte Agglutinationstest (DAT) wird ebenfalls sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin zur *T. gondii*-Diagnose eingesetzt (Dubey 2010). Dubey und Kollegen haben den DAT modifiziert (Modifizierter Agglutinationstest oder kurz MAT) und häufig zum Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern bei Hühnern eingesetzt. Sowohl im DAT als auch im MAT werden formaldehydfixierte Tachyzoiten als Antigen verwendet (Dubey 2010).

Der ISAGA wird hauptsächlich in der Humanmedizin zum Nachweis von *T. gondii*-spezifischen IgM-, IgA- und IgG-Antikörper bei der Diagnose von humaner Toxoplasmose, insbesondere bei Frauen vor, während und nach der Schwangerschaft eingesetzt (Flori, Chene et al. 2009). Dieser Test ist ähnlich wie ein „Doppelsandwich“-ELISA aufgebaut. Die U-förmigen Wells werden mit monoklonalen Antikörpern beschichtet. Diese sind gegen entsprechende Antikörperisotype des Wirtes (z.B. IgM, IgA, oder IgG) gerichtet. Es wird das Wirtsserum oder Plasma aufgetragen, um entsprechende Antikörperisotypen zu detektieren. Mit Hilfe von formalinfixierten Tachyzoiten wird der Anteil an *T. gondii*-spezifischen Antikörpern bestimmt. Die Auswertung erfolgt wie bei den anderen Agglutinationstest-Verfahren (Skinner, Chatterton et al. 1989).

Zurzeit stehen viele unterschiedliche ELISA-Testsysteme zur serologischen Diagnose von *T. gondii* bei Menschen und Tieren zur Verfügung, die sich in den verwendeten Antigenen sowie in der Art und Weise der Test-Durchführung unterscheiden. Im Allgemeinen haben sich ELISA-Verfahren als sensitive und spezifische Nachweismethoden bewährt, allerdings hängt die diagnostische Sensitivität und Spezifität vom verwendeten Antigen ab (Sager, Gloor et al. 2003, Klun, Djurkovic-Djakovic et al. 2007, Garcia, Gennari et al. 2008, Hosseininejad, Azizi et al. 2009, Kotresha und Noordin 2010, Opsteegh, Teunis et al. 2010).

ELFA und CLIA sind dem ELISA System ähnlich. Der Unterschied zwischen diesen Tests ist die Markierung der Konjugate (Sekundäre Antikörper) und die dementsprechende Messung von Signalen (Crouch 1995, Rodrigues, Castro et al. 2009).

In mehreren Studien wurde auch von der Anwendbarkeit von Immunoblot- (Westernblot-) Techniken für den Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern bei Menschen und Tieren berichtet. Bei diesen Verfahren werden Tachyzoitenlysate, einzeln aufgereinigte, native oder rekombinante Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) auf Nitrozellulose- oder PVDF- (Polyvinylidenfluorid) Membranen transferiert und im Test als „Antigenfolie“ verwendet. Das Verfahren hat sich sowohl in der Humanmedizin, als auch in der Tiermedizin als sensitive und spezifische Methode zum Antikörpernachweis erwiesen (Groß, Roos et al. 1992, Wastling, Harkins et al. 1994, Yamamoto, Mineo et al. 1998, Geissler, Sokolowska-Köhler et al. 1999, Raffi, Franck et al. 1999, Garcia, Gennari et al. 2008).

Der Aufbau und die Anwendungsgebiete von Peptid-Mikroarray-Verfahren, die ebenfalls zur serologischen Diagnose eingesetzt werden können, werden in dem folgenden Kapitel detailliert beschrieben.

3.13 Peptid-Mikroarray

Für die Analyse von Antikörperprofilen im Serum eines Menschen oder eines Tieres stehen bei Infektionskrankheiten oder bei Krankheiten, die durch autoimmune oder allergische Reaktionen verursacht werden, viele Methoden zur Verfügung. In den meisten Verfahren werden immobilisierte Antigene verwendet, um die entsprechenden Antikörper im Serum nachzuweisen (siehe 3.12). Sollen multiple Antigen-Antikörper-Reaktionen in einer Probe untersucht werden, haben konventionelle Verfahren den Nachteil, dass ihre Durchführung sehr zeit- und materialaufwändig ist. Durch Protein- und Peptid-Mikroarray-Techniken ist es möglich, eine simultane und schnelle Analyse multipler Antigene oder deren Epitope durchzuführen (Andresen und Bier 2009).

Je nach Herstellungsverfahren werden Peptid-Mikroarrays in zwei Gruppen eingeteilt: i. *in-situ*-synthetisierte Peptid-Mikroarrays, oder ii. Peptid-Mikroarrays, bei denen die Peptide vorher synthetisiert und anschließend als Array auf eine Unterlage gedruckt („geprintet“) werden (Panicker, Huang et al. 2004).

Bei *in-situ*-Peptid-Mikroarrays werden die Peptide direkt auf dem Träger synthetisiert. Es gibt zwei verbreitete Methoden für diese *in-situ*-Verfahren: (a) Die Peptide werden direkt auf dem Träger mit Hilfe der SPOT-Methode (Reineke, Volkmer-Engert et al. 2001) hergestellt oder (b) die Peptide werden durch photolithografische Verfahren auf dem Träger gebunden (Pellois, Zhou et al. 2002, Gao, Zhou et al. 2003). Mit diesen Methoden ist es möglich, tausende unterschiedlicher Peptide auf einem Array gleichzeitig zu synthetisieren, allerdings

verursacht der hohe technische und materielle Aufwand beträchtliche Kosten bzw. erhöht den Preis pro Mikroarraychip.

Meist werden Peptid-Mikroarrays mit Hilfe einer „Printing“-Methode hergestellt. Im Unterschied zu den *in-situ*-hergestellten Peptid-Mikroarrays, werden hier vorher synthetisierte Peptide mit Hilfe von Mikroarray-Printern als nanolitergroße Tröpfchen auf Peptid-Mikroarray-Slides aufgebracht. Diese Methode hat den großen Vorteil, dass die erforderlichen Peptide nur einmal synthetisiert werden müssen und bei Bedarf weitere Peptid-Mikroarray-Slides „geprintet“ werden können. Es wurden mehrere unterschiedliche Methoden zur Herstellung von Peptid-Mikroarrays durch „Printing“-Verfahren entwickelt und beschrieben (MacBeath und Schreiber 2000, Falsey, Renil et al. 2001, Houseman und Mrksich 2002, Panicker, Huang et al. 2004).

In der Studie von Melnyk und Kollegen (Melnyk, Duburcq et al. 2002) wurde ein Peptid-ELISA mit entsprechenden Peptid-Mikroarrays verglichen; die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine deutlich höhere Sensitivität des Peptid-Mikroarray-Systems gegenüber dem Peptid-ELISA.

Peptid-Mikroarrays werden in breiten Anwendungsgebieten z. B. bei der Enzym-Substrat-Forschung, Peptid-Protein-Interaktionen, Epitopenalyse, Peptid-DNA-Interaktion oder bei der Diagnose von infektiösen Krankheiten eingesetzt (Panicker, Huang et al. 2004, Schutkowski, Reineke et al. 2005, Nahtman, Jernberg et al. 2007, Tapia, Bongartz et al. 2007, Gaseitsiwe, Valentini et al. 2008, Gaseitsiwe, Valentine et al. 2009, Lorenz, Kreutzer et al. 2009, List, Qi et al. 2010).

Mezzasoma und Kollegen (Mezzasoma, Bacarese-Hamilton et al. 2002) berichteten über die Anwendung von *T. gondii*-Tachyzoitenlysate als Antigen auf dem Mikroarray-Slide. In einer anderen Studie wurden 1357 rekombinante Proteine, die basierend auf *T. gondii*-Exonsequenzen hergestellt worden waren, auf ihre Antigen-Eigenschaften im Protein-Mikroarray untersucht (Liang, Doskaya et al. 2011).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmalig ein Peptid-basierter Mikroarray zur Analyse der *T. gondii*-spezifischen Antikörper (IgG) bei Menschen und Katzen entwickelt und angewendet (Maksimov, Zerweck et al. 2012).

3.14 Bioinformatische Vorhersage immunreaktiver B-Zell-Epitope

Die Ermittlung und Charakterisierung von B-Zell-Epitopen in einem Antigen ist ein wichtiger Aspekt für die Epitop-basierte Impfstoffentwicklung, die Entwicklung und Etablierung von diagnostischen Antikörpernachweisverfahren und für die Antikörperproduktion. B-Zell-Epitope können in zwei Gruppen eingeteilt werden: i. lineare und ii. konformationelle Epitope (Roggen 2006, El-Manzalawy und Honavar 2010). Lineare Epitope sind Peptide mit kurzen Aminosäuresequenzen (ca. 8-20 AS), während konformationelle Epitope aus nicht sequenziellen Aminosäuren bestehen, die durch Proteinfaltung nahe beieinander liegen, so dass diese für Paratope zugänglich sind (Van Regenmortel 2009).

Für die Vorhersage potentieller Antikörper-Epitope von Proteinen stehen zurzeit mehrere Methoden zur Verfügung. Die Methoden werden wie folgend aufgeteilt: i. Vollantigen-Methode, ii. „Peptide Library“-Methoden, iii. Profiling von Antikörpersignaturen in biologischen Flüssigkeiten, iv. Antigenexpression aus rekombinanter DNA, v. Vorhersage der B-Zell-Epitope (Reineke und Schutkowski 2009). Allerdings sind die meisten davon (i, ii, iii und iv) kosten- und/oder zeitintensiv. Eine Vorhersage mittels bioinformatischer Modelle (v) ist daher eine alternative und eventuell eine kostengünstigere Methode zur Bestimmung von Epitopen.

In den letzten 30 Jahren wurden zahlreiche Algorithmen zur Epitopvorhersage beschrieben (Roggen 2006, El-Manzalawy und Honavar 2010). Obwohl B-Zell-Epitope mehrheitlich konformationell sind (ca. 90%) (Barlow, Edwards et al. 1986, Walter 1986), wurden die meisten bioinformatischen Verfahren für die Bestimmung linearer Epitope entwickelt.

Die ersten Algorithmen wurden auf einer so genannten „propensity scale“ der Aminosäuren in der Protein-Sequenz aufgebaut. Dabei wird aus der Beziehung zwischen spezifischen chemisch-physikalischen Eigenschaften jeder Aminosäure die Neigung („propensity“) einer Proteinsequenz berechnet, Antigen-Eigenschaften zu besitzen, um potenzielle lineare Epitope auf Proteinen zu identifizieren. Es gibt zahlreiche „propensity scale“-Algorithmen, die auch in Kombinationen dazu herangezogen werden können, um die unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften von Aminosäuren in die Epitopvorhersage einbeziehen zu können (Hopp und Woods 1981, Kyte und Doolittle 1982, Emini, Hughes et al. 1985, Parker, Guo et al. 1986, Jameson und Wolf 1988, Saha und Raghava 2007, El-Manzalawy und Honavar 2010). Allerdings scheint die Vorhersage linearer Epitope mit Hilfe von „propensity scale“-Algorithmen nur marginal besser zu sein als die zufällige Selektion (Blythe und Flower 2005). Es gibt zahlreiche Studien zur Verbesserung dieser Epitopvorhersagemodelle. Ein Beispiel ist BepiPred (Larsen, Lund et al. 2006), ein

Algorithmus, der auf der Basis des Hidden-Markov-Modells (HMM) und einer die hydrophilen Eigenschaften von Aminosäuren berücksichtigenden „propensity scale“ entwickelt wurde (Parker, Guo et al. 1986). Die Ergebnisse der Analyse eines Datensatzes von 14 Proteinen und 83 Epitopen mit dieser Methode weisen keine erhebliche, aber eine statistisch signifikant bessere Epitopvorhersage im Vergleich zu klassischen Algorithmen auf (Levitt 1976, Parker, Guo et al. 1986, El-Manzalawy und Honavar 2010).

Ein weiterer Fortschritt in der Vorhersage linearer Antikörper-Epitope war die Anwendung neuronaler Netzwerke, so genannter „machine learning“ Methoden. Es gibt heutzutage mehrere Verfahren zur Vorhersage linearer Epitope, die auf neuronalen Netzwerken aufgebaut sind (Saha und Raghava 2006, Sollner und Mayer 2006, Sweredoski und Baldi 2009). Reimer und Kollegen (2009) haben ein auf neuronalen Netzwerken gründendes Verfahren (ABCpred) mit einem optimierte „propensity scale“ nutzenden Verfahren (BepiPred) verglichen. Das Ergebnis war, dass BepiPred eine bessere Spezifität (d.h. wenige falsch-positive Vorhersagen) zeigte, während ABCpred deutlich sensitiver war (d.h. mehr Epitope vorhersagte) (Reineke und Schutkowski 2009).

Die Tatsache, dass die Mehrheit der Epitope konformationell ist, initiierte die Entwicklung von weiteren bioinformatischen Methoden zur Vorhersage dieser Epitope. Die Methoden kann man grob in zwei Gruppen einteilen: i. proteinsequenzbasierte Verfahren und ii. proteinstrukturbasierte Verfahren.

Sequenzbasierte Algorithmen haben den Vorteil, dass keine Informationen über die Struktur eines Proteins benötigt werden. Die Struktur bzw. konformationelle Epitope können in diesem Fall mit Hilfe von „propensity scale“-Algorithmen (Haste Andersen, Nielsen et al. 2006) oder mit Hilfe von „machine learning“ Methoden (Yan, Dobbs et al. 2004, Chen, Zhou et al. 2006, El-Manzalawy und Honavar 2010) ermittelt werden. Für strukturbasierte Algorithmen sind Informationen über die Proteinstruktur, d.h. so genannte „PDB-Files“, erforderlich, die mit Hilfe von röntgenkristallografischer Untersuchungen an Protein-Antikörper-Komplexen erstellt wurden (Joosten und Vriend 2007, Joosten, Womack et al. 2009, Joosten, te Beek et al. 2011). Zurzeit gilt diese als die genaueste Methode für die Vorhersage konformationeller Epitope (Reineke und Schutkowski 2009, El-Manzalawy und Honavar 2010). Es gibt mehrere Verfahren (CEP, ElliPro, DiscoTope etc.), die zur Ermittlung konformationeller Epitope eingesetzt werden können (Kulkarni-Kale, Bhosle et al. 2005, Haste Andersen, Nielsen et al. 2006, Rapberger, Lukas et al. 2007, Ponomarenko, Bui et al. 2008). Allerdings stehen nur für wenige Proteine „PDB-Files“ zur Verfügung, da die Durchführung der Röntgenkristallografie zeit- und kostenaufwändig ist.

4 Publikationen

4.1 Publikation 1

Peptide microarray-based serologic strain-typing of *Toxoplasma gondii* in infected humans from Germany

Peptid-Mikroarray-basierte serologische Typisierung von *Toxoplasma gondii*-Infektionen des Menschen in Deutschland

Publiziert in PLoS-ONE 7(3): e34212; DOI: 10.1371/journal.pone.0034212

Eingegangen: 01.11.2011

Angenommen: 28.03.2012

Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Kapitel 8.1

4.1.1 Zusammenfassung der Publikation 1 (Übersetzung des Abstrakts der Originalpublikation)

Hintergrund: Es gibt Hinweise, dass unterschiedliche klonale Typen von *Toxoplasma gondii* zu unterschiedlichen Ausprägungen einer Toxoplasmose beim Menschen führen können. Serotypisierung ist eine neue Methode zur Bestimmung des klonalen Typs von *T. gondii*, mit dem ein Mensch infiziert ist. Diese wird es erlauben, auf breiterer Basis Untersuchungen zum Vorkommen bestimmter klonaler *T. gondii*-Typen sowohl bei klinisch erkrankten als auch bei latent-infizierten Individuen durchzuführen.

Methode: Als Serotypisierungs-Test wurde ein Peptid-Mikroarray verwendet, der mit 54 bereits etablierten Peptiden ausgestattet war, die *T. gondii*-Typ-spezifische Epitope enthielten. Im Peptid-Mikroarray wurden Seren von *T. gondii* serologisch-positiven Personen (n=174) mit akuter Toxoplasmose (n=21), latenter *T. gondii*-Infektion (n=53) und von *T. gondii*-serologisch-positiven Waldarbeitern (n=100) untersucht.

Ergebnisse: Die Mehrheit (n=124; 71%) der *T. gondii*-positiven Seren zeigte eine positive Reaktivität mit Typ-II-spezifischen Peptiden. Typ-I- und Typ-III-spezifische Peptide wurden von 42% (n=73) bzw. 16% (n=28) der untersuchten *T. gondii*-positiven Humansenen erkannt. Typ II-III, I-III, oder I-II spezifische Peptide wurden von 49% (n=85), 36% (n=62) bzw. 14%

(n=25) der Seren erkannt. Die meisten der *T. gondii*-positiven Humanseren zeigten die höchsten Reaktionswerte mit Peptiden, die eine Typ-II-spezifische Aminosäuresequenz aufwiesen. Ein Teil der *T. gondii*-positiven Seren (n=22; 13%) reagierte mit keinem der Peptide. Individuen mit einer akuten Toxoplasmose erkannten eine statistisch signifikant höhere Anzahl an Peptiden als Individuen mit einer latenten *T. gondii*-Infektion oder serologisch positive Waldarbeiter.

Schlussfolgerung: Typ-II-spezifische Peptidreaktionen waren überrepräsentiert und wiesen die höchste Intensität auf. Frühere Untersuchungen zur Bestimmung des Genotyps von *T. gondii*-Oozysten zeigten, dass hauptsächlich *T. gondii* des klonalen Typs II in Deutschland vorkommen. Die Ergebnisse unserer Studie stimmten mit diesen Genotypisierungsergebnissen aus Deutschland überein. Um einen Serotypisierungstest mit höherer Auflösung zu entwickeln, sind gut charakterisierte Referenzseren und weitere Typ-spezifische Peptid-Marker erforderlich.

4.2 Publikation 2

Peptide microarray analysis of *in silico*-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans

Peptid-Mikroarray-Analyse *in-silico*-vorhergesagter Epitope für die serologische Diagnose einer *Toxoplasma gondii*-Infektion bei Menschen

Publiziert in Clinical and Vaccine Immunology 2012, 19(6):865; DOI: 10.1128/CVI.00119-12.

Eingegangen: 21.02.2012

Angenommen: 04.04.2012

Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Kapitel 8.2

4.2.1 Zusammenfassung der Publikation 2 (Übersetzung des Abstrakts der Originalpublikation)

Toxoplasma gondii-Infektionen kommen bei Menschen und Tieren weltweit vor. Bei immunsupprimierten und pränatal-infizierten Menschen kann *T. gondii* schwere klinische Symptome hervorrufen. Das Identifizieren spezifischer Epitope auf *T. gondii*-Antigenen ist für die Verbesserung und Standardisierung der serologischen Diagnose von *T. gondii*-Infektionen essentiell.

Mit Hilfe des bioinformatischen Programms ABCpred selektierten wir 20 Peptidsequenzen aus vier *T. gondii*-Antigenen (GRA1, GRA2, GRA4 und MIC3) mit potentiellen linearen B-Zell-Epitopen. Weitere 18 Peptidsequenzen, die bereits veröffentlichte Epitope der *T. gondii*-Antigene GRA1, SAG1, NTPase1 und NTPase2 enthielten, wurden in unsere Studie mit einbezogen.

Um das diagnostische Potential der ausgewählten Peptide zu prüfen, wurde ein Peptid-Mikroarray etabliert, in dem Seren von serologisch *T. gondii*-positiven Individuen (n=184) mit einer akuten *T. gondii*-Infektion (n=21), mit einer latenten Toxoplasmose (n=53), mit einer inaktiven okulären Toxoplasmose (n=10) und *T. gondii*-serologisch-positiver Waldarbeiter (n=100) untersucht wurden. Um einen individuellen Schwellenwert für jedes Peptid festzulegen, wurden Seren von *T. gondii*-serologisch-negativen Waldarbeitern (n=75) und Patienten (n=65) eingesetzt.

Die univariate logistische Regressionsanalyse deutete auf ein statistisch signifikantes, diagnostisches Potential von acht neuen, bioinformatisch ausgewählten, und zweier bereits publizierter Peptide hin. Ein Test, der auf diesen acht Peptiden basierte, wies eine diagnostische Sensitivität von 69% (100% bei Patienten mit okulärer Toxoplasmose, 86% bei akut mit *T. gondii* infizierten Patienten, 81% bei latent mit *T. gondii* infizierten Patienten und 57% in *T. gondii*-serologisch-positiven Waldarbeitern) auf. Die Analyse der Reaktivität mit dem Peptid-Panel von *T. gondii*-serologisch-negativen Seren zeigte eine diagnostische Spezifität von 84%.

Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Anwendung von bioinformatischen Verfahren für die Epitopvorhersage zusammen mit Peptid-Mikroarrays eine hilfreiche Methode zur Selektion *T. gondii*-spezifischer Epitope als Antigen-Kandidaten für die serologische Diagnose von Toxoplasmosen ist.

4.3 Zur Veröffentlichung vorgesehenes Manuskript

Serotyping of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis silvestris catus*) reveals predominance of type II infections in Germany

Die serologische Typisierung von *Toxoplasma gondii*-Infektionen bei Hauskatzen (*Felis silvestris catus*) zeigte eine Dominanz der Typ-II-Infektionen in Deutschland

Eingereicht bei dem Journal: PLoS-ONE

Das vollständige Manuskript befindet sich im Kapitel 8.3

4.3.1 Zusammenfassung des Manuskriptes (Übersetzung des Abstrakts des Originalmanuskriptes)

Hintergrund: Katzen sind Endwirte von *Toxoplasma gondii* und spielen eine essentielle Rolle in der Epidemiologie dieses Parasiten. Bislang gab es keine Informationen, ob Katzen in der Lage sind, eine *T. gondii*-spezifische Antikörperantwort gegen die klonalen Typen des Protozoons zu bilden. Es war auch nicht bekannt, ob es möglich ist, eine Serotypisierung durchzuführen, um die Prävalenz dieser *T. gondii*-Typen in Katzen als Zwischenwirten in Deutschland bestimmen zu können.

Methode: Um einen Peptid-Mikroarray-basierten Serotypisierungstest zu etablieren, wurden 27 für die Serotypisierung geeignete Peptide identifiziert und selektiert. Diese Peptide wurden mit Hilfe *T. gondii*-positiver Katzenreferenzseren (n=21), bei denen der *T. gondii*-Infektionstyp bekannt war, und *T. gondii*-serologisch-negative Katzenserren (n=52) identifiziert und validiert.

Für die Serotypisierung der *T. gondii*-Infektionen bei Katzen aus Deutschland wurden 86 Seren von *T. gondii*-serologisch-positiven, natürlich-infizierten Katzen aus Deutschland im Peptid-Mikroarray untersucht. Zusätzlich wurde die typspezifische Antikörperantwort bei Katzen (n=7) untersucht, die experimentell mit atypischen *T. gondii*-Typen infiziert worden waren.

Ergebnisse: Seren der Katzen, bei denen bekannt war, dass sie mit einem der drei kanonischen *T. gondii*-Typen infiziert waren, zeigten die statistisch signifikant höchsten Reaktionswerte mit solchen Peptiden, die eine zum Infektionstyp homologe Spezifität aufwiesen. Positive Reaktionen mit zum Infektionstyp homologen Peptiden waren statistisch signifikant überrepräsentiert. Die Untersuchung von Katzenfeldseren aus Deutschland zeigte, dass 97,7% (84/86) der natürlich-infizierten Katzen ähnliche Peptidreaktionsmuster

mit Typ-II-spezifischen Peptiden aufwiesen. Außerdem kamen Typ-II-spezifische positive Peptidreaktionen signifikant häufiger vor als positive Peptidreaktionen einer anderen klonalen Spezifität. Eine Analyse der erkannten Peptid-Muster zeigte, dass natürlich infizierte Katzen aus Deutschland und Katzen, von denen bekannt war, dass sie mit *T. gondii* vom Typ II infiziert waren, ähnliche Peptidmuster erkannten. Katzen, die mit nicht-kanonischen *T. gondii*-Typen infiziert waren, zeigten die stärksten Reaktionswerte mit Typ I/III-spezifischen Peptiden.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass Katzen in der Lage sind, eine typspezifische Antikörperantwort gegen *T. gondii* zu entwickeln. Die Serotypisierung *T. gondii*-serologisch-positiver Katzenfeldseren zeigte, dass die meisten Tiere eine *T. gondii*-Typ-II-Infektion aufwiesen. Somit stimmen die Ergebnisse dieser Studie mit den Serotypisierungsergebnissen bei humanen *T. gondii*-Infektionen in Deutschland und den Genotypisierungsergebnissen bei *T. gondii*-Oozysten aus dem Kot von Katzen aus Deutschland überein.

5 Übergreifende Diskussion

Die meisten *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Tieren verlaufen latent oder subklinisch; jedoch wird geschätzt, dass ca. 20% der latent-infizierten Individuen zumindest vorübergehend Symptome einer klinischen Toxoplasmose zeigen (Kijlstra und Jongert 2008). Eine Infektion der Mutter mit *T. gondii* kann zur kongenitalen Toxoplasmose bei Föten und Neugeborenen führen (Montoya und Liesenfeld 2004). 30-50% der Fälle einer *Uveitis posterior* werden einer *T. gondii*-Infektion zugeschrieben. Die okuläre Toxoplasmose des Menschen stellt eine potenzielle postnatale Komplikation der kongenitalen Toxoplasmose dar, wird aber auch nach postnataler Exposition beschrieben (Villard, Filisetti et al. 2003, Weiss und Dubey 2009).

Trotz der einfachen Populationsstruktur in Nordamerika und Europa und des geringen genetischen Unterschiedes zwischen den in dieser Region dominierenden klonalen Linien gibt es Hinweise dafür, dass unterschiedliche klinische Manifestationen der Toxoplasmose mit bestimmten *T. gondii*-Genotypen in Verbindung stehen könnten (Gilbert, Freeman et al. 2008, Ajzenberg 2012, McLeod, Boyer et al. 2012). Daher kann es in der Zukunft wichtig sein, durch eine frühzeitige Diagnose und Typisierung einer *T. gondii*-Infektion eine bessere Prognose des Krankheitsverlaufs abzugeben, auch um eine möglichst effiziente Therapie auswählen zu können.

Bislang wurden Daten zu den beim Menschen und Tieren vorkommenden Genotypen hauptsächlich mit Hilfe DNA-basierter Verfahren gewonnen (Ajzenberg, Dumetre et al. 2005, Ajzenberg, Yera et al. 2009, Aubert, Ajzenberg et al. 2010). Parasiten-DNA steht jedoch häufig nur *post mortem* und auch dann oft nicht in ausreichender Menge für eine Genotypisierung zur Verfügung.

Die Serotypisierung ist eine alternative Methode, um zu ermitteln, mit welchen der drei in Nordamerika und Europa dominierenden klonalen Typen von *T. gondii* Menschen und Tiere infiziert sind (Kong, Grigg et al. 2003, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Canada et al. 2010).

Kong et al. (2003) berichtete, dass Mäuse und Menschen in der Lage sind, *T. gondii*-typspezifische Antikörper (IgG) zu bilden. Dabei wurden mit Hilfe von Seren von Mäusen und Menschen, für die der Infektionstyp von *T. gondii* bekannt war, polymorphe Klonotypspezifische Peptide identifiziert, mit denen der *T. gondii*-Typ, welcher der Infektion zugrunde

lag, indirekt im Peptid-ELISA bestimmt werden konnte (Kong, Grigg et al. 2003). In jüngerer Zeit wurden auf diesen polymorphen Peptiden basierende ELISA eingesetzt, um in verschiedenen Regionen der Welt Infektionen mit dem klonalen Typ II von solchen mit nicht-Typ-II-*T. gondii* zu unterscheiden (Kong, Grigg et al. 2003).

Bis zu den im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Arbeiten gab es keine Informationen zur Verbreitung bestimmter *T. gondii*-Genotypen bei latent- und akut-infizierten Menschen in Deutschland. Weiterhin lagen bislang weltweit keine veröffentlichten Informationen über eine typspezifische Antikörperantwort als Basis für eine Serotypisierung bei Katzen gegen *T. gondii* vor, obwohl Katzen als Endwirte eine essentielle Rolle in der Epidemiologie der *T. gondii*-Infektion spielen.

Über das Vorkommen bestimmter *T. gondii*-Genotypen bei Katzen in Deutschland stehen wenige Daten zur Genotypisierung von *T. gondii*-Oozysten im Katzenkot zur Verfügung (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010). Der geringe Umfang der verfügbaren Daten rührt daher, dass Katzen nach der Infektion nur kurzzeitig Oozysten mit dem Kot ausscheiden und dass sehr viele Katzen untersucht werden müssen, um eine nennenswerte Anzahl an Oozysten für die Genotypisierungen zu erhalten. Außerdem war bislang nicht bekannt, ob Peptid-Mikroarrays ein geeignetes System zur serologischen Diagnose und Serotypisierung von *T. gondii*-Infektionen sein könnten.

Eine auf der spezifischen Antikörper-Antwort basierende Typisierungsmethode (Serotypisierung) kann aufgrund des leichter zu beschaffenden Untersuchungsguts (Serum) einen umfassenderen Einblick in die Verbreitung von *T. gondii*-Typen liefern als dies mit der Genotypisierung möglich ist, da letztere aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Parasiten-DNA nur begrenzt einsetzbar ist und nur bei Proben angewendet werden kann, die den Parasiten in ausreichender Konzentration enthalten (Proben klinisch erkrankter Menschen und Tiere, Kotproben von Katzen in der nur kurzzeitigen Patenz).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals ein Peptid-Mikroarray-basiertes Serotypisierungsverfahren aufgebaut und eine serologische Typisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Katzen in Deutschland durchgeführt. Des Weiteren wurde die Einsatzfähigkeit von Peptid-Mikroarrays und bioinformatischen Programmen zur Vorhersage potentieller Antikörper-Epitope in Antigenen von *T. gondii* zur Serotypisierung und zur serologischen Diagnose von *T. gondii*-Infektionen geprüft.

5.1 Serotypisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Katzen in Deutschland

Aus wenigen, bereits längere Zeit zurückliegenden Studien liegen Daten zur Seroprävalenz von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen in Deutschland vor (Groß 2004). Aktuelle Daten stehen nicht zur Verfügung. Laut Untersuchungen von Friese et al. (1994) und Roos et al. (1993) wurden *T. gondii* spezifische Antikörper bei 26-54% der schwangeren Frauen in Westdeutschland und 68-72,8% in Nordostdeutschland festgestellt (Krausse, Straube et al. 1993, Roos, Martius et al. 1993, Friese, Weigel et al. 1994, Groß 2004). Janitschke et al. (2003) berichteten, dass 70,7% (53/75) der Patienten für Knochenmarktransplantationen in Deutschland positive Antikörperreaktionen gegen *T. gondii* aufwiesen (Janitschke, Held et al. 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 563 Seren von Waldarbeitern aus dem Bundesland Brandenburg auf *T. gondii*-spezifische Antikörper in einem Latex-Agglutinationstest und TgSAG1-Immunoblot untersucht. Überraschenderweise fanden sich bei 84% (476/563) der untersuchten Waldarbeiter *T. gondii*-spezifische Antikörper (Publikation 1). Die bislang höchste *T. gondii*-Seroprävalenz (76%) wurde im Zeitraum von 1986 bis 1990 in Nordostdeutschland bei schwangeren Frauen berichtet. Im Laufe dieser Untersuchungsperiode sank die Prävalenz von 76% auf 68% (Krausse, Straube et al. 1993).

Wir beobachteten, dass die Seroprävalenz proportional zum Alter der Waldarbeiter anstieg. Unsere Arbeit bestätigte damit die Ergebnisse anderer Studien, dass der Anteil *T. gondii*-positiver Befunde stark davon abhängt, in welcher Altersgruppe sich die Untersuchten befinden (Groß 2004, Diza, Frantzidou et al. 2005, Abu-Madi, Al-Molawi et al. 2008). Dennoch ist - unabhängig vom Alter - die Gesamtseroprävalenz gegenüber *T. gondii* bei Waldarbeitern höher als die, welche in Deutschland bei anderen Bevölkerungsgruppen gefunden wurde (Krausse, Straube et al. 1993, Groß 2004). Auch in einer Studie mit 784 Waldarbeiter aus dem Nordosten Polens wurden bei 62,5% (490/784) der Untersuchten *T. gondii*-spezifische IgG-Antikörper und nur bei 3,7% (18/490) *T. gondii*-spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen (Holec-Gasior, Stanczak et al. 2008). Die relativ hohen Seroprävalenzen bei Waldarbeitern könnten durch eine stärkere Umwelt-Exposition gegenüber *T. gondii*-Oozysten im Arbeitsumfeld erklärt werden (Holec-Gasior, Stanczak et al. 2008). Andere mögliche Ursachen für die relativ hohe Seroprävalenz könnten in bestimmten Essgewohnheiten (z.B. häufigeres Verzehren von Rohfleischprodukten) oder im Hygieneverhalten der Gruppe (z. B. der Verzehr von ungewaschenem Obst und/oder Gemüse) zu finden sein. Weitere epidemiologische Untersuchungen in Deutschland wären

notwendig, um einen besseren Überblick über weitere Bevölkerungsgruppen zu erhalten, die einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind.

Die Verfügbarkeit definierter Seren von Menschen und Tieren, für die der Genotyp der *T. gondii* bekannt ist, mit dem diese infiziert sind, ist eine wichtige Bedingung für die Entwicklung eines Tests zur serologischen Typisierung. Aufgrund des Mangels an gut definierten Seren infizierter Menschen wurden in vorangegangenen Studien zur Serotypisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen Seren von experimentell-infizierten Mäusen für die Validierung der Peptide eingesetzt (Kong, Grigg et al. 2003). Ausgehend von diesen bereits für die Serotypisierung evaluierten Peptiden etablierten wir einen Peptid-Mikroarray-Test, der zur Serotypisierung einer Sammlung von Seren *T. gondii*-serologisch positiver Waldarbeiter (n=100) und Patienten (n=85) aus Deutschland verwendet wurde (Publikation 1). Dabei wurde für jedes Peptid ein individueller Schwellenwert mit Hilfe der Reaktionswerte von 140 *T. gondii*-seronegativen Humansenen festgelegt, um für jedes Peptid mindestens eine diagnostische Spezifität von 96% sicherzustellen.

Für die Entwicklung eines ersten Serotypisierungstests für Katzen hatten wir die Möglichkeit, auf Seren experimentell infizierter Tiere zurückgreifen zu können, bei denen der Genotyp von *T. gondii* bekannt war, mit dem diese Tiere infiziert waren.

Es ist bekannt, dass *T. gondii*-Infektionen bei Katzen meist eine starke Antikörperantwort gegen Tachyzoiten- und Bradyzoiten-spezifische Antigene induzieren (Dubey 2010).

Insgesamt wurden 101 Peptide, basierend auf polymorphen, typspezifischen Regionen in *T. gondii*-Proteinantigenen auf ihre Einsatzfähigkeit in einem Test zur serologischen Typisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Katzen geprüft. Für die Validierung bzw. Selektion der für die Serotypisierung geeigneten Peptide wurden Seren von experimentell infizierten Katzen und ein Serum einer Katze, bei der die *T. gondii*-Infektion genotypisiert worden war, sowie Seren von *T. gondii*-serologisch-negativen Katzen eingesetzt. Insgesamt 27 von 101 untersuchten Peptiden wiesen in der ROC-Analyse AUC-Werte von $\geq 0,7$ auf und wurden von den Katzenreferenzseren typspezifisch erkannt. 18 von 27 Peptiden wurden aus Publikationen anderer Arbeitsgruppen entnommen und neun weitere stammten aus einer Gruppe von 47 Peptiden, auf denen potentielle Epitope bioinformatisch vorhergesagt worden waren. Für jedes Peptid wurde mit Hilfe der ROC-Analyse ein individueller Schwellenwert festgelegt, um eine maximale Sensitivität und Spezifität erreichen zu können (Manuskript 3). Auffällig war, dass ein Teil der Peptide aus unserem für die Serotypisierung selektierten Peptid-Panel von einer anderen Arbeitsgruppe bereits als geeignet für die Serotypisierung einer *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Mäusen beschrieben worden war (Kong, Grigg

et al. 2003). Das deutet darauf, dass bestimmte Peptide eine Spezies-übergreifende Eignung für die Serotypisierung aufweisen. Es kann vermutet werden, dass sie sich nicht nur zur Typisierung bei den bislang untersuchten Spezies (Mensch, Maus und Katze), sondern auch bei anderen Zwischenwirten eignen.

In Studien anderer Arbeitsgruppen wurden *T. gondii*-Infektionen durch ELISA-basierte Testsysteme serotypisiert. Dabei wurden synthetische Peptide entweder über Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) oder direkt an die ELISA-Platten gekoppelt (Kong, Grigg et al. 2003, Sousa, Ajzenberg et al. 2009). In anderen Studien kamen rekombinante Polypeptide für die Serotypisierung zum Einsatz, die ebenfalls im ELISA verwendet wurden (Peyron, Lobry et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008).

Um simultan alle ausgewählten Peptide mit *T. gondii*-positiven und -negativen Seren typisieren zu können, wurde für die vorliegende Studie ein Peptid-Mikroarray-Verfahren etabliert (Publikation 1, 2, Manuskript 3).

Andere Studien über den Vergleich der diagnostischen Eigenschaften von Peptid-ELISAs und Peptid-Mikroarrays zeigten, dass Peptid-Mikroarrays eine deutlich höhere Sensitivität als Peptid-ELISAs aufweisen können (Melnyk, Duburcq et al. 2002). Aus diesem Grund gingen wir davon aus, dass eine Serotypisierung mit Peptid-Mikroarrays mindestens die gleiche Sensitivität aufweisen würde wie eine Serotypisierung im Peptid-ELISA.

Frühere Studien, bei denen mittels PCR-RFLP aus Katzenkot stammende *T. gondii*-Oozysten genotypisiert worden waren, zeigten, dass die meisten *T. gondii*-Oozysten in Deutschland dem klonalen Typ II zuzuordnen sind (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010). Ausgehend davon, dass Oozysten eine wichtige Infektionsquelle darstellen, konnte erwartet werden, dass auch die meisten Humaninfektionen in Deutschland durch Typ II-*T. gondii* verursacht werden. Daher sollten positive Humansenen aus Deutschland überwiegend ein Typ-II-spezifisches Peptidmuster erkennen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten diese Hypothese, denn Typ-II-spezifische positive Serum-Peptid-Reaktionen kamen statistisch signifikant häufiger vor als Reaktionen mit Peptiden anderer Spezifitäten. Außerdem wurden Typ-II-spezifische Peptide von *T. gondii*-positiven Seren mit signifikant höherer Intensität erkannt. Unsere Daten bestätigen auch Serotypisierungsergebnisse, die in Frankreich und Polen mittels ELISA unter Verwendung von Peptiden oder rekombinanten Polypeptiden erzielt worden waren (Nowakowska, Colon et al. 2006, Peyron, Lobry et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Sousa, Ajzenberg et al. 2009) .

Wie bereits erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt 27 Peptide für die Serotypisierung von Infektionen mit den klonalen *T. gondii*-Linien I, II und III bei Katzen identifiziert und selektiert. Das hier vorgestellte Serotypisierungsverfahren ist daher für epidemiologische Studien in Nordamerika und Europa geeignet, wo diese auch als kanonische *T. gondii* bezeichneten *T. gondii*-Genotypen vorherrschen. Da durch die Untersuchungen von Katzenkot bereits Daten zur Verbreitung klonaler *T. gondii*-Typen bei Katzen für Deutschland vorlagen, stellten Serumproben von Katzen aus Deutschland eine gute Basis dar um zu prüfen, ob die Serotypisierung zu ähnlichen Ergebnissen führen würde wie die Genotypisierung bei von Katzen stammenden Oozysten (Manuskript 3). Tatsächlich zeigten die Serotypisierungsergebnisse bei natürlich infizierten Katzen, dass die signifikant stärksten Reaktionen dieser Katzenseren gegen Typ-II-spezifische Peptide und nicht gegen Peptide mit anderen Spezifitäten gerichtet waren. Außerdem waren positive Typ-II-spezifische Serum-Peptid-Reaktionen im Verhältnis zu den Serum-Peptid-Reaktionen anderer Spezifitäten signifikant überrepräsentiert. Eine weitere explorative Clusteranalyse mit Hilfe von XYF-SKN (Melssen, Wehrens et al. 2006, Buydens und Wehrens 2007) zeigte, dass 94,2% (81/86) der *T. gondii*-positiven Katzenfeldseren ähnliche Peptidmuster wie mit *T. gondii*-Typ-II-infizierte Katzen zeigten. Nur wenige natürlich infizierte Katzen (3,5%) erkannten ähnliche Peptidmuster wie solche Katzen, für die bekannt war, dass sie mit *T. gondii* vom Typ I oder III infiziert waren. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die deutliche Mehrheit der *T. gondii*-Infektionen bei Katzen in Deutschland *T. gondii* des klonalen Typs II zuzuordnen sind. Dieser Befund stimmt mit Resultaten früherer Studien zur Genotypisierung von *T. gondii*-Oozysten aus Deutschland überein (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010). Die Ergebnisse decken sich außerdem auch mit unseren Resultaten zur Serotypisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen in Deutschland (Publikation 1). Das Resultat der Untersuchungen verdeutlicht insgesamt, dass die etablierte Serotypisierungsmethode für epidemiologische Studien zur Verbreitung der klonalen Typen I, II und III von *T. gondii* bei Katzen geeignet ist.

Eine frühere Studie nutzte Typ-II- und Typ-I/III-spezifische GRA6-Peptide zur Serotypisierung bei Menschen aus Afrika und Südamerika, die nicht mit den kanonischen *T. gondii* sondern mit „atypischen“ *T. gondii*, d.h. nicht den Haplogruppen 1, 2 oder 3 zuzuordnenden *T. gondii* infiziert waren (Sousa, Ajzenberg et al. 2008). Die meisten dieser Seren reagierten am stärksten mit Typ I/III-spezifischen GRA6-Peptiden (Sousa, Ajzenberg et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von Katzen serotypisiert, die mit „atypischen“ *T. gondii*-Isolaten aus Brasilien (TgCatBr1, 2, 5) und Nordamerika (TgBbUS1 und TgGoatUS6) infiziert waren. Ähnlich wie die Seren von mit „atypischen“ *T. gondii*

infizierten Menschen, reagierten auch diese Katzenserum am stärksten mit Typ-I/III-spezifischen Peptiden. Positive Serum-Peptid-Reaktionen mit Typ-I/III-spezifischen Peptiden waren gegenüber Reaktionen mit Peptiden anderer Spezifitäten signifikant überrepräsentiert. Eine starke Reaktivität mit einzelnen Peptiden, die Typ-I-, II-, oder III-spezifisch sind, wurde auch bei diesen Seren beobachtet. Eine hohe IgG-Antikörperreaktivität gegen Typ I/III-spezifische Peptide in mit atypischen *T. gondii* infizierten Katzen könnte darauf hindeuten, dass atypische *T. gondii*-Stämme Epitope besitzen, die solchen ähnlich sind, die von *T. gondii* vom Typ I oder Typ III exprimiert werden. Eventuell gibt es sogar identische Epitope bei atypischen *T. gondii* und Isolaten, die den Typen I oder III zuzuordnen sind. Die zur Zeit noch fehlenden genomischen Daten für die atypischen *T. gondii*-Isolate, mit denen einige der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Katzen experimentell infiziert waren, verhinderten die Ermittlung von Peptidsequenzen, die für diese Isolate spezifisch sind. Daher konnte keine für die Serotypisierung dieser *T. gondii*-Isolate geeigneten Peptide ermittelt werden.

Obwohl Typ-II-spezifische Serum-Peptid-Reaktionen sowohl in ihrer Anzahl als auch der Intensität nach bei *T. gondii*-positiven Humansen aus Deutschland dominierten, gab es viele Humansen, die gleichzeitig mit einer geringen Anzahl von Peptiden reagierten, die spezifisch für andere klonale Typen von *T. gondii* waren. Auch bei Katzen, von denen bekannt war, dass sie mit Typ II infiziert waren, war eine erhöhte Reaktivität mit einzelnen Typ-III-spezifischen Peptiden zu beobachten. Dieses Phänomen war auch bei den überwiegend mit Typ-II-spezifischen Peptiden reagierenden *T. gondii*-seropositiven Feldseren zu beobachten. Da in Deutschland hauptsächlich *T. gondii* vom Typ-II vorkommt (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010), ist es eher unwahrscheinlich, dass die serologisch überwiegend mit Typ-II- und nur selten oder schwach mit Peptiden anderer Spezifitäten reagierenden Menschen und Katzen zusätzlich zu einer Typ-II-Infektion auch noch mit *T. gondii* vom Typ III oder anderen Typen infiziert waren. Als mögliche Erklärung ist eine mangelnde Spezifität einzelner zur Serotypisierung eingesetzter Peptide zu nennen. Das Ergebnis weist darauf hin, dass eine größere Anzahl definierter Seren erforderlich ist, um die Spezifität der zur Serotypisierung eingesetzten Peptide zu prüfen und die Spezifität des Verfahrens durch Entfernen weniger spezifischer Peptide aus dem Panel zu steigern. Eine weitere Erklärung für die möglicherweise geringe Spezifität mancher Peptide mit Human- und Katzenserum könnte das Vorhandensein von mindestens einem weiteren nicht-polymorphen Epitop innerhalb der Peptidsequenz zusätzlich zu der typspezifischen, polymorphen Region sein (Kong, Grigg et al. 2003). In anderen Studien wurden ähnliche Resultate mit Referenzserum von experimentell infizierten Mäusen erzielt.

Es wurde beobachtet, dass durch eine Modifikation unspezifischer Peptide, z.B. durch Veränderung der Länge innerhalb des nicht-polymorphen Bereiches, eine typspezifische Reaktivität erreicht werden konnte (Kong, Grigg et al. 2003).

Die Möglichkeit von Misch- oder Superinfektionen mit mehreren klonalen Typen von *T. gondii* stellt ein generelles Problem bei Serotypisierungsuntersuchungen dar. Es gibt leider keine Informationen dazu, wie oft solche Misch- oder Superinfektionen im Zwischen- und Endwirt vorkommen. Die Möglichkeit des Auftretens solcher Misch- oder Superinfektionen wurde allerdings mit Hilfe von Genotypisierungen gezeigt (Dubey, Moura et al. 2009, Al-Kappany, Rajendran et al. 2010). Es kann angenommen werden, dass Misch- und Superinfektionen in solchen Regionen auftreten, in denen mehr als ein klonaler Typ von *T. gondii* vorkommt. Da die *T. gondii*-Infektion bei Katzen altersabhängig zu sein scheint (Opsteegh, Haveman et al. 2012), wäre es für epidemiologische Studien zum Vorkommen der verschiedenen klonalen Linien I, II und III bei Katzen sinnvoll, die Serotypisierung nur bei jungen Katzen durchzuführen, um falsche Ergebnisse aufgrund von Misch- oder Superinfektionen zu vermeiden.

Es ist denkbar, dass die beobachteten Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen Peptide zwischen den unterschiedlichen Gruppen seropositiver Menschen auch von anderen *T. gondii*-unabhängigen Faktoren, wie von Unterschieden im Infektionsweg, in der Infektionsdosis, im Infektions- oder Immunstatus, in der Expositionshäufigkeit, in der Therapie und im genetischen Hintergrund des Wirte verursacht werden können (Suzuki 2002, Sensini 2006, Correa, Canedo-Solares et al. 2007).

13% der *T. gondii*-positiver Humansen reagierten mit keinem der verwendeten Peptide. Sousa et al. (2008) berichtete ebenfalls, dass 30% der untersuchten Humansen keines der beiden von ihnen verwendeten Typ-II- und Typ-I-III-spezifischen Peptide (GRA6-II-214 und GRA6-I/III-220) im ELISA erkannte (Sousa, Ajzenberg et al. 2008). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Anwendung nur weniger Peptide bei der Serotypisierung zu einem erhöhten Anteil falsch-negativer Serotypisierungsergebnisse führen könnte (Kong, Grigg et al. 2003, Sousa, Ajzenberg et al. 2009). Um dieses Problem zu vermeiden, ist es von großer Bedeutung, zukünftig eine größere Anzahl polymorpher Peptide einzusetzen (Sousa, Ajzenberg et al. 2009). Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine deutlich höhere Zahl an Peptiden eingesetzt worden war als in anderen Studien, reagierte immer noch ein relativ hoher Anteil der Seren nicht bzw. nur schwach-positiv mit den Peptiden (Publikationen 1, 2).

Aufgrund der limitierenden Sensitivität der einzelnen Peptide ist es notwendig, ein größeres Peptid-Panel mit gut validierten Peptiden für die serologische Typisierung der *T. gondii* Infektionen anzuwenden.

Unsere Ergebnisse zeigten eindeutig, dass von den GRA-Proteinen (GRA3, GRA6, GRA7) abgeleitete polymorphe Peptidsequenzen die höchste Reaktivität mit für *T. gondii* serologisch positiven Human- oder Katzenserum aufwiesen (Publikationen 1, 3). Die Arbeit bestätigt damit Resultate anderer Arbeitsgruppen, dass GRA-Antigene ein starkes diagnostisches Potential aufweisen (Cesbron-Delauw 1994, Jacobs, Vercammen et al. 1999, Lecordier, Fourmaux et al. 2000).

Außerdem reagierten die Seren akut-infizierter Patienten deutlich stärker mit GRA6- und GRA3-Peptiden als Seren von chronisch infizierten Patienten oder seropositiven und vermutlich latent-infizierten Waldarbeitern. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen rekombinante GRA-Proteine als Marker für die Diagnose akuter Toxoplasmosen des Menschen angewendet wurden (Redlich und Müller 1998, Golkar, Azadmanesh et al. 2008).

5.2 Diagnose der *T. gondii*-Infektion beim Menschen mit Hilfe von bioinformatisch-vorhergesagten Epitopen unter Verwendung eines Peptid-Mikroarrays

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Einsatzfähigkeit von Computerprogrammen zur bioinformatischen Vorhersage potentieller Epitope und eines Peptid-Mikroarrays als diagnostisches System für die serologische Diagnose von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen geprüft.

In mehreren Studien zeigte sich, dass die *T. gondii*-Proteine SAG1, NTPase1, NTPase2, GRA1, GRA2 und GRA4 eine hohe Antigenität und ein großes diagnostisches Potential besitzen (Beghetto, Spadoni et al. 2003, Cardona, de-la-Torre et al. 2009, Kotresha und Noordin 2010, Kotresha, Poonam et al. 2012). Um herauszufinden, welche Proteinregionen dieser Antigene die Eigenschaften eines Epitopes aufweisen, wurde ein bioinformatisches Programm namens „ABCpred“ eingesetzt. Wie in Kapitel 3.14 beschrieben, gibt es zahlreiche bioinformatische Methoden zur Vorhersage von Epitopen (Saha und Raghava 2006, Saha und Raghava 2007). Saha und Raghava entwickelten die Software ABCpred für die Vorhersage linearer B-Zell-Epitope (Saha und Raghava 2006). Dieses Programm zeichnete sich durch einen signifikant höheren Anteil korrekter Vorhersagen als eine zufällige

Selektion linearer Epitope aus. Unsere Studie bestätigte diese Beobachtung. 19 von 20 der in ABCpred vorhergesagten linearen Epitope wurden von unterschiedlichen Gruppen serologisch-positiver Humansenen erkannt und 40% dieser Peptidsequenzen zeigten ein diagnostisches Potential. Allerdings beobachteten wir eine zwischen den Gruppen unterschiedliche diagnostische Sensitivität der Peptide. Für die ABCpred-Methode wurde eine „accuracy“ von 65.93% beschrieben (Saha und Raghava 2006). In unserer Studie konnten wir die „accuracy“ nicht bestimmen, da nicht bekannt war, wo sich tatsächlich lineare Epitope auf den untersuchten Proteinsequenzen befanden.

Die meisten Peptide, die aus anderen Publikationen (Kato, Claveria et al. 2007, Cardona, de-la-Torre et al. 2009) entnommen wurden, stammten von dem Oberflächenantigen SAG1. Ein großer Teil dieser Peptidsequenzen wies eine unerwartet geringe diagnostische Sensitivität auf. Es ist bekannt, dass *T. gondii*-Oberflächenantigene eine starke Antikörperantwort (IgG) in einem infizierten Wirt induzieren. Jedoch sind die meisten Epitope auf dem SAG1-Antigen konformationell (Burg, Perelman et al. 1988, Kim, Bulow et al. 1994, Lekutis, Ferguson et al. 2001, Saeij, Arrizabalaga et al. 2008). In der vorliegenden Studie wurden nur lineare Epitope untersucht. Die Analyse der SAG1-Peptide zeigte eine deutlich geringere Reaktivität mit *T. gondii*-positiven Humansenen aus Deutschland als in einer anderen Studie für Seren aus Südamerika berichtet wurde (Cardona, de-la-Torre et al. 2009). Patienten aus Südamerika könnten deshalb anders auf SAG1-Peptide reagieren als Patienten in Deutschland, da sie anderen *T. gondii*-Genotypen ausgesetzt sind (McLeod, Boyer et al. 2012). Außerdem lassen sich die Abweichungen möglicherweise auch durch Unterschiede in den MHC (Major Histocompatibility Complex)-Haplotypen zwischen den humanen Populationen in Südamerika und Europa erklären (Jamieson, de Roubaix et al. 2008, Jamieson, Cordell et al. 2009).

Eine geringere Reaktivität beobachteten wir auch für das Peptid GRA1-100 (basierend auf dem sogenannten „epi-24“ Epitop), obwohl dieses Epitop in einer anderen Studie als hoch immunreaktiv eingeschätzt wurde (Beghetto, Pucci et al. 2001). In unserem Fall zeigte das Peptid nur eine Sensitivität von 2,7% (5/184), während 29 von 40 *T. gondii*-positiven Seren in der Studie von Beghetto et al. (2001) mit „epi-24“ reagierten. Diese starke Abweichung der diagnostischen Sensitivität des GRA1-100-Peptides könnte durch die Anwendung von unterschiedlichen Methoden zur Herstellung des Peptides erklärt werden. Für unsere Studie stellten wir die „epi-24“-Proteinsequenz als synthetisches Peptid her, während Beghetto et al. (2001) rekombinante Proteinfragmente verwendeten. Die Faltung des Oligopeptids, das dieses Epitop enthält, ist ein wichtiger Einflussfaktor für seine Reaktivität. Bei der Expression kann es zu einer anderen Faltung als bei der chemischen Peptidsynthese kommen, was die

Unterschiede in der Antigenität erklären könnte (Burg, Perelman et al. 1988, Harning, Spenter et al. 1996). Weitere Erklärungen könnten Unterschiede in den zur Validierung verwendeten Seren sein (z. B. verschieden hohe *T. gondii*-spezifische Antikörpertiter) sowie Unterschiede in den Testsysteme (ELISA bzw. Array).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass die diagnostische Sensitivität individueller Peptide bei serologisch *T. gondii*-positiven Patienten und Waldarbeiter 50% nicht überschritt. Eine ähnlich geringe Sensitivität einzelner Peptide wurden auch in anderen Studien zur serologischen Diagnose der humanen Infektion mit Echinokokken und Tuberkulose-Bakterien beobachtet (Nahtman, Jernberg et al. 2007, Shen, Behera et al. 2009, List, Qi et al. 2010).

Die meisten der *T. gondii*-positiven Humansenen erkannten ein individuelles Peptidmuster. Daher scheint es notwendig zu sein, bei der Peptid-basierten Diagnose von *T. gondii*-Infektionen gleichzeitig mehrere Peptide im Mikroarray-Format einzusetzen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass dadurch eine mit konventionellen Methoden vergleichbare diagnostische Sensitivität erreicht werden konnte.

Mit Hilfe der univariaten logistischen Regression konnten wir insgesamt 10 Peptide identifizieren, deren positive und negative Serumreaktionen eine signifikante Übereinstimmung mit dem LAT als Referenztest zeigten. Diese Peptide mit diagnostischem Potential enthielten Epitope der *T. gondii*-Antigene SAG1, GRA1, GRA2, und GRA4. Die diagnostische Sensitivität der einzelnen Peptide variierte von 9,78% (SAG1-61) bis 50% (GRA2-28). Wurden die Peptide in Kombination, also in einem Peptid-Array eingesetzt und wurde das Array-Resultat dann positiv gewertet, wenn mindestens eines der 10 diagnostischen Peptide erkannt wurde, konnte je nach der untersuchten Gruppe eine diagnostische Sensitivität zwischen 57% (bei Waldarbeitern) und 100% (bei Patienten mit okulärer Toxoplasmose) sowie eine diagnostische Spezifität von 84% erreicht werden. Diese diagnostischen Parameter sind akzeptabel, jedoch weit entfernt von optimalen Eigenschaften eines Tests für die serologische Diagnose von *T. gondii*-Infektionen beim Menschen. Alle Peptide mit einem diagnostischen Potential, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert wurden, können zukünftig als Teil eines größeren Peptid-Arrays für die Diagnose von *T. gondii*-Infektionen eingesetzt werden. Jedoch ist es wichtig, weitere geeignete Peptide in die Analyse einzubeziehen, um so die Sensitivität des Arrays zu verbessern. Eine Optimierung der Spezifität könnte dadurch erreicht werden, dass das Array-Ergebnis erst dann als positiv gewertet wird, wenn eine Mindestanzahl an Peptiden positiv erkannt worden ist, die größer als eins ist.

Für die Erweiterung und Optimierung der Peptidarrays müssen weitere *T. gondii*-Antigene, solche wie Rhoptrien- (ROP1, ROP2), Mikronemen- (MIC2, MIC4, MIC5), Dichte-Granula- (GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7, GRA8), und Oberflächenantigene (SAG2A) auf lineare B-Zell Epitope untersucht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass ABCpred ein geeignetes bioinformatisches Werkzeug für die Vorhersage potentieller linearer Epitope ist. Jedoch wies ein Teil der bioinformatisch vorhergesagten Epitope nur eine geringe Reaktivität mit serologisch *T. gondii*-positiven Humanseren auf. Falsch-positive Epitop-Vorhersagen wurden schon von den Entwicklern des Programms berichtet (Saha and Raghava 2006) und könnten auf die in der vorliegenden Studie einheitliche Länge der Epitopkandidaten zurückzuführen sein.

Alle Epitope, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, waren linear, während die meisten der in der Natur vorkommenden Epitope konformationell sind (Barlow, Edwards et al. 1986). Deshalb könnte es von Bedeutung sein, auch konformationelle Epitope in die serologische Typisierung und Diagnose von *T. gondii*-Infektionen einzubeziehen. Tatsächlich gibt es eine Reihe bioinformatischer Programme für die Vorhersage konformationeller Epitope auf Basis der drei-dimensionalen (3D) Röntgenstruktur eines Antigens. Aber leider stehen solche 3D-Proteinstrukturen nur für sehr wenige *T. gondii*-Antigene zur Verfügung.

Ein stark erweiterter Peptid-Array hätte den Vorteil, dass anders als in konventionellen Tests nicht nur eine Ja-Nein-Aussage über die Seropositivität eines Serum möglich wäre, sondern dass die Informationen zur Seropositivität mit einer relativ hohen Auflösung vorlägen.

Anhand der erkannten Peptid-Muster könnten möglicherweise Rückschlüsse auf andere Parameter der Infektion gezogen werden, z.B. auf das Stadium der Infektion. Dass diese Chance besteht, zeigt die vorliegende Arbeit: GRA2-28, MIC3-282 und MIC3-191 wurden sehr viel stärker von Seren akut-infizierter Patienten erkannt als von Seren anderer Probanden. Peptid-Arrays könnten auch genutzt werden, um bei Neugeborenen zu prüfen, ob die Array-Profile zwischen einer Mutter und ihrem Kind übereinstimmen, um im Fall einer Divergenz auf eine postnatale Infektion schließen zu können. Ein weiteres Einsatzgebiet der Peptid-Arrays wäre der Vergleich der *T. gondii*-spezifischen Antikörper im Serum und in der Augenflüssigkeit, um im Fall von Abweichungen im Profil auf eine okuläre Toxoplasmose schließen zu können.

6 Zusammenfassung

Mehrere Studien berichten über Hinweise, dass schwerwiegende Infektionsverläufe bei Menschen und Tieren mit bestimmten Genotypen und klonalen Linien von *T. gondii* in Verbindung stehen. Es ist daher wichtig, Kenntnisse über die Verbreitung unterschiedlicher Genotypen und Linien von *T. gondii* zu erlangen. Mithilfe dieser Kenntnisse könnten Infektionsgefährdungen für Menschen und Tiere besser abgeschätzt werden. Hinweise auf die Genotypen von *T. gondii*, mit denen Menschen oder Tiere infiziert sind, könnten in Zukunft frühzeitig Rückschlüsse auf den weiteren Infektionsverlauf liefern und gegebenenfalls eine Optimierung der Behandlung gestatten.

Die Ergebnisse der in dieser Dissertation zusammengefassten Studien zeigen, dass Peptid-Mikroarrays geeignete Testsysteme für die serologische Diagnose und Typisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Katzen darstellen.

Mit Hilfe von Peptid-Mikroarrays und Seren experimentell und natürlich infizierter Katzen konnte erstmals belegt werden, dass Katzen in der Lage sind, eine typspezifische IgG-Antwort gegen *T. gondii* der klonalen Typen I, II, und III zu entwickeln. Nach Validierung wurden 27 Peptide selektiert, die für eine Serotypisierung der klonalen *T. gondii*-Infektionen verwendet wurden.

Aufgrund früherer Studien konnte davon ausgegangen werden, dass die meisten Zwischenwirte in Deutschland gegenüber *T. gondii* des klonalen Typs II exponiert sind. Jedoch gab es keine Information zum Vorkommen unterschiedlicher *T. gondii*-Genotypen bei Menschen und nur im begrenzten Umfang Daten zum Vorkommen unterschiedlicher *T. gondii*-Typen bei Hauskatzen in Deutschland.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass positive Typ-II-spezifische Peptidreaktionen bei serologisch positiven Menschen und Katzen signifikant überrepräsentiert sind. Die Reaktionen gegen Typ-II-spezifische Peptide waren signifikant stärker als die Reaktionen gegen Peptide anderer Spezifitäten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die meisten *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Hauskatzen in Deutschland durch *T. gondii* des klonalen Typs II verursacht werden. Die Studien bestätigen die Resultate vorheriger Arbeiten, in denen hauptsächlich Typ II bei den von Katzen in Deutschland ausgeschiedenen *T. gondii*-Oozysten nachgewiesen wurde. Da sporulierte Oozysten von *T. gondii* eine der wichtigsten Infektionsquellen für Zwischenwirte darstellen, war zu erwarten, dass es

hinsichtlich der bei Katzen und Menschen beobachteten Serotypisierungs-Resultate keine wesentlichen Unterschiede geben sollte.

Die hier durchgeführten Arbeiten repräsentieren eine erste Serotypisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen in Deutschland und eine erste bei Katzen weltweit mit Hilfe von Peptid-Mikroarrays. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass weitere gut validierte typ-spezifische Peptide erforderlich sind, um eine spezifischere Serotypisierung zu erreichen. Eine weitere Validierung mit einer größeren Zahl von gut definierten Seren könnte das Identifizieren und die Selektion polymorpher Peptide für die Serotypisierung erleichtern.

Die in dieser Dissertation zusammengefassten Studien (Publikation 2, Manuskript 3) zeigen die Anwendbarkeit von bioinformatischen Verfahren wie „propensity scale“-Algorithmen und die ABCpred-Methode zur Vorhersage von linearen Epitopen in *T. gondii*-Antigenen. Mit der „propensity scale“-Methode wurden neun polymorphe Peptide ausgewählt, die als Teil von einem Peptid-Panel für *T. gondii* Serotypisierung eingesetzt werden könnten. Mit Hilfe von ABCpred konnten bioinformatisch insgesamt acht neue lineare Epitope vorhergesagt werden, die sich künftig auch als Teil eines diagnostischen Peptid-Panels einsetzen lassen. Insgesamt wurden in dieser Studie (Publikation 2) zehn Peptide (acht ABCpred-vorhergesagte und zwei aus der Literatur) mit diagnostischem Potential identifiziert. Durch den Einsatz dieser Peptide im Peptid-Mikroarray zur serologischen Diagnose der humanen Toxoplasmose wurde eine diagnostische Sensitivität von 69% und Spezifität von 84% erreicht. Diese diagnostischen Parameter sind akzeptabel, aber nicht optimal. Um bessere diagnostische Eigenschaften des Testsystems erreichen zu können, ist es notwendig, das Peptid-Panel zu optimieren und nach weiteren Peptiden mit diagnostischem Potential zu forschen.

Die Arbeit zeigt, dass die Anwendung bioinformatischer Programme zur Epitopvorhersage zusammen mit Peptid-Mikroarrays geeignete Laborwerkzeuge darstellen, mit denen *T. gondii*-Epitope identifiziert werden können, die sich zur serologischen Diagnose oder Typisierung eignen. Aus Peptiden, die diese Epitope enthalten, wurden Mikroarray-Tests entwickelt und zur serologischen Typisierung von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Katzen eingesetzt.

7 Summary

Peptide-microarray-based serological diagnosis and typing of *Toxoplasma gondii* infections in humans and cats from Germany

Several studies reported that certain *T. gondii* genotypes and clonal lineages correlate with severe toxoplasmosis in mice and humans. Therefore it may be important to have information on the prevalence of different *T. gondii* genotypes in humans and animals. In future, this information may help to better estimate the risk of infection for humans and animals. Information on the genotype of *T. gondii* an individual human or animal is infected may allow to conclude on the further development of disease and to optimise treatment.

The results of studies summarized in this cumulative thesis demonstrate that a peptide-microarray assay can be used for diagnosis of *T. gondii* infection and to detect *T. gondii* clonal type-specific antibody responses in seropositive humans and cats.

With a peptide microarray and sera from experimentally-infected and naturally-infected cats it was shown for the first time that cats are able to mount a clonal type-specific IgG antibody response against *T. gondii*. After validation, 27 peptides were selected which were suitable for *T. gondii* serotyping in cats.

Previous work suggested that individuals in the study area were mainly exposed to *T. gondii* clonal type II. However, there was no information, which clonal type of *T. gondii* is most prevalent in infected humans, and there was only limited data about the distribution of *T. gondii* types in cats in Germany.

The results of this study demonstrate that positive peptide reactions presenting clonal type II were statistically significantly overrepresented in the tested human and cat population. The intensity, by which type II peptides were recognized, was also significantly higher than the intensity with which peptides of other specificities were detected. The results suggest that most *T. gondii* infections in humans and cats were caused by *T. gondii* clonal type II in Germany and confirmed previous findings reporting a pre-dominance of type II in oocysts shed by cats in Germany. Since sporulated *T. gondii* oocysts present one of the most important sources of infection for intermediate hosts, it was expected that there were no major differences in serotyping results between those for cats and humans.

These are the first peptide microarray-based serotyping studies on *T. gondii* infections in humans in Germany and the first in cats worldwide. However, further carefully validated type-specific peptides are necessary to optimize the specificity of serotyping. Further validation with a larger number of well-characterized sera may help to identify and select further polymorphic peptides with a diagnostic potential.

The results summarized in the present thesis (publication 2, manuscript 3) demonstrate that propensity scale-based and ABCpred bioinformatic methods are suitable for the *in-silico* prediction of linear epitopes on *T. gondii* antigens. The propensity scale method identified nine polymorphic epitopes that could be used as part of a peptide panel for *T. gondii* serotyping in cats. Using ABCpred, eight novel linear epitopes were predicted, which could be included in a larger peptide array for diagnosis. A total of ten peptides with diagnostic potential (eight ABCpred-predicted and two taken from the literature) were identified in this study (publication 2). The use of these peptides in a peptide-array revealed an overall diagnostic sensitivity of 69% and a diagnostic specificity of 84%. These diagnostic parameters are acceptable, but not optimal. To achieve better diagnostic properties, it is necessary to identify further epitopes with diagnostic potential to extend the peptide panel.

In conclusion, this study demonstrates that bioinformatic programs in combination with peptide-microarray represent a powerful tool for the prediction and analysis of *T. gondii* linear epitopes suitable for serotyping or diagnosis. Based on peptides containing these epitopes peptide-microarray tests were developed in the present thesis and applied for serological typing of *T. gondii* infections in humans and cats.

8 Ausführliche Darstellung der Publikationen

8.1 Publikation 1

Analysis of Clonal Type-Specific Antibody Reactions in *Toxoplasma gondii* Seropositive Humans from Germany by Peptide-Microarray

Pavlo Maksimov^{1*}, Johannes Zerweck², Aline Maksimov¹, Andrea Hotop³, Uwe Groß³, Katrin Specker⁴, Walter Däubener⁴, Sandra Werdermann⁵, Olaf Niederstrasser⁶, Eckhardt Petri⁷, Marc Mertens⁸, Rainer G. Ulrich⁸, Franz J. Conraths¹, Gereon Schares^{1*}

1 Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen, Germany, **2** JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany, **3** German National Consulting Laboratory for Toxoplasmosis, Department of Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany, **4** Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, **5** Institut für Arbeits und Sozialhygiene Stiftung, Kyritz, Germany, **6** BG Kliniken Bergmannstrost, Halle, Germany, **7** Novartis Vaccines and Diagnostics, Marburg, Germany, **8** Federal Research Institute for Animal Health, Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems, Germany

Abstract

Background: Different clonal types of *Toxoplasma gondii* are thought to be associated with distinct clinical manifestations of infections. Serotyping is a novel technique which may allow to determine the clonal type of *T. gondii* humans are infected with and to extend typing studies to larger populations which include infected but non-diseased individuals.

Methodology: A peptide-microarray test for *T. gondii* serotyping was established with 54 previously published synthetic peptides, which mimic clonal type-specific epitopes. The test was applied to human sera (n = 174) collected from individuals with an acute *T. gondii* infection (n = 21), a latent *T. gondii* infection (n = 53) and from *T. gondii*-seropositive forest workers (n = 100).

Findings: The majority (n = 124; 71%) of all *T. gondii* seropositive human sera showed reactions against synthetic peptides with sequences specific for clonal type II (type II peptides). Type I and type III peptides were recognized by 42% (n = 73) or 16% (n = 28) of the human sera, respectively, while type II–III, type I–III or type I–II peptides were recognized by 49% (n = 85), 36% (n = 62) or 14% (n = 25) of the sera, respectively. Highest reaction intensities were observed with synthetic peptides mimicking type II-specific epitopes. A proportion of the sera (n = 22; 13%) showed no reaction with type-specific peptides. Individuals with acute toxoplasmosis reacted with a statistically significantly higher number of peptides as compared to individuals with latent *T. gondii* infection or seropositive forest workers.

Conclusions: Type II-specific reactions were overrepresented and higher in intensity in the study population, which was in accord with genotyping studies on *T. gondii* oocysts previously conducted in the same area. There were also individuals with type I- or type III-specific reactions. Well-characterized reference sera and further specific peptide markers are needed to establish and to perform future serotyping approaches with higher resolution.

Citation: Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Groß U, et al. (2012) Analysis of Clonal Type-Specific Antibody Reactions in *Toxoplasma gondii* Seropositive Humans from Germany by Peptide-Microarray. PLoS ONE 7(3): e34212. doi:10.1371/journal.pone.0034212

Editor: Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

Received: November 1, 2011; **Accepted:** February 28, 2012; **Published:** March 28, 2012

Copyright: © 2012 Maksimov et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Toxonet01 and Toxonet02) by funds to Dr. Schares (01KI0765; 01KI1002F), Dr. Däubener (01KI0764; 01KI1002E) and Dr. Groß (01KI0766; 01KI1002B). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Dr. Zerweck is laboratory head for production of peptide microarray slides at JPT peptide Technologies. Dr. Petri is employed by Novartis Vaccines and Diagnostics. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: pavlo.maksimov@fli.bund.de (PM); gereon.schares@fli.bund.de (GS)

Introduction

Infection with the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is often asymptomatic or causes flu-like symptoms in immunocompetent individuals. Primary maternal infection with the parasite during pregnancy may lead to abortion or induce disease in the transplacentally infected fetus. Toxoplasmosis is often fatal in immunocompromised patients [1,2,3].

T. gondii has a clonal population structure. North America and Europe are dominated by three clonal lineages of *T. gondii*, i.e. the

clonal types I, II and III. Type II is most abundant in infected humans and domestic animals [4,5,6,7,8]. While type III strains are abundant in animals, they are rarely seen in humans [4,5,6,7,9], but this distribution may be impaired by a sampling bias. Previous studies suggested that type I strains are relatively rare in animals and humans and they have been predominantly found in immunocompromised patients who had experienced a reactivation of *T. gondii* infection, which frequently occurs in HIV-infected toxoplasmosis patients [4,10]. However, Ajzenberg and colleagues (2009) [11] demonstrated that most European immu-

nocompromised patients with reactivated toxoplasmosis were infected with *T. gondii* clonal type II, whereas clonal type I and non-archetypal *T. gondii* types were isolated from African and South American patients. This suggests that the occurrence of particular *T. gondii* clonal types is influenced by the geographic origin of the patients. Most *T. gondii* isolates obtained in South America, Asia and Africa are genetically distinct from the clonal types I, II and III [12,13].

T. gondii of clonal types I, II and III show different virulence patterns in outbred mice inoculated intraperitoneally (i.p.) with tachyzoites [14,15]. In this experimental system, *T. gondii* of the clonal types II and III are characterized by LD50 values of $\geq 10^3$ tachyzoites, i.e. low virulence in mice. By contrast, *T. gondii* isolates of type I are highly virulent for mice with LD100 values of ≤ 10 tachyzoites [14,15]. It is not yet clear, whether these differences also imply differences in the pathogenicity of *T. gondii* in humans [15]. There is evidence, however, suggesting that host-genetic factors also contribute to the severity of toxoplasmosis [16,17,18,19,20,21].

Several serological assays have been reported that aim at predicting the clonal type of *T. gondii* by which animals or humans are infected [22,23,24,25,26]. Serotyping is based on the observation that the clonal lineages of *T. gondii* which dominate in North America and Europe differ not only genetically but also in the amino acid sequences of several parasite proteins, leading to polymorphic sites. Antibody responses against these polymorphic sites can thus be allele-specific [22,27]. Since the three clonal types may have arisen from common ancestors of two closely related but genetically different lineages [8,28], many of the polymorphic sites are specific for more than one of the three clonal types I, II or III. The pioneering work of Kong et al. (2003) [22] showed that short synthetic peptides derived from polymorphic regions could be used to serologically predict the clonal type of *T. gondii* humans or mice were infected with.

The aim of the present study was to test a panel of sera from *T. gondii* seropositive patients and volunteers (forest workers) from Germany against polymorphic, type-specific sites of 14 *T. gondii* antigens to obtain insights into the clonal types of *T. gondii* these persons were infected with and to explore potential differences in the peptide spectra recognized by patients and seropositive but non-diseased volunteers.

Materials and Methods

Patient sera from clinics

In total, 74 *T. gondii* positive human sera were provided by the Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf and the Department of Medical Microbiology and the National Reference Center for Systemic Mycoses, University Medical Center, Göttingen. Out of these, 21 originated from individuals with acute toxoplasmosis, and 53 from individuals with chronic *T. gondii* infection. In addition, these institutions provided 65 samples from serologically *T. gondii*-negative individuals.

Screening of human sera for *T. gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) was performed at the institutions providing the sera using an immunofluorescence test (IFT; bioMérieux, Nürtingen, Germany), the LIAISON IgG immunoassay (DiaSorin, Dietzenbach, Germany) or the Mini VIDAS immunoassay system (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). *T. gondii*-specific IgM was detected using the Mini VIDAS immunoassay system (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France), the LIAISON IgM immunoassay (DiaSorin) or the ISAGA IgM immunoassay (bioMérieux). Detailed information about the serological results for each patient

serum is shown as supporting information (Table S1). Transient detection of *T. gondii*-specific IgM and eventually IgA was regarded as an indication of an acute infection. In a few patients ($n = 7$), a persistent IgM response was demonstrated by repeated testing. For these patients, a persistent but inactive (latent) infection was assumed. Presence of IgG and absence of IgM/IgA was regarded as an indication for persistent but inactive (latent) infection.

Sera from volunteers

A total number of 563 sera were collected from forest workers at all forest offices in the German Federal State Brandenburg [29].

Ethical considerations

The study reported in our manuscript was a collaborative work of the Toxonet01 project of the National Research Platform for Zoonoses and was approved by the respective ethical committees of the Medical Faculties of the Universities of Düsseldorf (3174, 20/01/09) and Göttingen (8/6/09) and by the State Medical Association of Brandenburg (19/04/10). Serum samples were collected under approved protocols.

For the anonymized patient sera provided by the Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf and the Department of Medical Microbiology and the National Reference Center for Systemic Mycoses, University Medical Center, Göttingen informed consent was obtained verbally, which was in agreement with the ethical committee's approval. All volunteers (forest workers) were included in the study on the basis of written informed consent as described in detail by Mertens et al. (2011) [29].

Latex agglutination test

A latex agglutination test (LAT, TOXOREAGENT, MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Germany) was performed according to the instructions of the manufacturer. Results were expressed as reciprocal antibody titres. Sera with reciprocal LAT titres of ≥ 16 were regarded as seropositive. Reciprocal LAT titres of < 16 were considered as seronegative.

T. gondii surface antigen 1 (TgSAG1) immunoblot

Native *T. gondii* surface antigen 1 (TgSAG1) was affinity-purified as previously described [30]. The identity of the purified protein was confirmed using monoclonal antibodies against TgSAG1 (IgG2a P30/3 [ISL, Paignton, UK]). Detection of antibodies against TgSAG1 was performed essentially as described for animal sera [30] with a few modifications. Briefly, human sera were diluted 1:10 and the conjugate (horse radish peroxidase [HRP] AffiniPure rabbit anti-human IgA+IgG+IgM [H+L], Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) was diluted 1:500. Reactivity with a protein of a relative molecular mass of 30 kDa was regarded as a *T. gondii* positive reaction. Sera obtained from a LAT positive and a LAT negative volunteer were used as controls.

Peptides

A total of 54 *T. gondii* synthetic peptides based on amino acid sequences representing polymorphic epitopes of the three archetypal lineages of *T. gondii* were used to detect type-specific antibodies in sera of *T. gondii* seropositive humans from Germany. The respective peptide sequences [22] were derived from 14 *T. gondii* immunogenic proteins, including dense granule proteins, surface antigens and rhoptry proteins (Table S2). Peptide sequences were based on information available for representative *T. gondii* strains of the clonal types I (RH), II (Me49 and Prugniaud) and III (VEG and CEP) (previously described by Kong

et al. (2003) [22]). Some of the peptides had sequences specific for more than one of the three clonal lineages. These peptides are referred to as type I–II, type I–III or type II–III.

Preparation of peptide-microarray slides

Peptides were synthesized and printed on peptide-microarray slides by JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin. First, amino-oxy-acetylated peptides were synthesized on cellulose membranes in parallel using the SPOT synthesis technology [31,32]. After side chain de-protection, the solid phase-bound peptides were transferred into 96-well microtitre filtration plates (Millipore, Bedford, USA) and treated with 200 μ l of aqueous triethylamine (0.5% v/v) to cleave the peptides from the cellulose support. Peptide-containing triethylamine solution was filtered off and the solvent removed by evaporation under reduced pressure. The resulting peptide derivatives (50 nmol) were re-dissolved in 25 μ l printing solution (70% DMSO, 25% 0.2 M sodium acetate pH 4.5, 5% v/v glycerol) and transferred into 384-well microtitre plates. Two droplets of 0.5 nl peptide solution (1 mM) were deposited per spot on epoxy-functionalized glass slides (Corning Epoxy # 40042; Corning, Lowell, USA) using the non-contact printer Nanoplotter (GESIM, Großberkmannsdorf, Germany) equipped with a piezoelectric NanoTip (GESIM). The method for chemoselective immobilization on peptide-microarrays was originally described by Panse and colleagues (2004) [33]. This procedure was further optimized for peptide arrays for serum antibody detection and reviewed by Andresen and Grötzinger (2009) [34]. Chicken IgY, cat, human, mouse and pig IgG (Sigma, Munich, Germany and Diatec, Oslo, Norway) were also printed on the slides as antibody controls at a concentration of 500 μ g/ml in 100 mM PBS buffer, pH 8.0.

The peptide library was spotted on each slide in triplicate. The slide layout consisted therefore of three identical sub-arrays; peptide and control spots were printed in 21 identical blocks. Printed peptide-microarrays were kept at room temperature for 5 h, washed with de-ionised water, quenched for 1 h with 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) in 75 mM saline sodium citrate (SSC) buffer, pH 7.0, containing 0.1% SDS and 750 mM NaCl, at 42°C, washed extensively with 1.5 mM SSC buffer, pH 7.0, followed by washings with de-ionised water and dried using a chip centrifuge (UNIEQUIP Laborgerätebau und Vertriebs GmbH, Planegg, Germany). Resulting peptide-microarrays were stored at 4°C until used.

Examination of sera by peptide-microarray

Array slides were first incubated with blocking solution (PBS, 0.05% Tween 20, 0.2% I-Block [Applied Biosystems, Bedford, MA, USA]) for 30 min. The slides were then placed into a Microplate Microarray Hardware (Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA, USA), which allows to examine arrays separately in a 96 well ELISA format.

Human serum samples (150 μ l/well), diluted 1:200 in blocking solution, were incubated at 37°C for 1 h and washed seven times for 3 min with PBS-T (PBS, pH 7.2; 0.5% Tween 20) on a shaker at room temperature. Conjugate (Cy5-AffiniPure donkey anti-human IgG, Fc γ fragment specific [min X Bov,Hrs,Ms Sr Prot], Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) diluted 1:1000 (1 μ g/ml) was added to the wells (150 μ l/well), incubated at 37°C for 30 min, and washed as indicated above, followed by three additional washing steps, 1 min each, with sterile-filtered MilliQ water. Afterwards, the slides were spun dry for 10 s using a slide spinner (DW-41MA-230, Qualitron Inc/Eppendorf, Berzdorf, Germany).

Scanning and measurement of spot signal intensities and data extraction

Peptide-microarray slides were scanned at a wavelength of 635 nm using a GenePix 4000B microarray scanner (Axon Instruments, Concord, Canada) in a low-noise, high-sensitivity photomultiplier tube (PMT) at a level of 100% and a resolution of 10 μ m. Images were saved electronically in TIFF and JPG formats.

Image analysis was performed using the circular feature alignment of the GenePix Pro 6.0 software (Axon Instruments) and GenePix Array List (GAL) files. Each circular feature consisted of the peptide spot to determine the foreground and a surrounding area to detect the background reaction. The signals from pixels of each circular feature were used to calculate median net fluorescence intensities of both, the foreground and background of each peptide spot [35,36].

Peptide-microarray data analysis

To analyze the raw data (median of signal intensity) in GPR (GenePix Results) files, index values (IVs) were recovered for each peptide-spot as log₂ of the quotient of the medians of foreground and background [35,36]. Each serum was analyzed on a single block with the peptides printed in triplicate in each block. To obtain the serum-specific reaction against each peptide, the means of the IVs for each peptide spot per block (mean sample index value, MSIV) were calculated using the “corrected mean” formula (Microsoft Office EXCEL 2003) to exclude artefacts, i.e. false-positive and -negative signals within the replicas in each block. Application of the “corrected mean” formula had the following effect: If one out of three IVs per sample deviated more than 1.5-fold from the mean of all three IVs, the value was discarded and MSIV was calculated from the two remaining IVs. The peptide-microarrays used in this study failed to meet the criteria required for submission under MIAME based public databases [37,38]. Therefore MSIV for all sera and peptides are presented as supporting information (Table S3).

To ensure the specificity, we established an individual cut-off for each peptide to classify a reaction with this particular peptide as positive or negative using receiver-operating characteristic (ROC) analysis and the serological status of each serum (Table S3) as a reference standard. The cut-off was selected for each peptide separately using the MSIVs obtained for all *T. gondii* seronegative and seropositive human sera and accepting a maximum of 4% false-positive reactions. The results of ROC analysis (specificity, area under ROC curve, sensitivity and cut-off) for each peptide are shown as supporting information (Table S2). Table S4 shows the results of the application of these cut-offs to the MSIV for each serum and each peptide.

Statistical analysis

Fisher’s exact test and logistic regression were computed with R, version 2.8.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>) using packages “Stats” and “Epicalc” respectively [39]. Linear regression and the Wilcoxon rank test were performed using STATISTICA 8 (StatSoft, Tulsa, USA). P-values < 0.05 were regarded as statistically significant. Kappa values were calculated using a web-based program (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm>). To adjust p-values in multiple testing scenarios, Bonferroni correction was used [40].

To establish cut-offs for each peptide, ROC analysis was applied using the R-package “*DiagnosisMed*”.

The R-package “vcd” was used for computing and visualizing log-linear independence models to examine whether reactions with specific peptide cohorts occurred more frequently than with others, i.e. whether the hypothesis of independence had to be rejected. Mosaic plots were used to visualize resulting contingency tables and Pearson residuals. Residuals displayed in mosaic plots represent standardized deviations of observed from expected values calculated by Pearson chi-square. The size of each box within the plot corresponds to the observed frequencies of positive and negative peptide reactions as well as the number of tested peptides within a peptide cohort specific of a clonal type. To present Pearson residuals in mosaic plots, the shading introduced by Friendly et al. (1994) [41] was used. Blue scale shading with a solid blue line (Pearson residuals: >2) or red scale shading with a dashed red line (Pearson residuals: <-2) indicate statistically significant (Pearson chi-squared p-value<0.05) over-, or under-representation of certain clonal type-specific peptide reactions within analyzed groups of sera, respectively (rejection of independence hypothesis). Pearson residuals from -2 to 2 are presented by filling the boxes in white colour, presenting the homogeneous distribution of peptide reaction within certain groups.

To perform multiple comparisons of the MSIVs for the tested peptides as well as for clonal type-specific peptide groups, a Post-Hoc-Test (LSD[Least Significant Difference]-Test) on ANOVA results was applied using the R package “agricolae”. The differences between the means of positive peptide reactions in the analysis of peptide reactivities within tested groups were regarded as significant if the differences were equal to or higher than the LSD values.

Results

Examination for antibodies against *T. gondii* in sera from individuals and seropositive volunteers

All sera of *T. gondii*-infected individuals showed reciprocal LAT titres of 16 to >2048 (Table 1; Fig. 1 [A]). The majority of sera from individuals with an acute *T. gondii* infection (15 of 21; 71%) had reciprocal LAT titres of >256, while the majority of sera from individuals with a latent *T. gondii* infection (31 of 53; 59%) showed reciprocal LAT titres of 16 to ≤256. All sera from seronegative patients (n = 65) had reciprocal LAT titres of <16.

The initial LAT screening of a total of 563 sera of forest workers revealed the presence of antibodies against *T. gondii* in the LAT in 476 (84%) (Table 1). The majority of these sera (351 of 476; 74%) had LAT titres ranging between 16 and ≤256 (Fig. 1 [A]). The

remaining sera (n = 87) were regarded as seronegative (reciprocal LAT titres <16). Volunteers had significantly lower LAT titres than latently or acutely infected patients (Wilcoxon rank test, p-value<0.001). To confirm the LAT results, all volunteer sera were also tested by TgSAG1 immunoblot. Antibodies to TgSAG1 were detected in 485 of 563 (86%) sera. The agreement between the TgSAG1 immunoblot and the LAT was characterized by a kappa value of 0.913.

Logistic regression analysis revealed that seropositivity in volunteers (forest workers) was positively associated with age in both the LAT and the in-house TgSAG1 immunoblot (LAT: OR 1.09 [95% CI: 1.06–1.12], p_{Wald}-value<0.001; TgSAG1 immunoblot: OR 1.07 [95% CI: 1.04–1.1], p_{Wald}-value<0.001).

For further examination in the peptide-microarray, 100 volunteer sera which had tested *T. gondii* positive in both assays and 75 volunteer sera with negative results in both *T. gondii* tests were selected randomly. Seropositive and seronegative volunteers were interviewed during sampling to obtain information about their health status. None of the volunteers included in this study reported signs of acute toxoplasmosis.

Diagnostic specificity and sensitivity of peptide-microarray testing in seronegative and seropositive sera

All sera of seronegative patients and volunteers (n = 140) as well as sera from seropositive patients and volunteers (n = 174) were used to establish peptide-specific cut-offs by ROC analysis. The serological status of patients and volunteers was based on LAT results as a reference standard (Table S3). Application of these cut-offs revealed peptide-dependent diagnostic specificities for the *T. gondii*-negative sera which ranged between 96% and 97% (Table S2). A total of 174 sera, including all seropositive sera from patients (21 with acute and 53 with latent *T. gondii* infection) and 100 randomly selected sera from seropositive volunteers were tested on the peptide-microarray (Table S5). Twenty-two of these 174 (12.6%) seropositive sera failed to recognize any of the 54 peptides. All non-reactive sera had low LAT titres, i.e. showed reciprocal LAT titres between 16 and ≤256.

Sera of patients with an acute *T. gondii* infection recognized a significantly higher number of peptides than the sera of seropositive volunteers (Wilcoxon Rank Test, p-value = 0.012). Also sera of patients with a latent *T. gondii* infection reacted with a statistically significantly higher number of peptides than the sera of seropositive volunteers (Wilcoxon Rank test, p-value = 0.017). The differences between individuals with acute and latent *T. gondii* infections were not statistically significant (Wilcoxon rank test, p-value = 0.256). Linear regression analysis revealed that the number

Table 1. Results in the Latex-Agglutination-Test (LAT) for sera from groups of seropositive and seronegative individuals with acute or latent toxoplasmosis including patients from clinics and volunteers (forest workers).

Group	Infection status	LAT titre									
		<16	16	32	64	128	256	512	1024	2048	>2048
Patients (n = 21)	Acute*		1		1	1	3	4	3	4	4
Patients (n = 53)	Latent#		1	1	7	10	12	3	8	1	10
Volunteers (n = 476)	Positive ^Ω		22	44	79	111	95	76	35	9	5
Patients/Volunteers (n = 152)	Negative	152									

*Transient detection of *T. gondii* specific IgM and eventually IgA was regarded as an indication of acute infection.

#Presence of IgG and absence of IgM/IgA was regarded as an indication for persistent but inactive (latent) infection. In a few patients a persistent IgM response was demonstrated by repeated testing. For these patients, a persistent but inactive (latent) infection was assumed.

^ΩAntibody isotypes not specified.

doi:10.1371/journal.pone.0034212.t001

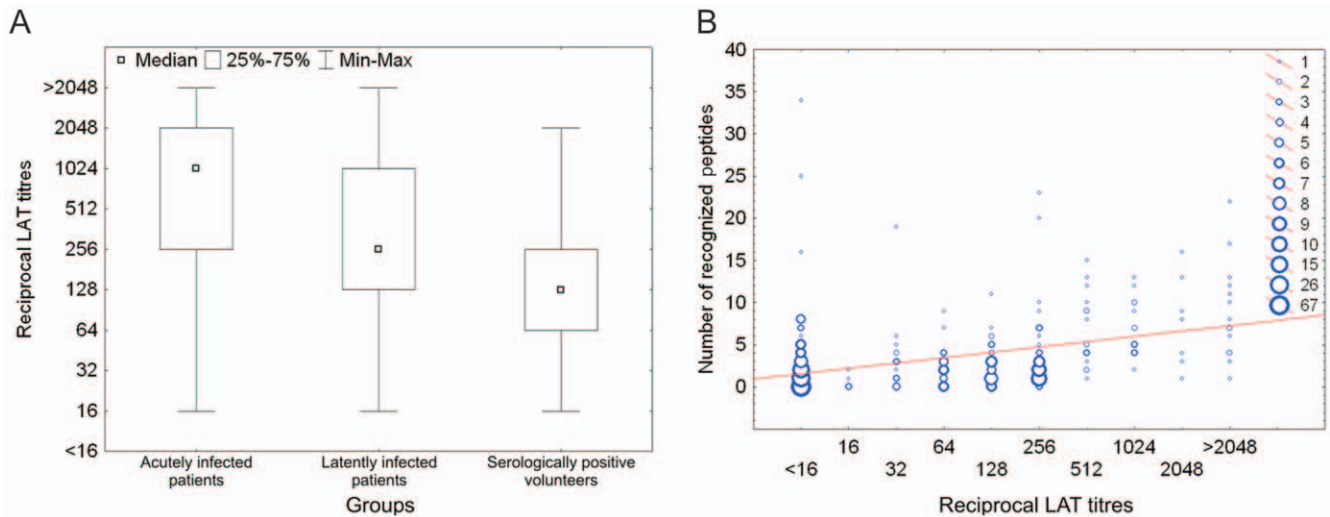


Figure 1. The number of recognized peptides is associated with the titre in LAT (Latex Agglutination Test). Wilcoxon rank test analysis of the *T. gondii* LAT titre distribution within groups of human sera revealed significantly lower LAT titres in sera from volunteers than in sera from latently or in acutely infected individuals (p -value<0.001). No significant differences were observed between sera from acutely and latently infected individuals (A). The association between LAT titre and number of recognized peptides was characterized by an R^2 value of 0.16 (p -value<0.001) (B). doi:10.1371/journal.pone.0034212.g001

of recognized peptides was statistically significantly associated with the log₂-transformed reciprocal LAT titres (p -value<0.001). This association was characterized by an R^2 value of 0.16 (Figure 1 [B]).

Type-specificity of peptide reactions

In total 9396 (54 peptides×174 sera) peptide reactions were possible: 2436 (14 peptides×174 sera) type I-specific, 2436 (14 peptides×174 sera) type II-specific, 1044 (6 peptides×174 sera) type III-specific, 696 (4 peptides×174 sera) type I-II-, 1740 (10 peptides×174 sera) type I-III-, and 1044 (6 peptides×174 sera) type II-III-specific. In total, 731 of 9396 (8%) possible peptide reactions were observed. Positive reactions were predominantly directed against type II-specific and the type II-III-specific peptides (proportions of peptide reactions 14% [336/2436] and 10% [106/1044], respectively). The positive reactions against type I- (116/2436 [5%]), type III- (41/1044 [4%]), type I-II- (30/696 [4%]) or type I-III-specific (102/1740 [6%]) peptides were underrepresented.

Reactions within clonal type-specific peptide groups were statistically analyzed using a log-linear model. Contingency tables and deviations from independence hypothesis were visualized in mosaic plots (Fig. 2 [A, B, C, D]). Pearson residuals >4 indicated a statistically significant (Chi-squared p -value<0.001) overrepresentation of positive clonal type II-specific peptide reactions within all groups of sera (Fig. 2 [A, B, C, D]). In latently infected patients, type II-III-specific positive peptide reactions were also statistically significantly overrepresented (Pearson residuals: 2–4; Chi-squared p -value<0.05) (Fig. 2 [B]). In patients with an acute infection and in volunteers reactions with type II-III-specific peptides were also overrepresented (white rectangle with solid blue borderline), however, the hypothesis of independence could statistically not be rejected (Fig. 2 [A, C]). Reactions with peptides of type I, III, I-III and I-II were underrepresented in all tested groups of sera (Fig. 2 [A, B, C, D]).

Of 35 dense granule-derived peptides, 7 were recognized by 16%–42% of the sera (Table S5). The majority of these peptides ($n = 5$) had amino acid sequences specific for type II (dGRA6-II-216(9), GRA3-II-28, GRA6-II-214, dGRA6-II-214, GRA7-II-225; Table S5). The amino acid sequences of the remaining two

peptides were specific for both, clonal types I and III (GRA3-I/III-28) or had a sequence specific for clonal type I (NTP3-I-99). Two other dense granule peptides were recognized by 10–11% of the sera. One of these peptides had a type II-specific (dGRA6-II-214(9)) and the other peptide a type I-II-specific (GRA7-I/II-215) amino acid sequence.

Only one of 15 surface antigen-derived (SAG3-II-49) and one of six rhoptry-derived (ROP1-II/III-181) peptides with type II and type II-III specificity were recognized by more than 15% of the sera (Table S5). One rhoptry (ROP1-II/III-359) and none of the remaining surface-derived peptides were among those recognized by 10–15% of the sera.

Differences in intensity of type-specific peptide reactions

To detect differences between reaction intensities (MSIVs) for each tested peptide and for peptide groups presenting clonal type specificity in seropositive patients and volunteers, ANOVA and the LSD-Post-Hoc-Test were performed (Fig. 3). The analyses revealed that for the groups of acutely and latently infected patients, those peptide groups mimicking clonal type II and II-III specificities were recognized by the highest MSIVs as compared to the remaining peptide groups. These differences were statistically significant (LSD>0.36, p -value<0.05 [for acutely infected patients]; LSD>0.16, p -value<0.05 [for latently infected patients]) (Fig. 3 [A, C]). In volunteers, the clonal type II-specific peptide group was also recognized by the highest MSIVs as compared to remaining peptide groups. The difference was statistically significant (LSD>0.102, p -value<0.05 [for seropositive volunteers]) (Fig. 3 [E]).

The intensity of index values was also analysed for each peptide in patient groups with acute or latent *T. gondii* infection and in seropositive volunteers.

Peptides derived from dense granule antigens mimicking type II specificity (GRA6-II-214, dGRA6-II-214, dGRA6-II-216(9)) and one type II-III rhoptry derived peptide (ROP-II/III-181) were detected by the highest MSIVs in all patient and volunteer groups. The differences were statistically significant (LSD>0.67, p -value<0.05 [for acutely infected patients]; LSD>0.36, p -value<0.05 [for latently infected patients]; LSD>0.24, p -value<0.05 [for seropositive volunteers]) (Fig. 3 [B, D, F]).

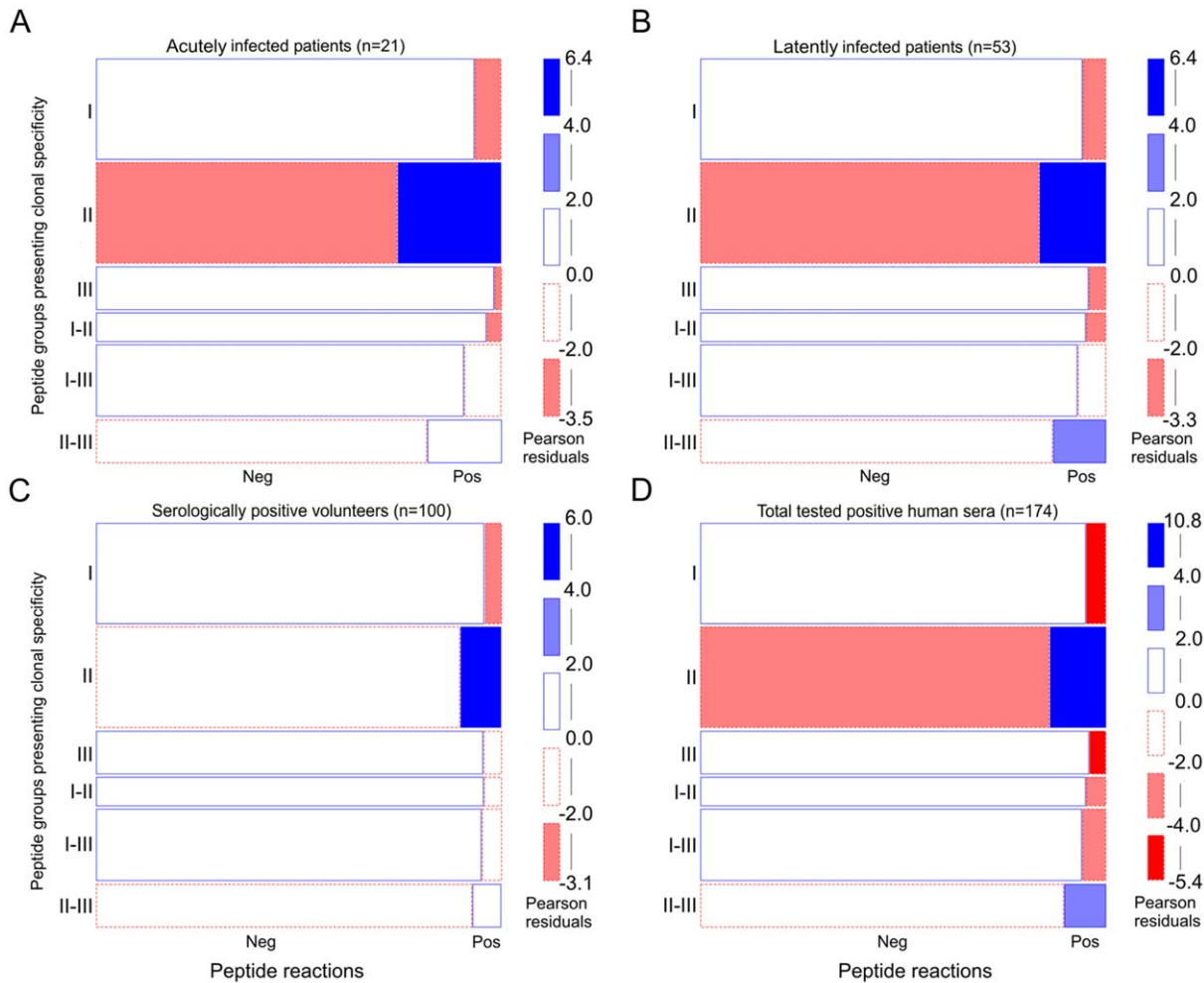


Figure 2. Statistically significant overrepresentation of reactions against clonal type II specific peptides. To determine whether reactions against certain clonal type-specific peptide cohorts (I, II, III, I-II, I-III, or II-III) were over- or underrepresented in various groups of *T. gondii* positive human sera a log-linear model analysis was performed and visualized by mosaic plot: acutely infected individuals (A), latently infected individuals (B) serologically positive volunteers (forest workers) (C) and all tested positive human sera (D). The size of each box corresponds to the observed frequencies of positive (Pos) and negative (Neg) peptide reactions as well as the number of tested peptides within each clonal type-specific peptide cohort. Pearson residuals represent standardized deviations of observed from expected values. The solid blue line indicates that the number of positive or negative reactions is higher than expected but not statistically significant. Blue scale shadings suggest the statistically significant rejection of the null hypothesis, i.e. overrepresentation of certain type-specific peptide reactions (Pearson chi-squared p -value < 0.05). Dashed red lines indicate an underrepresentation of positive or negative peptide reactions which is not statistically significant. Red scale shadings suggest a statistically significant rejection of the null hypothesis, i.e. underrepresentation of peptide reactions within tested peptide and human groups (Pearson chi-squared p -value < 0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0034212.g002

In patients with acute and latent toxoplasmosis, two further type II-specific peptides (GRA3-II-28, GRA7-II-225) were also detected by the highest MSIVs (LSD > 0.67 , p -value < 0.05 [acutely infected patients]; LSD > 0.36 , p -value < 0.05 [Latently infected patients]) (Fig. 3 [B, D]).

GRA3-I/III-28 and SRS-I-53 peptides also belong to the peptide group recognized by the highest MSIVs in acutely *T. gondii*-infected patients and in seropositive volunteers (LSD > 0.67 , p -value < 0.05 [acutely infected patients]; LSD > 0.24 , p -value < 0.05 [for seropositive volunteers]) (Fig. 3 [B, F]).

Differences in number of anti-peptide reactions between groups of sera

In all sera from patients and volunteers, reactions against type II dense granule based peptides (GRA3-II-28, GRA6-II-214, GRA7-II-225) and a type II-III rhopty peptide (ROP1-II/III-181)

dominated, i.e. these peptides reacted with more than 20% of the sera (Table S5).

In addition, further peptides were recognized by more than 20% of the sera of patients with acute toxoplasmosis (dGRA6-II-216(9)) but not by those of seropositive volunteers and patients with latent infection. More than 20% of the sera from patients with latent infection recognized a type II surface antigen-derived peptide (SAG3-II-49), but those of volunteers and individuals with acute toxoplasmosis failed to react with this peptide in a proportion of $> 20\%$. Two dense granule-based peptides (dGRA6-II-214, GRA3-I/III-28) were recognized by more than 20% of the patients sera (acute, latent), but not by those of seropositive volunteers.

No major differences within each peptide category were observed between the different groups of persons (Table S6), with three exceptions. Individuals with acute toxoplasmosis recognized

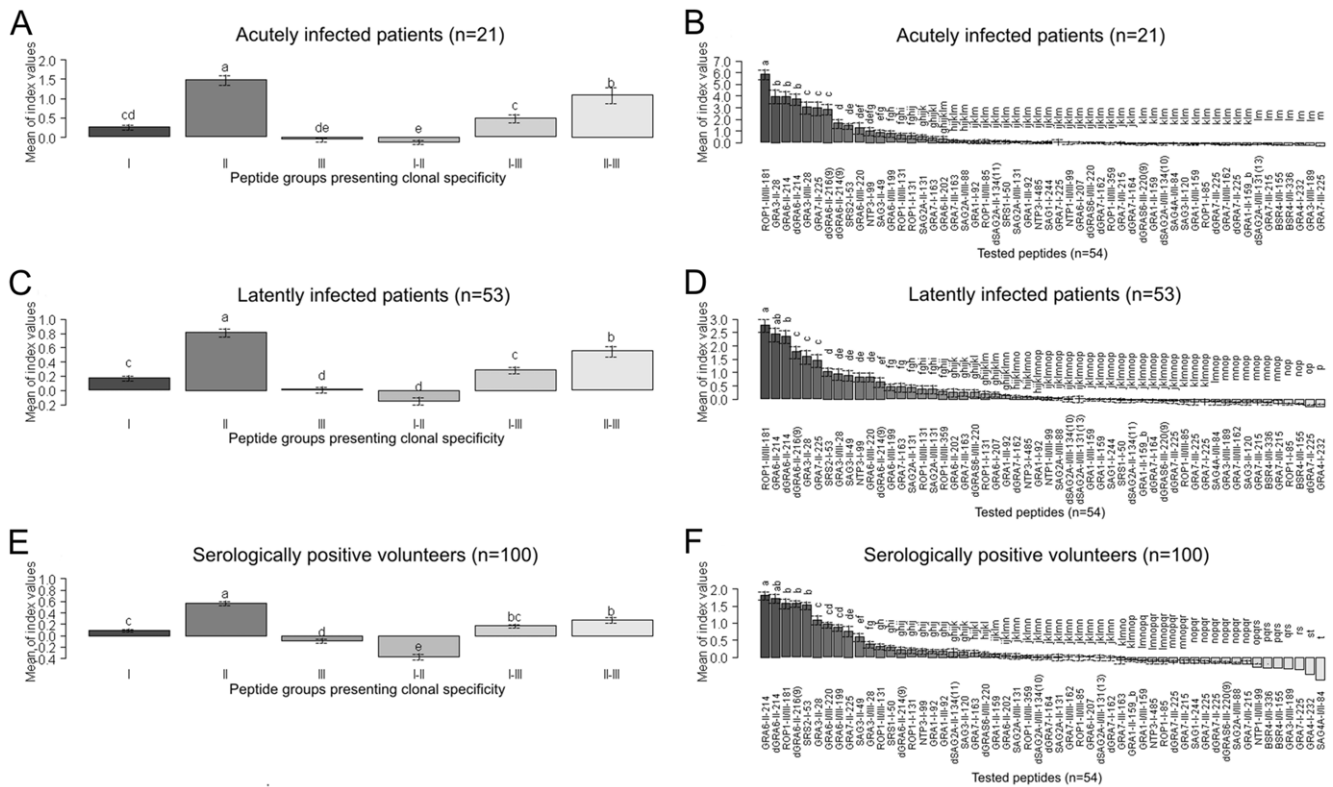


Figure 3. Strongest reaction intensities were recorded for clonal type II specific peptides. To evaluate the intensities (MSIVs) by which single peptides as well as peptide cohorts (I, II, III, I-II, I-III, or II-III) were recognized by *T. gondii* seropositive patient and volunteer groups, ANOVA and the Least Significant Difference (LSD)-Post-Hoc-Test were performed. Whiskers in barplots represent 95% confidence intervals of the means of MSIVs. The differences between the means of MSIVs for single peptides or peptide cohorts within tested groups were regarded as statistically significant, when the differences were equal or higher than the LSD values. Different letters above the whiskers indicate significant differences between the mean intensities in the Post-Hoc-LSD test. Means of MSIVs for each peptide cohort are presented in (A) for the acutely infected patient group (LSD>0.36, p-value<0.05); in (C) for the latently infected patient group (LSD>0.16, p-value<0.05); and in (E) for the seropositive volunteer group (LSD>0.10, p-value<0.05). Means of MSIVs for each single peptide are presented in (B) within the acutely infected patient group (LSD>0.67, p-value<0.05); in (D) within the latently infected patient group (LSD>0.36, p-value<0.05); and in (F) within the seropositive volunteer group (LSD>0.24, p-value<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0034212.g003

a significantly higher proportion of peptides with type II-specific sequences than volunteers (p-value = 1.87×10^{-11} ; Fisher's exact test; Table S6) and latently infected patients, (p-value = 8.24×10^{-11}). Latently infected patients recognized a significantly higher proportion of peptides with type II-specific sequences than seropositive volunteers (p-value = 2.98×10^{-5} , Fisher's exact test; Table S6). Acutely and latently infected patients recognized a significantly higher proportion of peptides with type II-III specificity as compared to volunteers (p-value = 0.00021, p-value = 0.0036; Fisher's exact test; Table S6).

Peptide-microarray-based serotyping

Data analysis was carried out to identify the clonal types responsible for the infection of the tested persons and to analyse potential type-specific differences in the peptide spectra recognized by individuals presenting acute or latent *T. gondii* infection and seropositive volunteers.

The majority (n = 124; 71%) of sera showed reactions against synthetic peptides with sequences specific for clonal type II (type II peptides) (Table 2). Forty-two percent (n = 73) or 16% (n = 28) of the sera reacted with type I and type III peptides, respectively, while type II-III, type I-III or I-II peptides were recognized by 49% (n = 85), 36% (n = 62) or 14% (n = 25) sera, respectively.

Based on the anti-peptide reactions, only a fraction of sera could be clearly attributed to either of the three clonal types I, II, or III (Table 3). Among sera that reacted with peptides containing type II specific sequences, 35% (50/142) showed reactions exclusively compatible with clonal type II (Table 3). The remaining 65% (92/142) reacted not only with type II peptides but also with peptides with sequences specific for other clonal types. Most sera reacting with type I and type III peptides could not be clearly assigned to one of the three clonal lineages as many of them also recognized peptides with sequences specific for the other clonal types (Table 3).

Discussion

A number of polymorphic peptides has been described in *T. gondii* antigens which might be suitable to indirectly determine the clonal type of *T. gondii*, humans or mice are infected with [22]. Using such peptides, we tested sera from seropositive volunteers and patients from Germany, to obtain insights into the clonal types of *T. gondii* by which these humans were infected and to examine potential differences in the spectra of peptides recognized by sera of various subgroups.

Several attempts have been made to type *T. gondii* infections by serological techniques using ELISA formats in which synthetic peptides were coupled via keyhole limpet hemocyanin [22,42] or

Table 2. Clonal type-specific anti-peptide reactivity of *T. gondii* positive humans.

Peptide specificity	Acute patients (n = 21)		Non-acute patients (n = 53)		Volunteers (forest workers) (n = 100)		Total (n = 174)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
I	9	43	26	49	38	38	73	42
II	19	91	38	72	67	67	124	71
III	2	10	8	15	18	18	28	16
I-II	2	10	9	17	14	14	25	14
I-III	15	71	19	36	28	28	62	36
II-III	19	91	30	57	36	3	85	49

Reactions are sorted according to the specificities of peptides.

doi:10.1371/journal.pone.0034212.t002

directly to the solid phase [24,25,43,44]. Others used recombinant antigens for serotyping [23,26]. We applied a synthetic peptide-microarray format to test a panel of sera simultaneously with all peptides that had previously been used in an ELISA by Kong et al. (2003) [22]. In studies on other infectious diseases, Melnyk et al. (2002) [45] and Mezzasoma et al. (2002) [46] compared peptide-ELISAs with peptide-microarrays and found that peptide-microarrays were much more sensitive than peptide-ELISAs. We therefore expected for the serological typing of *T. gondii* infections that the microarray format should have at least the same sensitivity as the previously reported ELISA format. To ensure a minimum diagnostic specificity of 96% for each peptide, i.e. to make sure that it is unlikely that *T. gondii*-negative humans react with any of these peptides, an individual cut-off was selected for each peptide based on the foreground-background ratio obtained for each peptide and the sera of 140 *T. gondii* seronegative humans.

By conventional techniques, i.e. by PCR-RFLP mediated genotyping using polymorphic loci, we have previously shown that almost all *T. gondii* parasites isolated from cats in Germany showed an allele combination resembling that of clonal type II [47,48]. Only a single clonal type III isolate and a few isolates with allele combinations different from those of clonal type I, II or III were observed [47]. We therefore expected that the majority of sera from seropositive humans from Germany would recognize peptides with type II-specific amino acid sequences. This turned out to be true since reactions with type II peptides were superior compared to reactions with other peptides in number as well as in intensity. Thus our results are in accord with the results of serotyping studies performed in France and Poland with a limited number (i.e. 8 or 2, respectively) of those 54 peptides we applied (GRA6-II-214, GRA6-I/III-220, dGRA6-II-214, dGRAS6-I/III-220, GRA7-II-225, GRA7-III-225, dGRA7-II-225, dGRA7-III-

225) [42,43]. In addition, our findings confirm the results of studies from Peyron et al. (2006) and Morisset et al. (2009) with recombinant polypeptides mimicking polymorphic clonal type-specific sites of *T. gondii* GRA5 and GRA6 which revealed a significantly dominant clonal type II-specific serological response in patients from France, Italy and Denmark [23,26].

Although reactions with type II-specific peptides dominated in number and intensity in our study, the sera of many of these humans reacted also with a few peptides with sequences specific for other clonal types. As it is unlikely that all these individuals experienced mixed infections or infections with atypical *T. gondii*, these conflicting results were probably due to the limited specificity of some of the peptides used in serotyping. In these cases, the clonal type of *T. gondii* the affected persons were infected with could not be unambiguously determined. One reason for a low discriminatory power of individual peptides might be the presence of at least one further epitope in the non-polymorphic part of the peptide in addition to the type-specific epitope in the polymorphic site [22,23]. Therefore, our results suggest that a large panel of well characterized human sera is needed to determine the specificity of each polymorphic peptide. The peptides that are finally used to differentiate clonal type-specific antibody reactions in individuals must be selected extremely carefully. Unfortunately, well-characterized human sera suitable for the evaluation of peptides are rare.

The results of this study also show that the sensitivity by which peptides were recognized varied considerably between the examined groups of patients or volunteers, respectively. For instance, individual type II-specific peptides were recognized by 1% to 42% of the sera.

Each individual serum recognized an almost unique spectrum of peptides. This may reflect an individual maturation of particular

Table 3. Proportion of human sera showing peptide reactions compatible with *T. gondii* infections by clonal types I, II, or III.

	Sera with anti-peptide reactions exclusively compatible with the respective clonal type				Sera with anti-peptide reactions not exclusively compatible with the respective clonal type			
	Total (%)	AP (%)*	LP (%)*	V (%)*	Total (%)	AP (%)*	LP (%)*	V (%)*
Clonal type I	11 (11)	0 (0)	5 (15)	6 (12)	89 (89)	15 (100)	28 (85)	46 (88)
Clonal type II	50 (35)	5 (25)	16 (36)	29 (37)	92 (65)	15 (75)	28 (64)	49 (63)
Clonal type III	12 (13)	1 (6)	5 (17)	6 (13)	80 (87)	15(94)	25 (83)	40 (87)

Reactions are sorted according to their compatibility with infections of *T. gondii* of the clonal type I, II, or III.

*Data resolved for seropositive patients with acute toxoplasmosis (AP), patients with latent toxoplasmosis (LP) and seropositive volunteers (V).

doi:10.1371/journal.pone.0034212.t003

plasma cells leading to an increased affinity of the antibodies they produce against different antigens or epitopes of *T. gondii*. The variation in the sensitivity of peptide recognition by different groups of infected persons may be further influenced by a variety of variables, e.g. host-genetic factors, route of infection, secondary infections and time of primary infection [17,18,49].

We also found a statistically significant association between the LAT titre and the number of recognized peptides, with the LAT titres explaining 16% of the variability in the number of recognized peptides. Consequently, groups of humans showing differences in mean LAT titres showed similar differences in the number of peptides recognized in the microarray analysis. For instance, sera of patients with an acute *T. gondii* infection had a significantly higher mean LAT titre (Fig. 1 [A]) and recognized a significantly higher number of peptides than sera of seropositive volunteers.

In this study, 13% of the LAT positive sera did not react with any of the 54 peptides used. A previous study, in which two ELISAs with peptides presenting clonal type II and I–III specificity (GRA6-II-214, GRA6-I/III-220) were used, revealed that more than 30% of seropositive sera from Europe (France and Portugal) failed to react in these peptide ELISAs [43]. Sousa and colleagues (2009) suggested that the use of single peptides for serotyping could lead to mistyping. To overcome this problem, a large pool of polymorphic peptides from different antigens should be used [24]. Although we applied a much higher number of peptides as compared to these previous studies, we also observed a high proportion of sera that reacted only with a low number of peptides.

Individual peptides were only recognized by a limited number of sera. GRA6-II-214, for example, has previously been used in a number of other typing studies [22,24,25,41]. This peptide was recognized only by 31% of all tested *T. gondii* antibody positive sera. The truncated variations of this peptide (dGRA6-II-214; dGRA6-II-214(9); dGRA6-II-216(9)) were recognized by even lower proportions of *T. gondii* antibody-positive sera (19%, 10% and 18%, respectively). Therefore, the results of our study show that the sensitivity of individual peptides might be low and, consequently, allow to conclude that serotyping with synthetic peptides requires a large number of highly specific polymorphic peptides.

Our results clearly showed that peptides derived from dense granule proteins, i.e. GRA3, GRA6, and GRA7, were the most reactive ones when tested with human sera. Of 35 dense granule-derived peptides, 7 were recognized by more than 15% of the examined human sera. None of the 15 surface antigen-derived peptides and only 1 of 6 rhoptry antigen-derived peptides rendered a similar result. This finding is in accord with the high potential of dense granule proteins as diagnostic antigens [50,51,52,53].

In our study, a higher proportion of acutely infected patients recognized GRA6 and GRA3 derived peptides as compared to individuals with latent *T. gondii* infection (Table S5). This is in accord with previous results of others who showed that it is possible to discriminate between acute and chronic *T. gondii* infections by using recombinant GRA6 or GRA7 [54,55,56].

References

- Janitschke K, Held T, Krueger D, Schwerdtfeger R, Schlier G, et al. (2003) Diagnostic value of tests for *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in patients undergoing bone marrow transplantation. *Clin Lab* 49: 239–242.
- Montoya JG, Liesenfeld O (2004) Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965–1976.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R (2001) Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 56: 296–305.
- Howe DK, Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172: 1561–1566.
- Howe DK, Honor S, Derouin F, Sibley LD (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35: 1411–1414.

In conclusion, the results of this study demonstrate that a peptide-microarray assay can be used to detect *T. gondii* clonal type-specific antibody responses in seropositive humans. A previous study suggested that individuals in the study area were mainly exposed to clonal type II *T. gondii* [47,48]. Indeed, positive peptide reactions presenting clonal type II specificity were statistically significantly overrepresented in the tested human population and the intensity by which type II peptides were recognized was significantly higher than the intensity by which peptides with other specificities were detected. However, to establish serotyping assays with higher resolution, well-characterized reference sera and further specific peptide markers are needed.

Supporting Information

Table S1 Detailed serological results for patient sera. (XLS)

Table S2 Peptides with clonal type specific amino-acid sequences used for typing the anti-*T. gondii* IgG response in humans. (DOC)

Table S3 Corrected mean sample index values (signal intensity) listed for all peptides and sera. (XLS)

Table S4 Serum-peptide reactions as determined by peptide specific cut-offs for all tested peptides and sera. Positive reactions are signed as original index value and negative reactions signed as “0”. (XLS)

Table S5 Number of sera from seropositive patients and volunteers (forest workers) recognizing peptides with clonal type-specific amino acid sequences. (DOC)

Table S6 Statistical analysis (Fisher’s exact test) of differences in the proportion of peptides recognized by different groups of toxoplasmosis patients (acute, latent) or seropositive volunteers (forest workers). (DOC)

Acknowledgments

We acknowledge the excellent technical assistance of Andrea Bärwald, Lieselotte Minke and Robert Carus. We would like to thank D. C. Herrmann for his critical comments on the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PM JZ UG WD FJC GS. Performed the experiments: PM JZ AM AH KS WD SW ON EP MM. Analyzed the data: PM GS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JZ AH UG KS WD SW ON EP MM RGU FJC GS. Wrote the paper: PM FJC GS.

6. Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Darde ML (2002) Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32: 27–38.
7. Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM (2009) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2749–2761.
8. Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, et al. (2011) Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol* 41: 645–55.
9. Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Lehmann T, et al. (2003) *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. *J Parasitol* 89: 1060–1062.
10. Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, et al. (2005) Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J Clin Microbiol* 43: 5881–5887.
11. Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, et al. (2009) Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 199: 1155–67.
12. Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Darde ML (2009) Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 15: 656–658.
13. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP (2001) Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 184: 633–639.
14. Sibley LD, Boothroyd JC (1992) Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82–85.
15. Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD (2002) Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10753–10758.
16. Boothroyd JC, Grigg ME (2002) Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5: 438–442.
17. Suzuki Y (2002) Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 185 Suppl 1: S58–S65.
18. Suzuki Y (1999) Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology* 201: 255–271.
19. Holland GN (2004) Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol* 137: 1–17.
20. Saeji JP, Boyle JP, Boothroyd JC (2005) Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21: 476–481.
21. Jamieson SE, Cordell H, Petersen E, McLeod R, Gilbert RE, et al. (2009) Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 162–169.
22. Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC (2003) Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis* 187: 1484–1495.
23. Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, et al. (2006) Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect* 8: 2333–2340.
24. Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, et al. (2009) Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clin Vaccine Immunol* 16: 1158–1169.
25. Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Darde ML (2010) Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol* 169: 24–28.
26. Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, et al. (2008) Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect* 10: 742–747.
27. Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, et al. (1994) 2 Alleles of the Gene Encoding Surface-Antigen P22 in 25 Strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 80: 293–301.
28. Grigg ME, Suzuki Y (2003) Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes Infect* 5: 685–690.
29. Mertens M, Hofmann J, Petraityte-Burneikiene R, Ziller M, Sasnauskas K, et al. (2011) Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses. *Med Microbiol Immunol* 200: 263–8.
30. Hosseini-nejad M, Azizi HR, Hosseini F, Schares G (2009) Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for serodiagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Vet Parasitol* 164: 315–319.
31. Wenschuh H, Volkmer-Engert R, Schmidt M, Schulz M, Schneider-Mergener J, et al. (2000) Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* 55: 188–206.
32. Frank R, Overwin H (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 66: 149–169.
33. Panse S, Dong L, Burian A, Carus R, Schutkowski M, et al. (2004) Profiling of generic anti-phosphopeptide antibodies and kinases with peptide microarrays using radioactive and fluorescence-based assays. *Mol Divers* 8: 291–9.
34. Andresen H, Grötzinger C (2009) Deciphering the antibodyome - peptide arrays for serum antibody biomarker diagnostics. *Curr Proteomics* 6: 1–12.
35. Ngo Y, Advani R, Valentini D, Gaseitsiwe S, Mahdaviifar S, et al. (2009) Identification and testing of control peptides for antigen microarrays. *J Immunol Methods* 343: 68–78.
36. Nahtman T, Jernberg A, Mahdaviifar S, Zerweck J, Schutkowski M, et al. (2007) Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. *J Immunol Methods* 328: 1–13.
37. Vigil A, Ortega R, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Tan X, et al. (2010) Identification of the feline humoral immune response to *Bartonella henselae* infection by protein microarray. *PLoS one* 5: e11447.
38. Pamelard F, Even G, Apostol C, Preda C, Dhaenens C, et al. (2009) PASE: a web-based platform for peptide/protein microarray experiments. *Methods Mol Biol* 570: 413–430.
39. Dominguez-Almendros S, Benitez-Parejo N, Gonzalez-Ramirez AR (2011) Logistic Regression Models. *Allergol Immunopathol (Madr.)* 39: 295–305.
40. Bland JM, Altman DG (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *B M J* 310: 170.
41. Friendly M (1994) Mosaic Displays for Multiway Contingency-Tables. *J A S A* 89: 190–200.
42. Nowakowska D, Colon I, Remington JS, Grigg M, Golab E, et al. (2006) Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 44: 1382–1389.
43. Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Darde ML (2008) Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1380–1386.
44. Xiao J, Buka SL, Cannon TD, Suzuki Y, Viscidi RP, et al. (2009) Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes Infect* 11: 1011–1018.
45. Melnyk O, Duburcq X, Olivier C, Urbes F, Auriant C, et al. (2002) Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays. *Bioconjug Chem* 13: 713–720.
46. Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, Rossi R, Bistoni F, et al. (2002) Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 48: 121–130.
47. Herrmann DC, Pantchev N, Globokar-Vrhovec M, Barutzki D, Wilking H, et al. (2010) Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int J Parasitol* 40: 285–292.
48. Schares G, Globokar-Vrhovec M, Pantchev N, Herrmann DC, Conraths EJ (2008) Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Vet Parasitol* 152: 34–45.
49. Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y (1996) Association of CD4(+) T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184: 597–607.
50. Cesbron-Delauw MF (1994) Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 10: 293–296.
51. Jacobs D, Vercammen M, Saman E (1999) Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 24–29.
52. Lecordier L, Fourmaux MP, Mercier C, Dehecq E, Masy E, et al. (2000) Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 607–611.
53. Beghetto E, Spadoni A, Buffolano W, Del Pezzo M, Minenkova O, et al. (2003) Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *Int J Parasitol* 33: 163–173.
54. Redlich A, Müller WA (1998) Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res* 84: 700–706.
55. Hiszyczynska-Sawicka E, Brillowska-Dabrowska A, Dabrowski S, Pietkiewicz H, Myjak P, et al. (2003) High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 27: 150–157.
56. Golkar M, Azadmanesh K, Khoshkholgh-Sima B, Babie J, Mercier C, et al. (2008) Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61: 31–9.

8.2 Publikation 2

**Peptide Microarray Analysis of *In Silico*
-Predicted Epitopes for Serological
Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection
in Humans**

Pavlo Maksimov, Johannes Zerweck, Aline Maksimov,
Andrea Hotop, Uwe Groß, Uwe Pleyer, Katrin Spekker,
Walter Däubener, Sandra Werdermann, Olaf Niederstrasser,
Eckhardt Petri, Marc Mertens, Rainer G. Ulrich, Franz J.
Conraths and Gereon Schares

Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19(6):865. DOI:
10.1128/CVI.00119-12.

Published Ahead of Print 11 April 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://cvi.asm.org/content/19/6/865>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

<http://cvi.asm.org/content/suppl/2012/05/29/CVI.00119-12.DC1.html>

REFERENCES

This article cites 58 articles, 15 of which can be accessed free
at: <http://cvi.asm.org/content/19/6/865#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

Peptide Microarray Analysis of *In Silico*-Predicted Epitopes for Serological Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans

Pavlo Maksimov,^a Johannes Zerweck,^b Aline Maksimov,^a Andrea Hotop,^c Uwe Groß,^c Uwe Pleyer,^d Katrin Spekker,^e Walter Däubener,^e Sandra Werdermann,^f Olaf Niederstrasser,^g Eckhardt Petri,^h Marc Mertens,ⁱ Rainer G. Ulrich,ⁱ Franz J. Conraths,^a and Gereon Schares^a

Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Wusterhausen, Germany^a; JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany^b; Department of Medical Microbiology and National Consulting Laboratory for Toxoplasma, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany^c; Department of Ophthalmology, Campus Virchow Klinikum, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany^d; Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany^e; Institut für Arbeits- und Sozialhygiene Stiftung, Kyritz, Germany^f; Helios Kliniken, Bad Saarow, Germany^g; Novartis Vaccines and Diagnostics, Marburg, Germany^h; and Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Greifswald-Insel Riems, Germanyⁱ

Toxoplasma gondii infections occur worldwide in humans and animals. In immunocompromised or prenatally infected humans, *T. gondii* can cause severe clinical symptoms. The identification of specific epitopes on *T. gondii* antigens is essential for the improvement and standardization of the serological diagnosis of toxoplasmosis. We selected 20 peptides mimicking linear epitopes on GRA1, GRA2, GRA4, and MIC3 antigenic *T. gondii* proteins *in silico* using the software ABCpred. A further 18 peptides representing previously published epitopes derived from GRA1, SAG1, NTPase1, and NTPase2 antigens were added to the panel. A peptide microarray assay was established to prove the diagnostic performance of the selected peptides with human serum samples. Seropositive human serum samples ($n = 184$) were collected from patients presenting with acute toxoplasmosis ($n = 21$), latent *T. gondii* infection ($n = 53$), and inactive ocular toxoplasmosis ($n = 10$) and from seropositive forest workers ($n = 100$). To adjust the cutoff values for each peptide, sera from seronegative forest workers ($n = 75$) and patients ($n = 65$) were used. Univariate logistic regression suggested the significant diagnostic potential of eight novel and two previously published peptides. A test based on these peptides had an overall diagnostic sensitivity of 69% (100% in ocular toxoplasmosis patients, 86% in acutely infected patients, 81% in latently infected patients, and 57% in seropositive forest workers). The analysis of seronegative sera performed with these peptides revealed a diagnostic specificity of 84%. The results of our study suggest that the use of a bioinformatic approach for epitope prediction in combination with peptide microarray testing is a powerful method for the selection of *T. gondii* epitopes as candidate antigens for serological diagnosis.

Toxoplasma gondii is a widespread protozoan parasite. The seroprevalence of *T. gondii* infection in humans varies depending on the region or country and is reported to usually range from 30% to 60% in women of child-bearing age (17, 56). The infection is associated with a large spectrum of clinical diseases in both humans and animals. The progression and severity of toxoplasmosis are variable, presumably due to a combination of host and parasite factors (37, 55).

Infection of immunocompromised individuals or prenatally infected persons with the parasite can have severe consequences (43). Congenital transmission from a nonimmune mother to the fetus may cause abortion or may result in the birth of a prenatally infected child. Clinical signs of toxoplasmosis may be evident at birth (e.g., neurological disorders) but can also develop later (e.g., retinochorioiditis). In immunocompetent individuals, *T. gondii* infection often occurs unnoticed, eventually being associated with lymphadenitis or other flu-like symptoms, but may also cause infectious retinochorioiditis, accounting for 30% to 50% of all cases of posterior uveitis (15, 30).

Serological methods play a major role in the diagnosis of toxoplasmosis. Assays for the detection of *T. gondii*-specific antibodies are often based on crude antigen extracts (e.g., tachyzoite lysates) or purified native antigenic proteins such as the major surface antigen SAG1 (12, 18, 20, 38). Production of these native antigens is limited, and amounts are difficult to standardize. To avoid these limitations, recombinant antigens were produced and successfully applied in diagnostic assays (32). Potential contaminations with

proteins of the organisms used for the production of recombinant antigens (e.g., *Escherichia coli*) may be a constraint for the use of such preparations (34). Moreover, some recombinant antigens show lower reactivity with specific antibodies than the corresponding native antigens, mainly because of the differences in protein folding that can result in altered epitope presentation (9, 19). Variations in sensitivity and specificity were also observed with respect to the level of recognition of recombinant antigens by human serum samples. This effect might be the result of differences in the methods of production of recombinant proteins in various studies (32).

Several studies have shown that synthetic peptides can be used for the serological diagnosis of viral and bacterial as well as parasitic diseases (1, 31, 36, 44, 46, 54). Large amounts of synthetic peptides can be produced with a high level of purity within a relative short period of time. However, to achieve a satisfactory

Received 21 February 2012 Returned for modification 19 March 2012

Accepted 4 April 2012

Published ahead of print 11 April 2012

Address correspondence to Pavlo Maksimov, pavlo.maksimov@fli.bund.de, or Gereon Schares, gereon.schares@fli.bund.de.

Supplemental material for this article may be found at <http://cvi.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/00119-12

diagnostic sensitivity and a high specificity, it is necessary to use optimized peptide combinations, mimicking reactive epitopes on natural antigens (36, 53). Peptides can be arranged in microarrays, thus allowing simultaneous analysis of up to several thousands of peptides with a single serum sample. With this technique, global patterns of antibody responses to various infectious agents were studied (3, 35, 36, 42, 44).

Several experimental approaches have been used to identify protein regions and epitopes suitable for the serological diagnosis of *T. gondii*, including phage display of cDNA libraries, epitope mapping, and reactivity with monoclonal antibodies (5, 11, 26, 29, 41, 49). For this study, a bioinformatic approach was used for *in silico* prediction of 20 B-cell linear epitopes on the *T. gondii* antigenic proteins GRA1, GRA2, GRA4, and MIC3. These 20 novel peptides and 18 peptides reported in studies previously published by others (6, 11, 25, 26) were printed into a peptide microarray and validated by analyzing a large number of well-characterized human serum samples.

MATERIALS AND METHODS

Patient sera. A total of 84 *T. gondii*-positive human patient serum samples were provided by the Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, and the Department of Medical Microbiology and the National Reference Center for Systemic Mycoses, University Medical Center, Göttingen, Germany. Of these, 21 originated from patients with acute toxoplasmosis, 53 from patients with latent *T. gondii* infection, and 10 from patients with latent ocular toxoplasmosis showing typical lesions in the retina. These institutions also provided 65 samples from serologically *T. gondii*-negative patients for the study. Detailed information about the serological status of patients with acute or latent *T. gondii* infection and *T. gondii*-seronegative patients was published previously by Maksimov et al. (39). Sera collected from serologically *T. gondii*-positive ($n = 100$) or -negative ($n = 75$) forest workers were also used and were described in detail previously (39, 40). The presence or absence of *T. gondii*-specific antibodies in the sera was confirmed by a latex agglutination test (LAT; see Table S1 in the supplemental material) and *T. gondii* surface antigen 1 (SAG1) immunoblot analysis (39).

Ethical considerations. The study reported here was a collaborative work of the Toxonet01 and Toxonet02 projects of the National Research Platform for Zoonoses and was approved by the respective ethical committees of the medical faculties of the University of Düsseldorf (3174; 20 January 2009) and the University of Göttingen (8 June 2009) and by the State Medical Association of Brandenburg (19 April 2010). Serum samples were collected using approved protocols. For the anonymized patient sera provided by the Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, and the Department of Medical Microbiology and the National Reference Center for Systemic Mycoses, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany, informed consent was obtained verbally that was in agreement with the ethical committee's approved guidelines. All volunteers (forest workers) were included in the study on the basis of written informed consent as described in detail in reference 40.

***In silico* prediction of *T. gondii* linear B-cell epitopes by the use of ABCpred.** For the prediction of linear B-cell epitopes on *T. gondii* protein sequences, the bioinformatic tool ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>) was used. This software has been developed with a combination of recurrent neural networks (RNN) and standard feed-forward networks (52). Four *T. gondii* antigens, i.e., GRA1, GRA2, GRA4, and MIC3, were analyzed in ABCpred for the presence of linear epitopes. Protein sequences were obtained either from the immune epitope database (<http://www.immuneepitope.org>) or from GenBank.

For the GRA1 protein, a sequence at the amino-terminal region between amino acid positions 160 and 189 was used (linear sequence

source: GenBank accession no. [ADK88943.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ADK88943.1)). This region was described as immunogenic for human *T. gondii*-specific B cells (6).

The GRA2 protein sequence (57) was analyzed for linear epitopes within the signal peptide (amino acid positions 1 to 23) and the amino-terminal region (amino acid positions 24 to 94). This protein sequence was described previously as a region containing major epitopes (29) (linear sequence source: <http://www.immuneepitope.org/assayId/8305>).

The GRA4 protein sequence, including amino acids 297 to 345 (linear sequence source: <http://www.immuneepitope.org/assayId/1244669>) at the carboxy-terminal region, was used for selecting specific epitopes. This region has been reported to be well recognized by IgG antibodies from *T. gondii*-infected humans, mice, and sheep (41).

The entire MIC3 protein sequences (linear sequence source: GenBank accession no. [CAB56644](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CAB56644) and [EEB02693](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EEB02693)) were also analyzed for potential linear epitopes.

For the prediction of potential epitopes, a threshold value of 0.6 and a window length of 16 amino acids with overlapping filters were used (48).

Published peptide sequences. A total of 18 previously described peptides representing four different antigens, i.e., SAG1, GRA1, NTP1, and NTP2, were also included in the study.

Two peptides derived from NTPase1 (length = 20 amino acids) and from NTPase2 (length = 18 amino acids) (25) were selected (Table 1).

A peptide mimicking a GRA1-specific epitope (named "epi24") derived from protein residues 172 to 186 of GRA1 and published by Beghetto et al. was also included in the peptide panel (6) (Table 1).

Finally, a total of 15 SAG1-specific epitopes, which have previously been described by other workers (11, 26), were also selected for the peptide panel (Table 1).

Preparation of peptide microarray slides. Peptides were synthesized and printed on peptide microarray slides by JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany, essentially as described by Maksimov et al. (39).

Examination of sera by peptide microarray. Each array block on the slides was first framed with a "Pap Pen" (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Germany). Arrays were then incubated (60 μ l/well) with blocking solution (phosphate-buffered saline [PBS], 0.05% Tween 20, 0.2% I-Block [Applied Biosystems, Bedford, MA]) for 30 min.

Human serum samples (60 μ l/well), diluted 1:200 in blocking solution, were incubated at 37°C for 1 h and washed seven times for 3 min each time with PBS-T (PBS [pH 7.2], 0.5% Tween 20) at room temperature. Conjugate (Cy5-AffiniPure donkey anti-human IgG; Fc γ fragment specific; and minimal cross reactions to bovine, horse, and mouse serum proteins) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) diluted 1:1,000 (1 μ g/ml) was added to the wells (60 μ l/well), incubated at 37°C for 30 min, and washed as indicated above, followed by three additional washing steps (1 min each) with sterile filtered Milli-Q water. Afterwards, the slides were spun dry for 10 s using a slide spinner (DW-41MA-230; Qualitron Inc./Eppendorf, Berzdorf, Germany).

Scanning and measurement of spot signal intensities and data extraction. Scanning and evaluation of microarray slides as well as data extraction were performed essentially as described previously (39, 44, 45).

Peptide microarray data analysis. To analyze the raw data (median of signal intensity) in GPR files, index values (IVs) were recovered for each peptide spot as the \log_2 of the quotient of the medians of foreground and background values (39, 44, 45). Each serum sample was analyzed on a single block, with the peptides printed in triplicate on each block. To obtain the serum-specific spectrum for each peptide, the means of the IVs for each peptide spot per block (mean sample index value [MSIV]) were calculated using the "corrected mean" formula (Microsoft Office Excel 2003) to exclude artifacts, i.e., false-positive and -negative signals within the replicas in each block (39). The peptide microarrays used in this study failed to meet the criteria required for submission to MIAME-based public databases, as the data types of biomolecular interactions and parameters studied and the protocols, as well as the types of information extracted from the microarray experiment, are different from those of standard DNA microarray experiments (47, 58). Therefore, the MSIVs for all sera

TABLE 1 Peptides used in this study and their diagnostic properties^a

Peptide designation	Peptide sequence	Protein	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Cutoff value	Reference or source
Peptides from literature						
SAG1-48	SDPLVANQVVTCDDKKS	SAG1	4.35	3.57	1.87	26
dSAG1-62	DKKSTAAVILTPTENHFT	SAG1	3.26	3.57	1.62	26
SAG1-76	NHFTLKCCKTALTEPPTLA	SAG1	2.72	3.57	2.81	26
SAG1-90	PPTLAYSPPNRQICPAGTTS	SAG1	3.26	3.57	2.03	26
SAG1-104	AGTTSSCTSKAVTLSSLP	SAG1	1.63	3.57	1.29	26
SAG1-146	PIEKFPVTTQTFFWGCCKG	SAG1	3.26	3.57	1.30	26
SAG1-273	AFFAESKSVIIGCTGGSP	SAG1	2.17	3.57	1.84	26
SAG1-287	GGSPKHHCTVKLEFAGAA	SAG1	5.43	3.57	0.54	26
dSAG1-301	FAGAAGSAKSAAGTASHVS	SAG1	1.09	3.57	2.28	26
SAG1-315	ASHVSIFAMVIGLIGSIAACVA	SAG1	16.85	3.57	1.13	26
SAG1-61	DKKSTAAVILTPTENHFTL	SAG1	9.78	3.57	1.53	11
SAG1-181	SVVNNVARCSYGADSTLGP	SAG1	1.63	3.57	2.06	11
SAG1-241	SFKDILPKLTENPWQGNAS	SAG1	2.72	3.57	2.60	11
SAG1-261	DKGATLTIKKEAFFAESKS	SAG1	2.17	3.57	1.48	11
SAG1-301	AGAAGSAKSAAGTASHVSI	SAG1	0.54	3.57	1.71	11
GRA1-100	EEVIDTMKSMQRDED	GRA1	2.72	3.57	2.81	6
NTP1	CKAPMIVTGGGMLAA INTLK	NTP1	4.35	3.57	1.82	25
NTP2	APMFITGREMLASIDTLK	NTP2	3.26	3.57	1.91	25
Novel peptides						
GRA1-162	MKVIDDVQLEKDKQQ	GRA1	34.24	3.57	2.83	This study
GRA2-61	DERQPEPEPVSQRAS	GRA2	30.98	3.57	1.28	This study
GRA2-28	GVVNVQGPVDVPPFSGKP	GRA2	50.00	3.57	0.98	This study
GRA2-67	PEEPVSQRASRVAEQL	GRA2	4.89	3.57	3.39	This study
GRA2-38	PFSGKPLDERAVGGKG	GRA2	9.24	3.57	1.71	This study
GRA4-300	GGTRTSTAPAEAGKTE	GRA4	9.24	3.57	1.06	This study
GRA4-316	LDDGYRPPFPNRPSP	GRA4	4.35	3.57	0.95	This study
GRA4-309	PAEAGKTELDGGRPP	GRA4	33.15	3.57	1.13	This study
GRA4-321	PPFPNRPSPYAEELK	GRA4	13.04	3.57	2.33	This study
MIC3-219	GETLVNLPEGGQGCKR	MIC3	2.72	3.57	3.19	This study
MIC3-15	SGAVVMCTPAEALPIQ	MIC3	0.00	3.57	3.08	This study
MIC3-88	RQLHTDNGYFIGASCP	MIC3	1.09	3.57	2.82	This study
MIC3-324	GSEGLSEKMNIVFKC	MIC3	10.33	3.57	1.37	This study
MIC3-238	HAFRENCSPGRICDDA	MIC3	2.17	3.57	2.64	This study
MIC3-282	GVEVTLAEKCEKEFGI	MIC3	19.57	3.57	2.82	This study
MIC3-191	SKRGNACKGPNGTGTCIV	MIC3	31.52	3.57	1.22	This study
MIC3-26	ALPIQKSVQLGSFDKV	MIC3	2.17	3.57	1.66	This study
MIC3-291	CEKEFGISASSCKCDN	MIC3	7.61	3.57	1.73	This study
MIC3-8	LLHALTFSGAVWMCTP	MIC3	1.63	3.57	2.25	This study
MIC3-39	DKVVPREVSESLAP	MIC3	2.17	3.57	1.26	This study

^a Peptide sequences were either previously published ($n = 18$) or selected after *in silico* epitope prediction ($n = 20$). The number at the end of the peptide names indicates the position of the first amino acid of the peptide in the protein sequence. The individual cutoff value for each peptide was selected using the mean index values obtained for a panel of 140 *T. gondii*-seronegative human sera and accepting a maximum of 4% false-positive reactions.

and peptides are presented as supplemental material (see Table S1 in the supplemental material).

To ensure the specificity of all of the peptides used, we established an individual cutoff value for each peptide to classify the result of the reaction performed with each particular peptide as positive or negative. The cutoff value was selected for each peptide separately by using the MSIVs obtained for a panel of 140 *T. gondii*-seronegative human serum samples and accepting a maximum of 4% false-positive reactions.

Statistical analysis. Fisher's exact test and logistic regression (LR) were computed with R, version 2.8.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; ISBN 3-900051-07-0; <http://www.R-project.org>). Linear regression analysis and the Wilcoxon signed-rank test were performed with STATISTICA 8 (StatSoft, Tulsa, OK). This program was also used to produce figures. P values < 0.05 were regarded as statistically significant. Univariate LR analysis (R, package "epicalc") was performed to assess the diagnostic potential of tested peptides. A P value (Wald's test)

< 0.05 was regarded as statistically significant (13). The R-package "stats" was used for analysis of variance (ANOVA) in calculations of peptide and serum reactivity.

To perform multiple comparisons of means determined from all index values, a post hoc test (LSD [least significant difference]-Bonferroni test) of ANOVA results was applied using the R package "agricolae." The differences between means of positive peptide reaction values determined in the analysis of peptide and serum reactivities within tested groups were accepted as significant when the differences were equal to or higher than the LSD values as corrected by the Bonferroni method (10).

RESULTS

Diagnostic specificity and peptide-specific reactivity of sera. Twenty candidate B-cell linear epitopes (Table 1) derived from the antigenic proteins GRA1, GRA2, GRA4, and MIC3 were selected

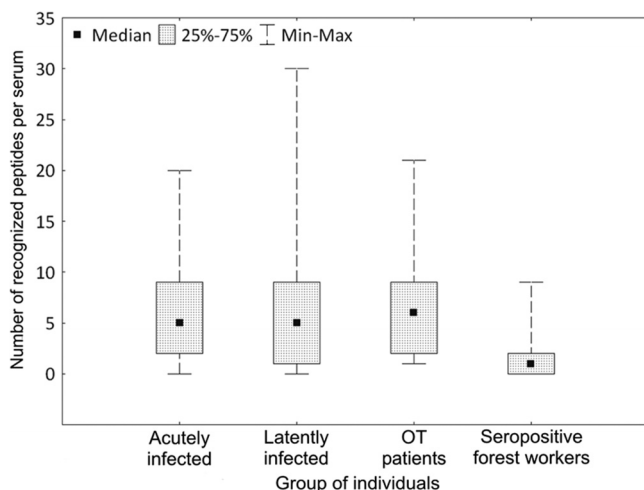


FIG 1 Number of peptides recognized by individual *T. gondii*-positive sera. Sera from forest workers recognized a significantly lower number of peptides per serum sample compared to sera from acutely or latently infected patients or patients with ocular toxoplasmosis (OT patients) (Wilcoxon signed-rank test; $P \leq 0.001$). No significant differences were observed within the three patient groups (acute, latent, and ocular toxoplasmosis) concerning the number of recognized peptides per serum sample.

in silico using the computer program ABCpred. The respective peptides containing these epitopes (referred to here as novel peptides) and 18 additional peptides with published sequences were synthesized.

All sera of seronegative patients ($n = 65$) and 75 randomly selected sera of seronegative forest workers were used to establish cutoff values for each peptide. Individual application of these peptide-specific cutoff values resulted in a diagnostic specificity for *T. gondii*-seronegative sera of 96.6% for each individual peptide.

Sera of patients with acute signs of *T. gondii* infection recognized statistically significantly more peptides than the sera of seropositive forest workers (Wilcoxon signed-rank test, $P = 0.0003$; Fig. 1). Similarly, sera of patients with latent *T. gondii* infection or ocular signs of toxoplasmosis recognized a significantly higher number of peptides than sera of serologically positive forest workers (Wilcoxon signed-rank test; $P < 0.000$ or $P = 0.001$, respectively) (Fig. 1). The differences between the results determined for the groups of patients with ocular, acute, or latent toxoplasmosis were not statistically significant (Wilcoxon signed-rank test, $P > 0.6$) (Fig. 1).

The sera of 72 of 84 (86%) *T. gondii*-seropositive patients with acute, latent, or ocular toxoplasmosis and 66 of 100 (66%) *T. gondii*-seropositive forest workers recognized at least 1 of the 38 peptides. The remaining 46 of 184 (25%) sera failed to react with any of the 38 peptides. Linear regression analysis revealed a significant positive correlation between reciprocal LAT titers and the number of novel peptides recognized by the individual sera ($r^2 = 0.24$, $P < 0.0001$; Fig. 2A). No significant correlation was found between the reciprocal LAT titers and the number of peptides taken from the literature that were recognized by the individual sera ($r^2 = 0.008$, $P = 0.1$; Fig. 2B).

Individual diagnostic sensitivities of novel peptides predicted *in silico*. Fourteen of the 20 novel peptides were recognized by at least one serum sample from the patients with acute and ocular toxoplasmosis. Individual peptide sensitivities in these two

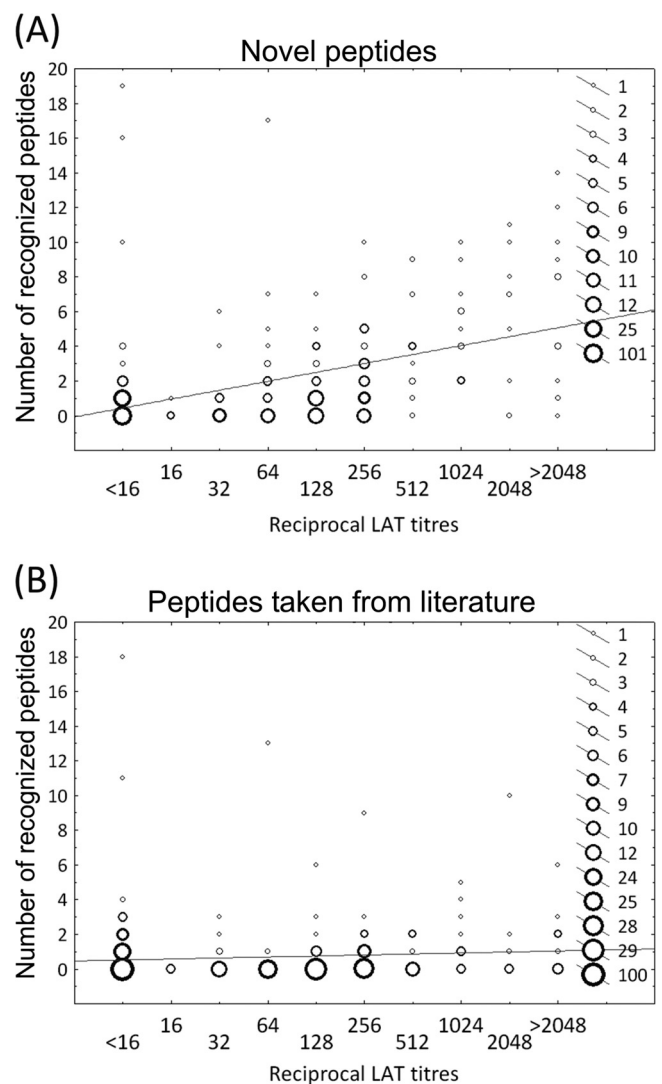


FIG 2 Latex agglutination test (LAT) titers and the numbers of recognized peptides in all seronegative and seropositive human serum samples ($n = 324$) were analyzed for potential correlations by linear regression analysis. (A) Novel peptides: statistically significant correlation ($r^2 = 0.24$; $P < 0.0001$). (B) Peptides taken from the literature: no significant correlation ($r^2 = 0.008$; $P = 0.1$).

serum panels (acute and ocular) ranged from 0% to 86% and from 0% to 100%, respectively (Fig. 3A and B).

Sera from patients with latent *T. gondii* infection recognized 19 of the 20 novel peptides. The individual diagnostic sensitivities of the peptides ranged from 0% to 60% (Fig. 3C). The lowest number of peptides (13 of 20) was recognized by sera from forest workers, with a range of individual peptide sensitivities of 1% to 30% (Fig. 3D). Taken together for all sera ($n = 184$), the individual diagnostic sensitivities determined for each novel peptide ranged from 0% to 49% (Table 1).

The GRA2–28 peptide was the most reactive of the novel peptides and was recognized by 100% of the serum samples from the ocular toxoplasmosis patients, 85.7% of the serum samples from patients with acute infections, 60.3% of the serum samples from latently infected patients, and 30% of the serum samples from *T. gondii*-seropositive forest workers (Fig. 3A, B, C, and D, respec-

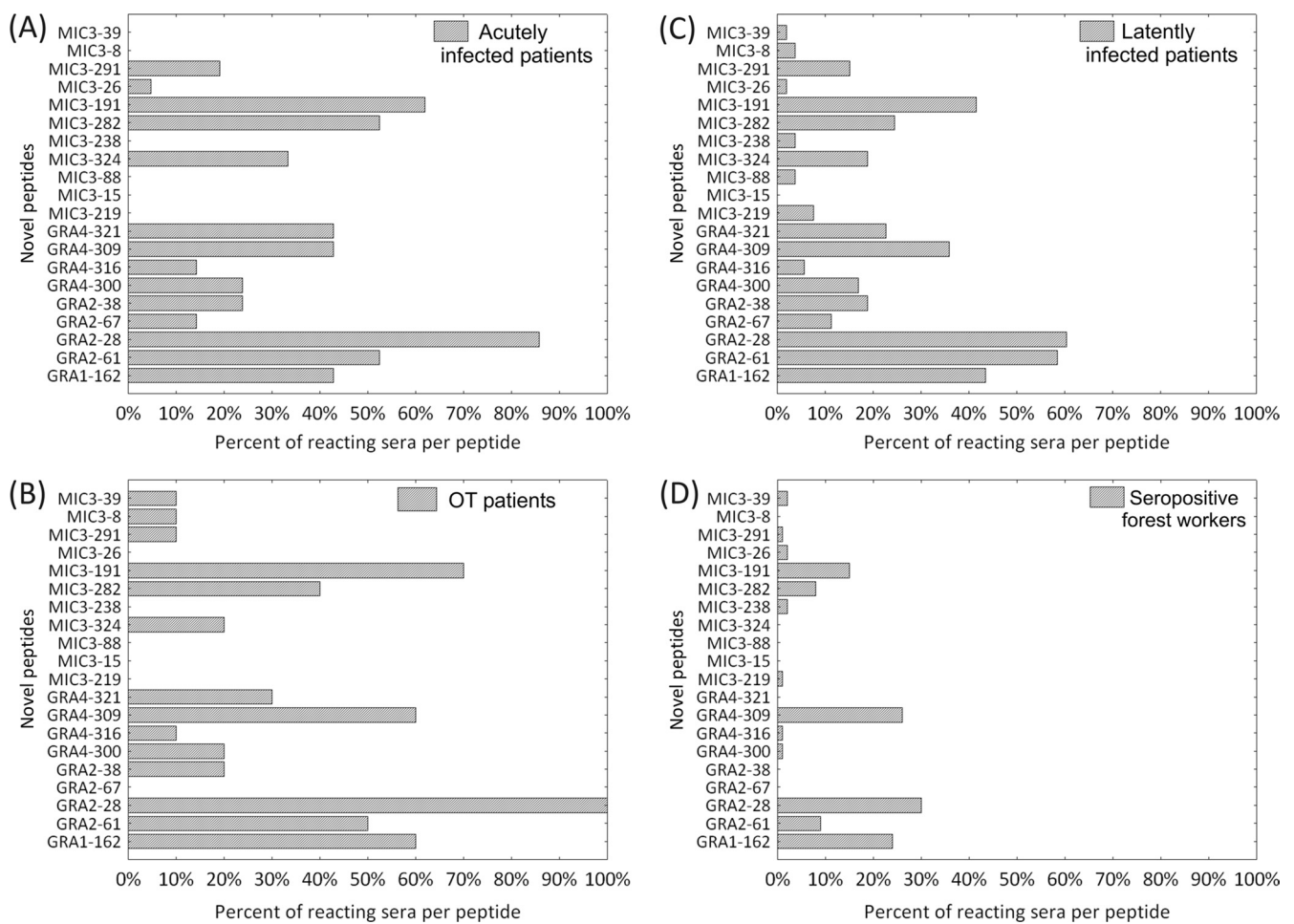


FIG 3 Diagnostic sensitivity of 20 novel peptides predicted *in silico* in this study in groups of human serum samples (A) from patients with acute toxoplasmosis ($n = 21$), (B) from patients with nonactive ocular toxoplasmosis (OT patients) ($n = 10$), (C) from patients with latent toxoplasmosis ($n = 53$), and (D) from serologically positive forest workers ($n = 100$).

tively). GRA-derived peptides were statistically significantly more often recognized than MIC3-derived peptides (Wilcoxon signed-rank test, $P < 0.0001$). One peptide (MIC3-15) failed to show a positive reaction with any of the analyzed sera (Table 1).

Individual diagnostic sensitivities of peptides taken from the literature. All 18 peptides taken from the literature were recognized by sera from latently infected patients, with peptide-specific sensitivities of 2% to 30% (Fig. 4C). Sera from ocular toxoplasmosis patients and forest workers recognized 11 of these 18 peptides, with individual peptide sensitivities of 0% to 20% (Fig. 4B and D). The lowest number of peptides (7 of 18) was recognized by sera from patients with acute signs of toxoplasmosis, with individual peptide sensitivities ranging from 0% to 38% (Fig. 4A).

Among the 18 previously published peptides, SAG1-315 was the peptide most often recognized in all tested serum groups. The diagnostic sensitivities seen with this peptide ranged from 5% (forest workers) to 38% (acutely infected patients). The individual diagnostic sensitivities of each peptide with respect to all sera (184 sera per peptide) ranged between 1% and 17%.

SAG1-derived peptides showed reactivity that was statistically significantly higher than the reactivity shown by the NTPase-derived peptides (Wilcoxon signed-rank test, $P < 0.0001$; Table 1).

Diagnostic sensitivity and specificity of an optimized peptide array. The diagnostic potential of all 38 tested peptides was analyzed in relation to LAT seropositivity by univariate logistic regression (LR). LR revealed a statistically significant association of the results obtained for eight novel and two published peptides in relation to the serological status of sera in LAT (Table 2). For all serologically positive individuals, the peptide-specific diagnostic sensitivity within this panel of 10 peptides ranged from 9.78% (SAG1-60) to 50% (GRA2-28) (Table 1).

An optimized array using a combination of these 10 peptides had a diagnostic sensitivity of 100% in ocular toxoplasmosis patients, 86% in acutely infected patients, 81% in latently infected patients, and 57% in seropositive forest workers when the array was regarded as positive when at least one of the peptides was recognized.

The overall sensitivity mounted to 69% when sera were not grouped.

Analysis of seronegative sera ($n = 140$) revealed a specificity of 84% for this optimized peptide array.

Reaction intensity of peptides with diagnostic potential. Differences in the reaction intensities within the group of the 10 peptides with diagnostic potential were analyzed by ANOVA and an

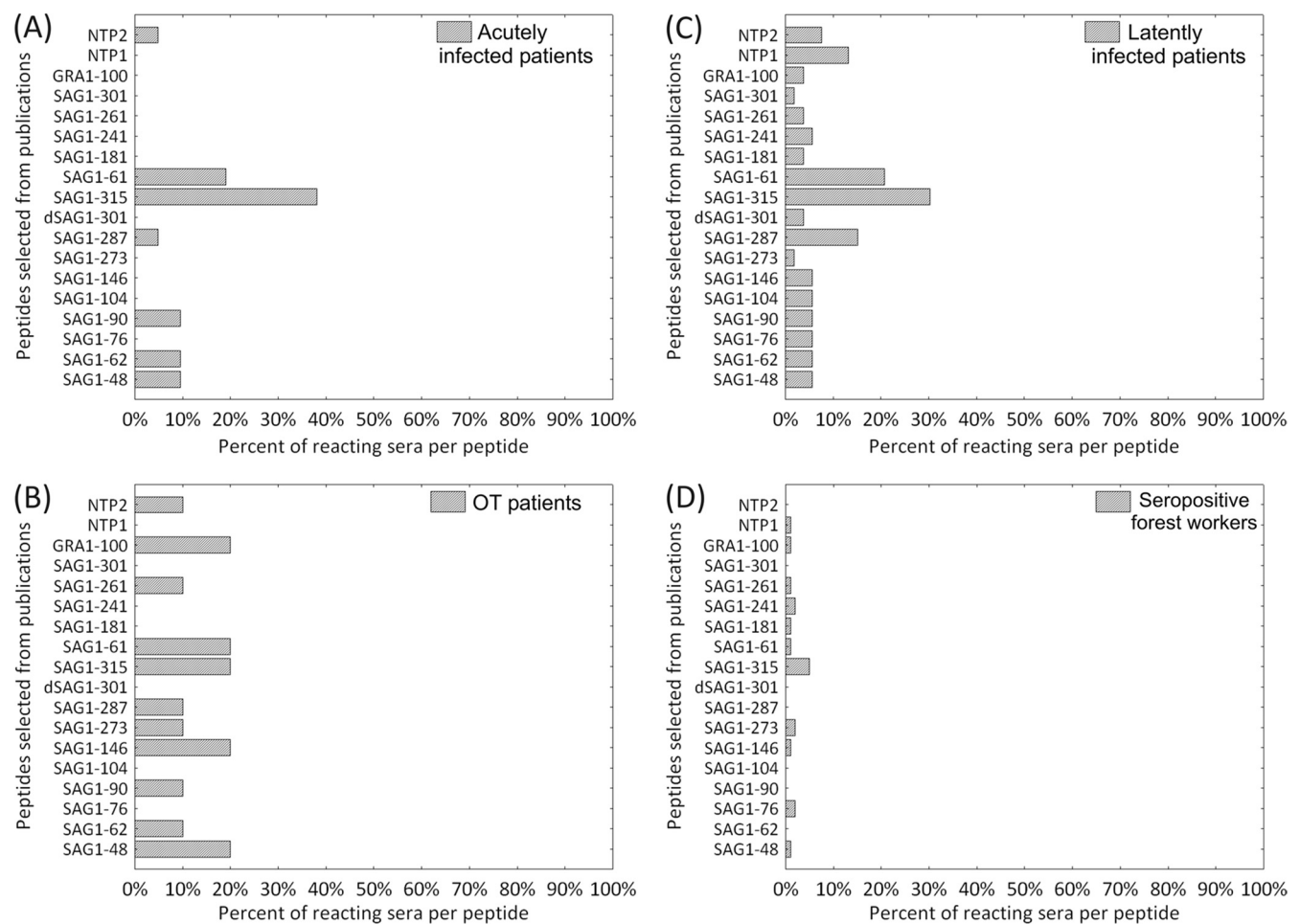


FIG 4 Diagnostic sensitivity of 18 peptides taken from the literature in groups of human serum samples (A) from patients with acute toxoplasmosis ($n = 21$), (B) from patients with nonactive ocular toxoplasmosis (OT patients) ($n = 10$), (C) from patients with latent toxoplasmosis ($n = 53$), and (D) from serologically positive forest workers ($n = 100$).

LSD post hoc test. Reactions performed with GRA1–162 showed the highest statistically significant intensities, i.e., the highest MSIVs, followed by MIC3–282 and GRA2–28 (LSD ≥ 0.458). Peptides SAG1–61, SAG1–315, and MIC3–324 displayed the lowest means (LSD ≥ 0.458) of the reaction intensities (Fig. 5A).

ANOVA and LSD test analyses further showed that sera from acutely infected patients recognized the 10 peptides with the highest statistically significant MSIVs (LSD ≥ 0.331) compared to the sera from the other groups (Fig. 5B). Patients presenting with latent and ocular *T. gondii* infection revealed MSIVs (LSD ≥ 0.331) that were significantly higher than those of serologically positive forest workers. No statistical differences were observed between patients presenting with ocular and latent toxoplasmosis (LSD ≥ 0.331) (Fig. 5B).

One novel peptide (GRA2–28) was recognized with higher statistically significant MSIVs (LSD ≥ 1.09) by sera of acutely infected patients compared to those determined for the members of the other groups (Fig. 6). Two further novel peptides (MIC3–282 and MIC3–191) were recognized with significantly higher MSIVs by sera of acutely infected patients compared to latently infected patients and seropositive forest workers (LSD ≥ 1.09 for MIC3–282; LSD > 0.95 for MIC3–191) (Fig. 6). Sera of patients with

ocular toxoplasmosis showed no statistically significant differences in their reactivity with these two peptides compared to sera of acutely infected patients and of patients with latent toxoplasmosis (LSD ≥ 1.09 for MIC3–282; LSD > 0.95 for MIC3–191) (Fig. 6). For all 10 peptides with diagnostic potential, the sera from forest workers showed the lowest mean MSIV index values relative to those from the members of the other groups.

DISCUSSION

A number of *T. gondii* proteins, including SAG1, NTPase1, NTPase2, GRA1, GRA2, and GRA4, have long been known to possess high antigenicity and are suitable antigens for the serological diagnosis of *T. gondii* infection (2, 7, 11, 16, 21, 24–27, 33, 41). We therefore selected these proteins to identify novel diagnostic peptides for the serological diagnosis of human toxoplasmosis.

To identify *T. gondii* epitopes with diagnostic potential, we predicted potentially suitable epitopes by the use of the bioinformatic software ABCpred. A variety of computing methods for the prediction of epitopes (e.g., PREDITOPE, PEOPLE, BEPITOPE, BcePred, AAP, BepiPred, the Hopp and Woods method, the Jameson-Wolf antigenicity index, etc.) have been developed in the past (14, 50). Most of them utilize the physical and chemical properties

TABLE 2 Univariate logistic regression analysis to examine potential relationships between seropositivity in the latex agglutination test (LAT) and positive reactions with individual peptides^a

Peptide name	Odds ratio (95% CI)	P (Wald's test)
Peptides from literature		
SAG1-48	1.23 (0.39-3.84)	0.725
SAG1-62	0.91 (0.27-3.05)	0.879
SAG1-76	0.75 (0.21-2.66)	0.661
SAG1-90	0.91 (0.27-3.05)	0.879
SAG1-104	0.45 (0.11-1.91)	0.337
SAG1-146	0.45 (0.11-1.91)	0.277
SAG1-273	0.6 (0.16-2.28)	0.453
SAG1-287	1.55 (0.52-4.65)	0.432
dSAG1-301	0.3 (0.06-1.55)	0.15
SAG1-315	5.47 (2.07-14.47)	<0.001
SAG1-61	2.93 (1.06-8.09)	0.038
SAG1-181	0.45 (0.11-1.91)	0.277
SAG1-241	0.75 (0.21-2.66)	0.661
SAG1-261	0.6 (0.16-2.28)	0.453
SAG1-301	0.15 (0.02-1.28)	0.082
GRA1-100	0.75 (0.21-2.66)	0.661
NTP1	1.23 (0.39-3.84)	0.725
NTP2	0.91 (0.27-3.05)	0.879
Novel peptides		
GRA1-162	14.06 (5.47-36.1)	<0.001
GRA2-61	12.12 (4.71-31.2)	0.045
GRA2-28	27 (10.57-68.99)	<0.001
GRA2-67	1.39 (0.45-4.24)	0.564
GRA2-38	2.75 (0.99-7.64)	0.053
GRA4-300	2.75 (0.99-7.64)	0.053
GRA4-316	1.23 (0.39-3.84)	0.725
GRA4-309	13.39 (5.21-34.41)	<0.001
GRA4-321	4.05 (1.5-10.9)	0.006
MIC3-219	0.75 (0.21-2.66)	0.661
MIC3-15	0 (0-infinity)	0.981
MIC3-88	0.3 (0.06-1.55)	0.15
MIC3-324	3.11 (1.13-8.55)	0.028
MIC3-238	0.6 (0.16-2.28)	0.453
MIC3-282	6.57 (2.5-17.22)	<0.001
MIC3-191	12.43 (4.83-31.98)	<0.001
MIC3-26	0.6 (0.16-2.28)	0.453
MIC3-291	2.22 (0.78-6.33)	0.134
MIC3-8	0.45 (0.11-1.91)	0.277
MIC3-39	0.6 (0.16-2.28)	0.453

^a Statistically significant ($P < 0.05$) associations are marked (bold). CI, confidence interval.

of individual amino acids for the prediction of structural and functional properties of the peptide chain suggesting the localization of epitopes. However, the proportion of correct predictions made with these tools was only marginally better than that seen with random epitope selection (8).

Saha and Raghava (52) developed ABCpred, a software program designed to predict linear B-cell epitopes, using a combination of recurrent and artificial neural networks. This software was trained with a data set of 700 experimentally detected B-cell epitopes from the Bcipep database and 700 random peptides from the Swiss-Prot database. Thereafter, ABCpred showed a better prediction rate than other tools, and the results obtained were significantly better than those obtained by random selection (48, 52). Our study supports these findings, as almost all (19 of 20)

ABCpred-selected *T. gondii* peptides were recognized by various groups of serologically *T. gondii*-positive human serum samples, and 40% of 20 ABCpred-predicted linear B-cell epitopes appeared to possess diagnostic potential. However, considerable variation in the respective diagnostic sensitivities was observed that depended on the individual peptide and the serum panel analyzed. The moderate success in predicting such epitopes was expected, since the ABCpred developers described a prediction accuracy of 65.93% by this method (52). Since we analyzed the protein sequences without prior knowledge of the linear B-cell epitopes and nonpeptides, we cannot directly compare our data on the proportion of correctly predicted epitopes with the prediction accuracy reported for ABCpred.

All previously described peptides, which included mainly SAG1-derived peptides, were recognized by the human serum samples with lower diagnostic sensitivity. This was unexpected, as a large proportion of anti-*T. gondii* antibodies in infected humans and animals are directed against SAG1. However, it is known that most B-cell epitopes on the SAG1 antigen are conformation dependent (9, 28, 33, 51), whereas we analyzed only linear epitopes in this study.

This could therefore be one explanation for the low reactivity of SAG1-derived peptides in our study. However, SAG1 peptide sequences had diagnostic sensitivity in our hands that was lower than that reported previously (11). Since Cardona et al. (11) conducted their study in South America, differences between South America and Europe in the prevailing clonal types of *T. gondii* appear to be the most likely reason for this discrepancy. Moreover, the results might also be biased by differences in the major histocompatibility complex (MHC) haplotype distributions in the human populations from South America and Europe (22, 23, 37).

We also observed lower reactivity of peptide GRA1-100 (also called "epi-24"), which was previously described as highly immunoreactive by Beghetto and colleagues (6). In our hands, GRA1-100 had a diagnostic sensitivity of only 2.7% (5/184), while 29 of 40 *T. gondii*-positive sera reacted with GRA1-100 in the study of Beghetto et al. (6). This discrepancy with respect to the diagnostic sensitivity of GRA1-100 might be explained by differences in the methods by which the antigens were produced. We applied synthetic peptides, whereas Beghetto and colleagues used a recombinant protein (6). The oligopeptide produced in an expression vector may be folded in a fashion different from that of synthetic peptides or might carry secondary modifications, which could also explain differences in antigenicity.

The diagnostic sensitivities of individual peptides analyzed in our study were limited, not exceeding 50% within the group of all serologically positive (i.e., all LAT-positive) human serum samples. Furthermore, we observed that each *T. gondii*-positive serum recognized an individual peptide pattern. Thus, our results suggest that it is necessary to use several peptides at the same time, i.e., a peptide array, for the serological diagnosis of *T. gondii* infections to achieve a level of sensitivity similar to the sensitivity of conventional serological diagnostic tests. Similar effects were also observed when synthetic peptides were used as diagnostic antigens for human echinococcosis and tuberculosis studies (36, 44, 53).

Univariate LR analysis identified 10 peptides for which the serological results showed a statistically significant concordance with those obtained with established serological tests. These peptides contain epitopes from the *T. gondii* antigenic proteins SAG1, GRA1, GRA2, and GRA4. The peptide-specific diagnostic sensi-

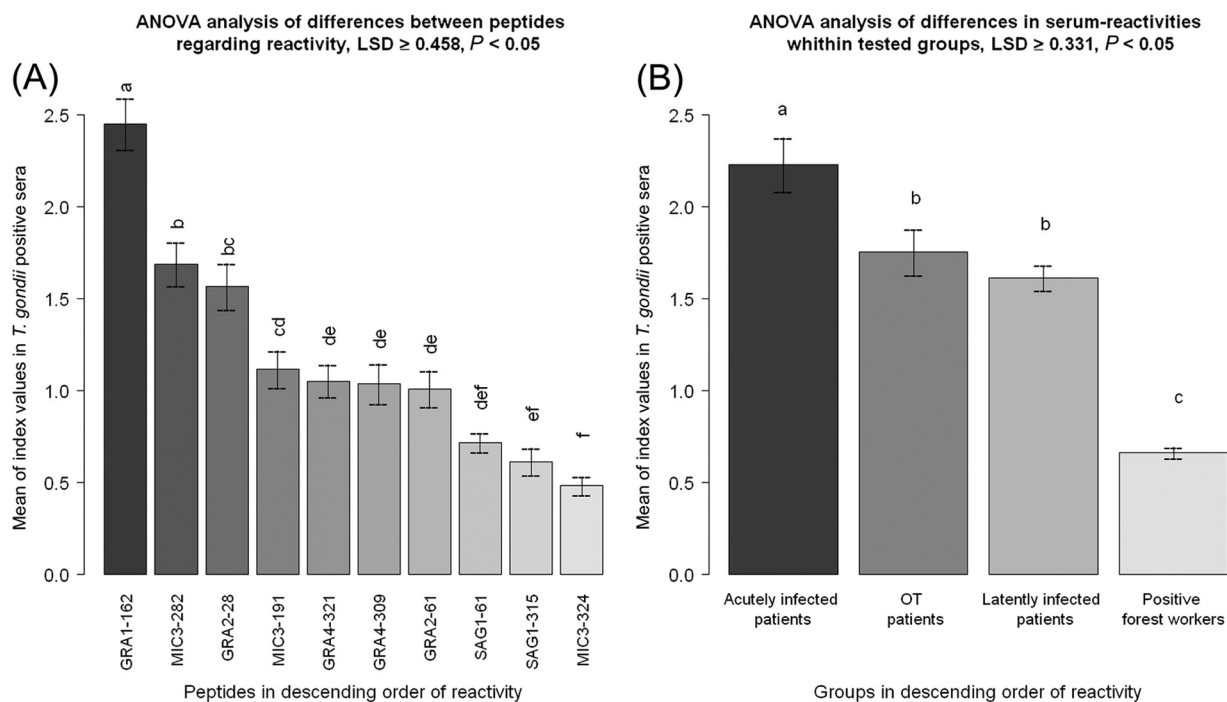


FIG 5 Intensity index values for peptides with diagnostic potential among tested *T. gondii*-seropositive human serum samples. The differences between the means of the sample index values (MSIVs) for intensity for single peptides and those for human groups (acutely infected patients, latently infected patients, patients with ocular toxoplasmosis [OT], and seropositive forest workers) determined with 10 peptides with diagnostic potential were regarded as statistically significant when the differences were equal to or higher than the LSD values. Different letters above the whiskers indicate significant differences between the mean intensities in the post hoc LSD test ([A] LSD \geq 0.458; [B] LSD \geq 0.331). Whiskers in bar plots represent 95% confidence intervals of the MSIVs. (A) MSIVs of the reactions performed with 10 peptides with diagnostic potential observed for seropositive humans. (B) MSIVs for sera from different groups of humans determined with 10 peptides with diagnostic potential.

tivities of the individual peptides ranged from 9.78% to 50%. The diagnostic sensitivity of an array based on the 10 peptides ranged between 79% and 100%, depending on the group of sera analyzed, while the diagnostic specificity was 84%. These values are acceptable, though far from optimal. In any case, the 10 peptides may in the future be included in a larger multiple antigenic peptide array for detecting *T. gondii* infection in patients. Further suitable peptides need to be identified to improve sensitivity. The specificity of a future peptide microarray could be increased by applying more stringent thresholds, i.e., by increasing the cutoffs for individual peptides or by increasing the number of peptides that must be recognized by an individual serum for it to be classified as testing positive. To increase the number of peptide candidates for an optimized peptide microarray, additional immunoreactive antigenic proteins, such as rhoptry (ROP1, ROP2), microneme (MIC2, MIC4, MIC5), dense granule (GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7, GRA8), and surface antigens (SAG2A), should be taken into consideration for the identification of linear B-cell epitopes. If such an optimized array can be established, it may prove superior to conventional serological tests, because the epitopes recognized by sera from individual patients are unambiguously defined. The peptide recognition pattern may allow further conclusions regarding the status of the patient, e.g., differentiation of the acute stage versus chronic stage of infection. A *T. gondii* peptide array may also represent a powerful tool to compare serological reactions, e.g., reactions of a mother and her child, to find evidence for congenital transmission. Another field of application could be the differential examination of serum and intra-

ocular fluids of patients with suspected ocular toxoplasmosis to confirm or rule out active infections of the eye.

Even within our small array, certain antipeptide reactions could be associated with the acute stage of infection. Sera from acutely infected patients generally recognized peptides with significantly higher index values than sera from other groups. Moreover, we found that particular peptides (e.g., GRA2-28, MIC3-282, MIC3-191) were recognized with a significantly higher intensity by sera from acutely infected patients than by sera from others, indicating that these peptides may be candidates for a predictive peptide panel for the diagnosis of acute toxoplasmosis in humans.

The present report demonstrates that ABCpred is an appropriate bioinformatical tool for use in the selection of potential epitope candidates. However, we also observed the prediction of epitopes that show low reactivity in the analysis with *T. gondii*-positive human serum samples. False-positive epitope prediction was also reported by the developers of the tool and can be explained, e.g., by the use of a fixed amino acid length in predicting epitopes (52). Moreover, most epitopes analyzed in this study were continuous, whereas the majority of naturally recognized epitopes are discontinuous (4). Because of this, it may also make sense to search for discontinuous epitopes, e.g., by using bioinformatical software for the analysis of the three-dimensional (3D) X-ray structure of an antigen of interest. Unfortunately, there are only limited 3D X-ray protein structure data for *T. gondii* antigenic proteins available. Nevertheless, our report shows that the use of a bioinformatical prediction method in combination with a

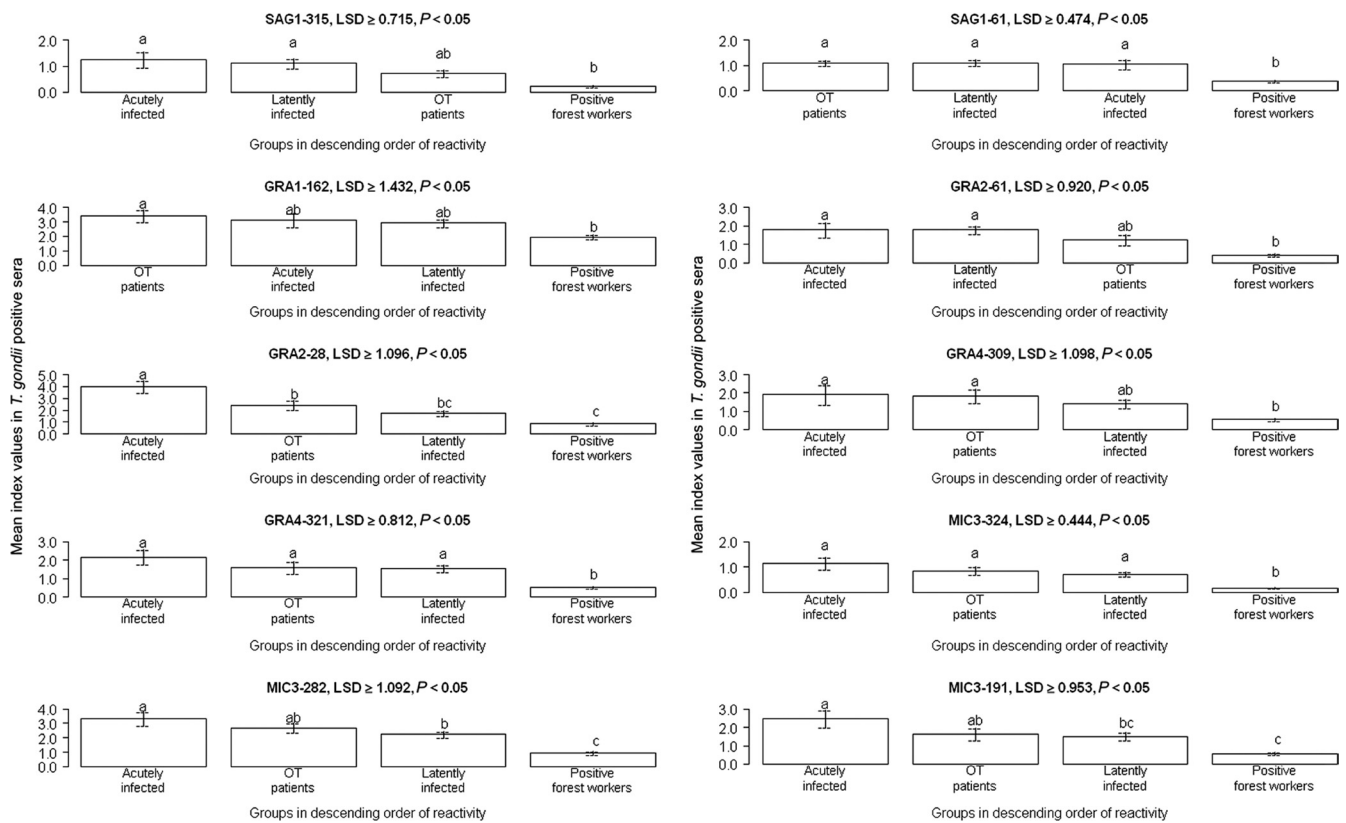


FIG 6 Differences between various groups of humans regarding the reactivity of sera with peptides suitable for *T. gondii* diagnosis. The differences between the MSIVs among groups of humans (acutely infected patients, latently infected patients, patients with ocular toxoplasmosis [OT], and seropositive forest workers) for each peptide with diagnostic potential were regarded as statistically significant when the differences were equal to or higher than the LSD values. Different letters on the bars indicate statistically significant differences between the mean intensities in the post hoc LSD-Bonferroni test. Whiskers in bar plots represent 95% confidence intervals of the MSIVs. Peptide GRA2-28 was recognized by the sera from acutely infected patients with a statistically significant higher intensity than by sera from other groups. MIC3-282 and MIC3-191 peptides were recognized with statistically significant higher index values by sera from acutely infected patients than by sera from ocular toxoplasmosis patients and seropositive forest workers. For all 10 peptides with diagnostic potential, the sera from the forest workers displayed the lowest MSIVs relative to the sera from other groups.

peptide microarray assay is a powerful tool for selection and analysis of *T. gondii* epitopes as candidate antigens for serological diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Toxonet01 and Toxonet02) by funds to G.S. (01KI0765 and 01KI1002F), W.D. (01KI0764 and 01KI1002E), U.P. (01KI1002G), and U.G. (01KI0766 and 01KI1002B).

We acknowledge the excellent technical assistance of Andrea Bärwald, Lieselotte Minke, and Robert Carus. We thank Andreas Fröhlich for discussions about the statistical analysis of our study results.

REFERENCES

- Alcaro MC, Peroni E, Rovero P, Papini AM. 2003. Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4:285–290.
- Altcheh J, et al. 2006. Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56:161–165.
- Bacarese-Hamilton T, Mezzasoma L, Ardizzoni A, Bistoni F, Crisanti A. 2004. Serodiagnosis of infectious diseases with antigen microarrays. *J. Appl. Microbiol.* 96:10–17.
- Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. 1986. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322:747–748.
- Beghetto E, et al. 2003. Use of an immunoglobulin G avidity assay based

- on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 41:5414–5418.
- Beghetto E, et al. 2001. Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *Int. J. Parasitol.* 31:1659–1668.
- Beghetto E, et al. 2003. Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *Int. J. Parasitol.* 33:163–173.
- Blythe MJ, Flower DR. 2005. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. *Protein Sci.* 14:246–248.
- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141:3584–3591.
- Cabral HJ. 2008. Multiple comparisons procedures. *Circulation* 117:698–701.
- Cardona N, de la Torre A, Siachoque H, Patarroyo MA, Gomez-Marin JE. 2009. *Toxoplasma gondii*: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis. *Exp. Parasitol.* 123:199–202.
- Chaves-Borges FA, Souza MA, Silva DA, Kasper LH, Mineo JR. 1999. Detection of *Toxoplasma gondii* soluble antigen, SAG-1(p30), antibody and immune complex in the cerebrospinal fluid of HIV positive or negative individuals. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 41:329–338.
- Domínguez-Almendros S, Benítez-Parejo N, Gonzalez-Ramirez AR. 2011. Logistic regression models. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 39:295–305.
- El-Manzalawy Y, Honavar V. 2010. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. *Immunome Res.* 6(Suppl. 2):S2. doi:10.1186/1745-7580-6-S2-S2.

Downloaded from http://cvi.asm.org/ on May 30, 2012 by Friedrich-Loeffler-Institut

15. Garweg JG, et al. 2005. Congenital ocular toxoplasmosis—observations on the outcome after an early diagnosis. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 222: 721–727.
16. Golkar M, et al. 2007. The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58:419–426.
17. Groß U. 2004. Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 47: 692–697. (In German.)
18. Gross U, Roos T, Appoldt D, Heesemann J. 1992. Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique. *J. Clin. Microbiol.* 30:1436–1441.
19. Harning D, Spenter J, Metsis A, Vuust J, Petersen E. 1996. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:355–357.
20. Hosseini F, Azizi HR, Hosseini F, Schares G. 2009. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. *Vet. Parasitol.* 164:315–319.
21. Ismael AB, Sekkai D, Collin C, Bout D, Mévélec MN. 2003. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 71:6222–6228.
22. Jamieson SE, et al. 2009. Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:162–169.
23. Jamieson SE, et al. 2008. Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *PLoS One* 3:e2285. doi:10.1371/journal.pone.0002285.
24. Jiang T, et al. 2008. Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines. *Vet. Parasitol.* 158:51–56.
25. Johnson MS, Broady KW, Johnson AM. 1999. Differential recognition of *Toxoplasma gondii* recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms by naturally infected human sera. *Int. J. Parasitol.* 29:1893–1905.
26. Kato M, et al. 2007. Reactivity of synthetic SAG1 (p30) peptide sequences with RH, S273 and Beverley strain-induced anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. *Pathobiology* 74:50–56.
27. Kato M, et al. 2005. *Toxoplasma gondii* antigens GRA1 (p24) and SAG1 (p30): a comparison of their stimulatory influence on T-cell activation and cytokine expression in vitro cultures. *Pathobiology* 72:160–164.
28. Kim K, Bülow R, Kampmeier J, Boothroyd JC. 1994. Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells. *Infect. Immun.* 62:203–209.
29. Klaren VN, Peek R. 2001. Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis. *J. Immunol.* 167:6263–6269.
30. Kodjikian L, et al. 2006. Ocular manifestations in congenital toxoplasmosis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 244:14–21.
31. Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. 2003. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 187:1484–1495.
32. Kotresha D, Noord R. 2010. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *APMIS* 118:529–542.
33. Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31:1285–1292.
34. Li S, et al. 2000. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J. Clin. Microbiol.* 38:179–184.
35. Liang L, et al. 2011. Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccine antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey. *Mol. Cell. Proteomics* 10:M110.006916. doi:10.1074/mcp.M110.006916.
36. List C, et al. 2010. Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e771. doi:10.1371/journal.pntd.0000771.
37. Lüder CG, Seeber F. 2001. *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. *Int. J. Parasitol.* 31:1355–1369.
38. Maksimov P, et al. 2011. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Vet. Parasitol.* 182:140–149.
39. Maksimov P, et al. 2012. Analysis of clonal type-specific antibody reactions in *Toxoplasma gondii* seropositive humans from Germany by peptide-microarray. *PLoS One* 7:e34212. doi:10.1371/journal.pone.0034212.
40. Mertens M, et al. 2011. Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 200:263–268.
41. Mévélec MN, et al. 1998. Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection studies using recombinant proteins administered by the oral route. *Parasite Immunol.* 20:183–195.
42. Mezzasoma L, et al. 2002. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.* 48:121–130.
43. Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965–1976.
44. Nahtman T, et al. 2007. Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. *J. Immunol. Methods* 328:1–13.
45. Ngo Y, et al. 2009. Identification and testing of control peptides for antigen microarrays. *J. Immunol. Methods* 343:68–78.
46. Noya O, Patarroyo ME, Guzmán F, Alarcón de Noya B. 2003. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4:299–308.
47. Pamelard F, et al. 2009. PASE: a web-based platform for peptide/protein microarray experiments. *Methods Mol. Biol.* 570:413–430.
48. Reineke U, Schutkowski M. 2009. Epitope mapping protocols. Preface. *Methods Mol. Biol.* 524:v–vi.
49. Reineke U. 2009. Antibody epitope mapping using *de novo* generated synthetic peptide libraries. *Methods Mol. Biol.* 524:203–211.
50. Roggen EL. 2006. Recent developments with B-cell epitope identification for predictive studies. *J. Immunotoxicol.* 3:137–149.
51. Saëij JP, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. 2008. A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence. *Infect. Immun.* 76:2402–2410.
52. Saha S, Raghava GP. 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 65:40–48.
53. Shen G, Behera D, Bhalla M, Nadas A, Laal S. 2009. Peptide-based antibody detection for tuberculosis diagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:49–54.
54. Sousa S, et al. 2009. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1158–1169.
55. Suzuki Y. 2002. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 185(Suppl. 1):S58–S65.
56. Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30:1217–1258.
57. Travier L, et al. 2008. Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *Int. J. Parasitol.* 38:757–773.
58. Vigil A, et al. 2010. Identification of the feline humoral immune response to *Bartonella henselae* infection by protein microarray. *PLoS One* 5:e11447. doi:10.1371/journal.pone.0011447.

8.3 Zur Veröffentlichung vorgesehenes Manuskript

Serotyping of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis domesticus*) reveals predominance of type II infections in Germany

Pavlo Maksimov^{1*}, Johannes Zerweck², Jitender P. Dubey³, Nikola Pantchev⁴, Caroline F. Frey⁵, Aline Maksimov¹, Ulf Reimer², Mike Schutkowski⁶, Morteza Hosseininejad⁷, Mario Ziller⁸, Franz J. Conraths¹, Gereon Schares^{1*}

¹Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Wusterhausen, Germany; ²JPT, Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany; ³United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD, USA; ⁴Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany; ⁵Institute of Parasitology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland; ⁶Institute for Biochemistry & Biotechnology, Department of Enzymology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany; ⁷Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran; ⁸Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Workgroup Biomathematics, Greifswald - Insel Riems, Germany

*Corresponding authors:

Pavlo Maksimov, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Seestraße 55, D-16868 Wusterhausen, Germany, Tel: +49 33979 80155, Fax: +49 33979 80222, E-mail: pavlo.maksimov@fli.bund.de

Dr. Gereon Schares, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Seestraße 55, D-16868 Wusterhausen, Germany, Tel: +49 33979 80193, Fax: +49 33979 80222, E-mail: gereon.schares@fli.bund.de

8.3.1 Abstract

Background: Cats are definitive hosts of *Toxoplasma gondii* and play an essential role in the epidemiology of this parasite. The study aims at clarifying whether cats are able to develop specific antibodies against different clonal types of *T. gondii* and to determine by serotyping the *T. gondii* clonal types prevailing in cats as intermediate hosts in Germany.

Methodology: To establish a peptide-microarray serotyping test, we identified 27 suitable peptides using serological *T. gondii* positive (n=21) and negative cat sera (n=52). To determine the clonal type-specific antibody response of cats in Germany, 86 field sera from *T. gondii* seropositive naturally infected cats were tested. In addition, we analyzed the antibody response in cats experimentally infected with non-canonical *T. gondii* types (n=7).

Findings: In reference sera of cats infected with one of the three canonical clonal types of *T. gondii* reactions dominated with peptides harbouring homologous type-specific sequences. When the array was applied to field sera from Germany, 97.7% (84/86) of naturally-infected cats recognized similar peptide patterns as *T. gondii* type II reference sera and showed the strongest reaction intensities with clonal type II-specific peptides. In addition, naturally infected cats recognized type II-specific peptides significantly more frequently than peptides of other type-specificities. Cats infected with non-canonical types showed the strongest reactivity with peptides specific for both, type I and type III.

Conclusions: Cats are able to mount a clonal type-specific antibody response against *T. gondii*. Serotyping revealed for most seropositive field sera patterns resembling those observed after clonal type II-*T. gondii* infection. This finding is in accord with our previous results on the occurrence of *T. gondii* clonal types in oocysts shed by cats in Germany.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; cats; toxoplasmosis; peptide-microarray; serotyping; genotyping

8.3.2 Introduction

Toxoplasma gondii is a zoonotic obligate intracellular parasite which causes toxoplasmosis in humans and animals. Felids are definitive hosts of this parasite and almost all warm-blooded mammals including humans and cats (Dabritz und Conrad 2010, Elmore, Jones et al. 2010) can serve as intermediate hosts.

The population of *T. gondii* in Europe and North America is dominated by three clonal types (I, II and III), whereas the majority of characterized isolates from South America and Africa are genetically different from these canonical types. Most of the genotypes observed in Brazil are regarded as non-canonical or “atypical”. PCR-RFLP revealed mainly combinations of type I and III specific alleles (Su, Khan et al. 2012). This, however, does not mean that they represent sexual recombinants derived from canonical types but should rather be regarded as evolutionary separate lineages (Ajzenberg, Banuls et al. 2004, Su, Zhang et al. 2006, Herrmann, Bärwald et al. 2012).

The *T. gondii* clonal type is regarded as a key-factor responsible for the clinical appearance of toxoplasmosis in outbred mice (Ajzenberg 2011). Whether this applies also to other intermediate hosts including humans is a matter of debate (Dubremetz und Lebrun 2012). Canonical and non-canonical *T. gondii* were associated with certain clinical appearances in humans (Ajzenberg, Cogne et al. 2002, Boothroyd und Grigg 2002, Kong, Grigg et al. 2003). However, the geographical distribution and dominance of particular *T. gondii* types as well as host genetic and immunity related factors may have biased prior studies (Jamieson, de Roubaix et al. 2008, Jamieson, Cordell et al. 2009, Jamieson, Peixoto-Rangel et al. 2010). For ocular toxoplasmosis, for example, it was demonstrated that most cases in South America were caused by non-canonical *T. gondii* (Gilbert, Freeman et al. 2008), whereas a predominance of *T. gondii* type II was found in France (Fekkar, Ajzenberg et al. 2011, Demar, Hommel et al. 2012). However, Gilbert et al. (2008) (Gilbert, Freeman et al. 2008) demonstrated that congenitally infected Brazilian children were five times more likely to develop ocular toxoplasmosis with more severe symptoms than congenitally infected children from Europe. These findings may suggest that the severity of human toxoplasmosis could be influenced by the genotype of *T. gondii* that has caused the infection. It is therefore epidemiologically relevant to determine the *T. gondii* types dominating in particular geographical areas and to compare the *T. gondii* types prevailing in clinical cases of toxoplasmosis in humans and animals (Grigg, Ganatra et al. 2001).

The majority of typing studies on *T. gondii* in cats were performed by using DNA-dependent techniques (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Al-Kappany, Rajendran et al. 2010, Al-Kappany, Rajendran et al. 2010, Herrmann, Pantchev et al. 2010, Herrmann, Maksimov et al. 2012). However, most *T. gondii* DNA samples were obtained either from tissues/tissue cysts from euthanized cats or from oocysts isolated from feline fecal samples. It is difficult to obtain sufficient amounts of parasite DNA from host tissues and fluids even in cases of clinical toxoplasmosis. *T. gondii* DNA from subclinical cases – which would be of utmost importance for epidemiological studies on potential type-related effects – are not available. Serotyping allows not only the inclusion of clinical, but also of subclinical cases. This explains why typing *T. gondii* infections via the antibody response is attractive and has prompted a number of studies in the past.

T. gondii infection causes a strong and often persistent humoral immune response with detectable antibody titers, independent of the clinical manifestations in the infected host (Parmley, Gross et al. 1994, Dubey 2008).

Some of the *T. gondii* antigenic proteins are presenting sequence differences in the polypeptides expressed by different clonal types (Kong, Grigg et al. 2003, Peyron, Lobry et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008). Kong et al. (2003) (Kong, Grigg et al. 2003) demonstrated that the humoral response against *T. gondii* is partially type-specific, when the sites of clonal type-specific polymorphisms are used as peptide antigens. Based on these results several studies on the serotyping of *T. gondii* in humans using polymorphic synthetic peptides have been performed. The results suggested that it is possible to distinguish between type II- and non-type II-infection (Kong, Grigg et al. 2003, Peyron, Lobry et al. 2006, Sousa, Ajzenberg et al. 2008, Xiao, Buka et al. 2009, Maksimov, Zerweck et al. 2012). Xiao et al. (2009) identified peptides that could be also used to distinguish between type III- and type I-infections (Xiao, Buka et al. 2009).

Cats play an important role in the epidemiology of *T. gondii* infection because they are definitive hosts of the parasite. They can excrete large numbers of environmentally resistant oocysts, which represent after sporulation one of the main infection sources for intermediate hosts (Dubey 2004). Most of the *T. gondii* from cats were genetically characterized by PCR-RFLP and sequencing (Dubey, Quirk et al. 2008, Dubey, Moura et al. 2009, Montoya, Miro et al. 2009, Chen, Gao et al. 2011) after isolation via mouse bioassay using infected cat tissues or oocysts from faecal samples (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010). Since *T. gondii* infection in cats is normally asymptomatic, it is difficult to isolate the parasite or to detect oocyst shedding in healthy cats. However, infected cats usually develop antibodies against *T. gondii* within approximately 2 weeks after infection (Dubey 1995, Dubey

1996, Dubey 2004). Consequently, serotyping could be an alternative method to estimate the prevalence of *T. gondii* types in cats. Whether serotyping of *T. gondii* in cat is possible is currently not known. We therefore first investigated if cats were able to mount a specific serological response against clonal types of *T. gondii*. A synthetic peptide-microarray was established and used to determine the *T. gondii* serotype of naturally infected cats in Germany.

8.3.3 Materials and methods

8.3.3.1 Ethics Statement

All experiments in cats and mice carried out in USA had been approved by Beltsville Area Animal Care and Use Committee (BAACUC).

Experimental infection of cats carried out in Iran was followed as described by the Iranian animal rights organization (Ale-Davoud, Javazadeh blouri et al. 2006). Details on the experimental infections conducted in Iran and the serological results of the kittens were published elsewhere (Hosseininejad 2012).

8.3.3.2 Selection of peptide sequences

A total of 101 *T. gondii* polymorphic peptide sequences, i.e. peptide sequences, which differed for at least two of the three canonical types I, II and III, were chosen to detect clonal type-specific antibodies in sera from *T. gondii* infected animals. These included 54 peptide sequences from 15 *T. gondii* immunogens previously reported as clonal type-specific (Kong, Grigg et al. 2003) and were based on sequences from dense granule proteins (GRA1, GRA3, GRA4, GRA6 and GRA7), the rhostry protein ROP1, the enzymes NTPase I and III, as well as surface antigens (SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, BSR4 and SRS2) (Kong, Grigg et al. 2003).

In addition, 47 of the 101 polymorphic peptides were selected based on *T. gondii* amino acid sequences partially published in Genbank. They included peptides from the dense granule proteins GRA6 (AAF60334; AAF60336; AAF60337) (Fazaeli, Carter et al. 2000, Peyron, Lobry et al. 2006), GRA5 (sequences were taken from a publication, (Peyron, Lobry et al. 2006)), and GRA7 (ABE69193; EU157141; DQ459455) (Fischer, Stachelhaus et al. 1998, Sousa, Ajzenberg et al. 2009) as well as the surface antigen SAG2A (AAK50636; AAK50637; AAK50638; AAF79155) (Lehmann, Blackston et al. 2000, Fazaeli und Ebrahimzadeh 2007). For the identification of polymorphic, i.e. type-specific amino acid (aa) sequences, protein sequence analysis and alignment was performed using the “MegAlign” tool provided by DNASTar software (DNASTAR, Inc; Madison; Wisconsin; USA).

Polymorphic, 15 aa long peptide sequences containing B-cell epitopes were selected using the “Protean” tool of DNASTar (DNASTar Inc; Madison; Wisconsin; USA). Propensity scale methods and cut-offs implemented in this program were used to identify aa regions with

potential B cell epitopes according to following criteria: (i) predicted alpha-helical structure (as determined by “Garnier-Robson plots” (Garnier, Osguthorpe et al. 1978)), (ii) presence of proline residues, (iii) substantial content of hydrophilic amino acids (as determined by “Kyte-Doolittle hydropathy plots” (Kyte und Doolittle 1982)), (iv) high “antigenic index” using “Jameson and Wolf plots” (Jameson und Wolf 1988) integrating flexibility parameters with hydropathy/solvent accessibility values, and (v) a high surface probability (“Emini’s surface probability plots” (Emini, Hughes et al. 1985)), based on side-chain solvent accessibility values of the individual aa. Information on all peptide sequences selected for this study is presented in **TableS1**.

8.3.3.3 Sera from cats infected with canonical *T. gondii*

In all, 17 cat sera specific for clonal type I, 3 sera specific for clonal type II and one serum specific for clonal type III were available as “reference standard” sera for Receiver-Operating-Characteristics (ROC) analysis to select and validate peptides appropriate for *T. gondii* serotyping in cats. The serological status of the reference sera was determined in an immunofluorescence antibody test (IFAT) and by immunoblotting using *T. gondii* surface antigen 1 (TgSAG1) as antigen (as described below).

Sera from cats experimentally infected with tissue cysts:

Sera from cats infected *per os* with tissue cysts at the Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville Agricultural Research Centre, Maryland, USA: All cats fed with tissue cysts were bled prior to infection and had no antibodies in a 1:25 serum dilution tested by the MAT (Dubey und Desmonts 1987). The number of tissue cysts in the inocula was unknown as the cats were fed whole infected tissues. The cats were obtained from a *T. gondii*-free cat colony as described [37]. They were 3-5 months old at the time of the experiment (Dubey 1995).

For the validation of peptides derived from clonal type I-specific polymorphic regions (I, I/II, I/III), six cats were experimentally infected with *T. gondii* tissue cysts. Three cats were infected with tissue cysts from the CT1 strain, two with the GT1 strain and one cat with the RH strain. Sera from type I *T. gondii*-infected cats were collected on days 22, 35, 25, 29, 34 and 43 post infection (**Table S2**).

Sera from two cats infected with tissue cysts of clonal type II *T. gondii* strains were used for evaluating peptides derived from clonal type II-specific polymorphic protein regions (e.g. II, I/II, II/III). One *T. gondii* type II infected cat was experimentally inoculated with tissue cysts of the TgSdCo1 *T. gondii* isolate presenting a clonal type II-specific allele pattern (Dubey,

Morales et al. 2007). A second *T. gondii* type II infected cat was inoculated with tissue cysts of the ME49 strain (Lunde und Jacobs 1983). Sera from experimentally *T. gondii*-infected cats were collected on days 49 and 29 post inoculation (**Table S2**).

To validate clonal type III (III, I/III, II/III)-specific peptides, a single serum was available from a cat experimentally infected with tissue cysts from mice infected with the VEG strain (Howe und Sibley 1995). The serum was collected on day 23 post infection (**Table S2**).

All cats infected with tissue cysts except the cat infected with RH strain shed oocysts.

Sera from cats experimentally infected with tachyzoites:

Six 45±5-day-old clinically healthy kittens of both genders were infected intraperitoneally with 10⁴ *T. gondii* RH tachyzoites in sterile PBS at the Institute for Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Iran. Parasites used for experimental infections had been cultivated and isolated as described (Hosseininejad, Azizi et al. 2009) (**Table S2**). The sera collected from kittens before infection as well as sera from queens were tested by IFAT and immunoblotting to ensure that they had not been *T. gondii* serologically positive prior to experimental infection (Hosseininejad, Azizi et al. 2009). All kittens were dewormed with 22 mg/kg Mebendazole (MehrDarou®, Tehran, Iran) for five consecutive days and caged separately during the experiment. In five of six kittens infected with RH tachyzoites, serum samples were collected on days 18 and 26 post infections. From one kitten, only a serum sample collected on day 26 post infection was available (**Table S2**). All sera collected from RH infected cats were used for the further evaluation of peptides derived from clonal type I, including those sharing their specific polymorphic site with that of type II or III (I/II, I/III)-specific polymorphic protein regions.

Serum from a naturally *T. gondii* type II-infected cat: A third type II serum was obtained from an immunocompetent 10-year-old male cat that had died of systemic toxoplasmosis. From this cat, a *T. gondii* strain presenting a clonal type II specific allele pattern in PCR-RFLP was isolated, in this study referred to as TgCatSw1 (Spycher, Geigy et al. 2011) (**Table S2**).

8.3.3.4 Sera from cats infected with non-canonical *T. gondii* types

Sera obtained from cats inoculated with tissue cysts of mouse virulent non-canonical *T. gondii* isolates (n=7) were also included. All cats were bled before infection and had no antibodies in a 1:25 serum dilution tested by MAT (Dubey und Desmonts 1987). The number of tissue cysts in the inocula was unknown as the cats were fed whole brains. The 3-5 months old cats were obtained from the same *T. gondii* free cat colony as described above.

Three isolates were from Paraná, Brazil (TgCatBr1, 2, 5) (Dubey, Navarro et al. 2004) (**Table S2**). Three cats were experimentally infected each with one of these isolates at the Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville, Agricultural Research Centre, Maryland, USA. Sera were collected for further serotyping analysis on days 42 and 30 post infection (**Table S2**). Further sera were from three cats infected with *T. gondii* isolated from a wild black bear from Alaska (TgBbUS1) (Dubey, Rajendran et al. 2010) and one serum derived from a cat experimentally infected with *T. gondii* isolated from a goat in the USA (TgGoatUS6) (Maksimov, Buschtöns et al. 2011). Serum samples within this group were collected on days 37, 24, 33, 43 and 36 post infection. The serological status of cats experimentally infected with non-canonical *T. gondii* was determined by IFAT and TgSAG1 immunoblot (**Table S2**).

8.3.3.5 Sera from naturally *T. gondii* seropositive cats

All field sera from cats used in this study (n=138) were collected during serological routine testing for *T. gondii* at Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany. The serological status of these animals was determined by IFAT and TgSAG1 immunoblot. Fifty two serum samples were negative for *T. gondii* antibodies in both serological tests, and were used for the validation of peptides as part of the negative “reference standard” in a ROC analysis. Eighty six samples were seropositive in both serological tests and further used to determine the clonal types naturally *T. gondii*-infected cats from Germany were carrying.

8.3.3.6 IFAT

The *T. gondii* strain RH (Sabin, 1941) was cultivated as described previously (Maksimov, Buschtöns et al. 2011). Ten μ l of a suspension of cell culture-derived *T. gondii* RH tachyzoites (5×10^6 ml⁻¹) in PBS were used to sensitize wells of IFAT slides. Slides were air-dried and stored frozen at -20°C until used. Immediately prior to use, the slides were fixed with ice-cold acetone for 10 min and incubated in PBS for 10 min. Cat sera were titrated in PBS in 2-fold steps starting at a dilution of 1:25. The test was performed as described for *N. caninum* (Schaes, Peters et al. 1998) but with the following modification: Anti-cat IgG [H+L] produced in goat and coupled to FITC (102-095-003, ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) diluted 1:50 in PBS, 0.2% Evans Blue was used to detect primary antibodies. The slides were examined using an Axiovert fluorescence microscope (AHBT3,

Olympus, Hamburg, Germany). Only complete peripheral fluorescence of the tachyzoite was considered specific. A reciprocal titer of 200 was used as the positive cut-off titer.

8.3.3.7 TgSAG1 immunoblot

Native TgSAG1 was affinity-purified as described (Maksimov, Buschtöns et al. 2011). The identity of the purified protein was confirmed using monoclonal antibodies against TgSAG1 (IgG2a P30/3 [ISL, Paignton, UK]). Detection of antibodies against TgSAG1 was performed essentially as described (Maksimov, Buschtöns et al. 2011) with a few modifications. Briefly, cat sera were diluted 1:100 and the conjugate (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-cat IgG [H+L], 102-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) was diluted 1:500. Reactivity with a 30 kDa band was regarded as a *T. gondii*-positive reaction. Two sera obtained from an IFAT-positive and an IFAT-negative cat were used as controls.

8.3.3.8 Preparation of peptide-microarray slides

Peptides were synthesized and printed on peptide-microarray slides (i.e. modified glass-slides) by JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany, essentially as described (Maksimov, Zerweck et al. 2012).

8.3.3.9 Sample processing in peptide-microarray

Cat serum samples were processed on peptide-microarrays as described (Maksimov, Zerweck et al. 2012) with a few modifications. Serum samples (60 µl/well), diluted 1:100 in blocking solution (PBS, 0.05% Tween 20, 0.2% I-Block [Applied Biosystems, Bedford, MA, USA]), were incubated at 37°C for 1 h and washed seven times for 3 min with PBS-T (PBS, pH 7.2; 0.5% Tween 20) at room temperature. Conjugate (Biotin-SP-conjugated AffiniPure goat anti-cat IgG, Fc Fragment Specific, 102-065-008, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) diluted in blocking solution 1:500 (1 µg/ml) was added to the wells (60 µl/well), incubated at 37°C for 30 min, and washed as indicated above. Cy[™]5-conjugated streptavidin (016-170-084, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) diluted in blocking solution 1:500 (1 µg/ml) was added to the wells (60 µl/Well), incubated at 37 °C for 30 min and washed as described, followed by three additional washing steps, 1 min each, with sterile-filtered MilliQ water.

Afterwards, the microarrays were spun dry for 10 s using a slide spinner (DW-41MA-230, Qualitron Inc/Eppendorf, Berzdorf, Germany).

8.3.3.10 Scanning and measurement of spot signal intensities and data extraction

Scanning and evaluation of microarrays, as well as data extraction was performed as described (Maksimov, Zerweck et al. 2012).

8.3.3.11 Microarray data analysis

To analyze the raw data (median of signal intensity) in GPR (GenePix Results) files, index values (IVs) were recovered for each peptide-spot as the log₂ of the quotient of the medians of foreground and background (Nahtman, Jernberg et al. 2007, Ngo, Advani et al. 2009, Maksimov, Zerweck et al. 2012). Each serum was analyzed on a single block with the peptides printed in triplicate on each block. To obtain the serum-specific spectrum for each peptide, the means of the IVs for each peptide spot per block (mean sample index value, MSIV) were calculated using the “corrected mean” formula (R version 2.14.1 (2011-07-08) Copyright (C) 2011, The R Foundation for Statistical Computing; ISBN 3-900051-08-9; <http://CRAN.R-project.org/>) to exclude artefacts, i.e. false-positive or false-negative signals within the replicas in each block (Maksimov, Zerweck et al. 2012, Maksimov, Zerweck et al. 2012). The peptide-microarrays used in this study failed to meet the criteria required for submission under MIAME based public databases, because the data type of biomolecular interaction and parameters studied, the protocols as well as the type of information extracted from the microarray experiment differed from standard DNA microarray experiments (Pamelard, Even et al. 2009, Vigil, Ortega et al. 2010, Maksimov, Zerweck et al. 2012, Maksimov, Zerweck et al. 2012). Therefore MSIVs for all sera and peptides are presented as supplemental material (**Table S3**).

8.3.3.12 Statistical analysis

For statistical analysis and graphical presentation of results, the R program environment was used (R version 2.14.1 (2011-07-08) Copyright (C) 2011, The R Foundation for Statistical Computing; ISBN 3-900051-08-9; <http://CRAN.R-project.org/>).

To select peptides appropriate for serotyping and to establish cut-offs for each peptide, a ROC analysis was conducted using the R-package “DiagnosisMed”. Cut-offs were selected to achieve optimal diagnostic sensitivity and specificity for individual peptides.

For the ROC based selection of peptides derived from polymorphic clonal type-specific regions, reactions of reference sera derived from cats infected with a homologous type of *T. gondii* were used as a “positive reference standard”. In contrast, *T. gondii* negative sera and sera from cats infected with a heterologous clonal type of *T. gondii* were used as a “negative reference standard”. ROC analysis was performed using these reference standards and peptides with an Area-Under-ROC-Curve (AUC) value of ≥ 0.7 were considered as suitable for further serotyping.

Frequency analysis (Log-linear model, Chi-Square) for serotyping data was performed with the R-package “vcd”, which was also used to visualize the results in mosaic plots. Mosaic plots represent a method for visualizing contingency tables and a log-linear model in frequency analysis (Meyer, Zeileis et al. 2006). The size of each box corresponds to the observed frequencies of positive and negative serum-peptide reactions as well as the number of tested peptides within clonal type-specific peptide cohorts. Pearson residuals in mosaic plot are standardized deviations of observed from expected values calculated by Pearson chi-square. To display Pearson residuals in mosaic plots, the shading introduced by Friendly et al. (1994) (Meyer, Zeileis et al. 2006) was applied. Positive Pearson residuals were presented by blue scale shading of boxes with solid borderlines. Results with Pearson residuals > 1 and ≤ 2 along with a Log-linear model Chi-squared p value < 0.1 led to rejection of the independence hypothesis as a not statistically significant, while Pearson residuals > 2 along with a Log-linear model Chi-squared p-value < 0.05 prompted rejection of the hypothesis of independence (overrepresentation) as statistically significant. Negative Pearson residuals (underrepresentation) are presented by boxes with red dashed borderline (Pearson residuals < -1 and ≥ -2 , p-value < 0.1) with red scale shading (Pearson residuals < -2 , p-value < 0.05) (Meyer, Zeileis et al. 2006, Morisset, Peyron et al. 2008, Maksimov, Zerweck et al. 2012).

Serum-peptide reactions (mean sample index values, MSIVs) were cut-off normalized (CN) by subtracting the peptide-specific cut-off values from MSIV resulting in a value called CN-MSIV. This was done to achieve a better visualization of positive and negative serum-peptide reactions, e.g. positive reactions led to values ≥ 0 and negative results to values < 0 . To perform multiple comparisons of CN-MSIV means between peptide groups or between single peptides, a Post-Hoc-Test (LSD [Least-Significant-Difference]) on ANOVA results was

applied using the R package “agricolae” (Maksimov, Zerweck et al. 2012, Maksimov, Zerweck et al. 2012).

To analyse, whether peptide patterns recognized by individual sera cluster in different groups, we performed explorative data analysis applying the artificial neural network-based Selforganizing Kohonen Network/Selforganizing Kohonen Maps (SOM) method (Melssen, Wehrens et al. 2006, Buydens und Wehrens 2007), which is widely used in biomedical research (Toronen, Kolehmainen et al. 1999, Wang, Delabie et al. 2002). The aim of SOM is similar to other centroid-based clustering methods (k-means algorithm), i.e. to detect a set of centroids (codebook vector - in SOM terminology) and assign each object in the data set to one of the centroids (codebook vectors) that provide the best approximation for that object (Toronen, Kolehmainen et al. 1999, Melssen, Wehrens et al. 2006, Buydens und Wehrens 2007).

In the present study we used supervised XY-fused Selforganizing Kohonen Network to find a relationship between the input data (measurements of serum-peptide reactions and peptide groups) presented by X-map and output data (cat sera groups) presented by Y-map. X-map presents the structure of the input space, whereas Y-map captures the topology of the output space. The formation of each map in a XY-fused network is regulated by training steps, i.e. a repetitive presentation of the data set to the maps in order to classify data according to their similarity (Melssen, Wehrens et al. 2006). The relationship between input (X) and output (Y) is guided by a fused similarity measure, combining the similarities of X-map with those from Y-map. This drives the formation process of the XY-maps (Melssen, Wehrens et al. 2006). XY-fused supervised Kohonen network (XYF-SKN) was applied using the R package “kohonen” (Melssen, Wehrens et al. 2006, Buydens und Wehrens 2007). We used a SOM grid of 4×2 units (nodes). The topology of the grid was hexagonal. The complete data set was presented 2000 times to the network. For this analysis, serum-peptide reactions were used with original MSIVs.

8.3.4 Results

8.3.4.1 Confirmation of *T. gondii* serological status of cat sera

IFAT was used to determine the serological status of cats. Within the group of sera regarded as *T. gondii* negative (n=52), the reciprocal IFAT titres ranged from <25 to 100. Among the sera regarded as positive (n=114) reciprocal IFAT titres ranged from 200 to 51200 (**Table 1**,

Table S3). IFAT results were confirmed by the TgSAG1 immunoblot. In 114 of 114 (100%) IFAT positive field and reference sera antibodies to TgSAG1 were detected, while 52 of 52 (100%) of the IFAT negative field sera were negative in the TgSAG1 immunoblot.

8.3.4.2 Propensity scale based prediction of 47 novel potential polymorphic epitopes

In addition to 54 polymorphic peptides previously described (Kong, Grigg et al. 2003), 47 novel polymorphic, i.e. type-specific, peptides derived from GRA5, GRA6, GRA7, SAG2A protein sequences were selected to extend the peptide panel for the serotyping of *T. gondii* clonal types by peptide-microarray using cat sera.

Based on the GRA5 protein sequences available for the clonal lineages I, II, and III 9 potentially type-specific peptide sequences were identified (**Table S1**). Compared to the type I GRA5 (RH strain), six aa substitutions were observed in type II GRA5 (K76 strain) and three aa changes in type III GRA5 (VEG strain) (Peyron, Lobry et al. 2006). All except one aa substitution in GRA5 were located in the N-terminal hydrophilic region of GRA5. The selected GRA5 peptide sequences did not meet all the criteria mentioned in the Materials and Methods section for the selection of peptides (**Table S1**): Proline residues were missing in all GRA5 peptide sequences, and only three of the selected GRA5-derived peptides were located in putative α -helical regions (according to the “Garnier-Robson plot”). The “Jameson-Wolf antigenicity index” suggested, however, that the chosen peptides were located in antigenic regions and “Emini’s surface probability plot” showed a high surface-probability for all the selected peptide-sequences. All sequences were located in hydrophilic regions of the GRA5 protein according the “Kyte-Doolittle hydropathy plots” (**Table S1**).

In the GRA6 aa sequences, 21 polymorphic positions were identified. In comparison with type I GRA6 (RH strain), the protein sequence revealed eight aa substitutions and six aa insertions in type II (ME49 strain), while seven aa substitutions were detected in type III GRA6 (NED strain). All peptides met most selection criteria (Table S1). Only three peptides were located in a region with α -helical properties. Five peptide sequences contained no proline residues. The selected peptides were located at both, C- and N- terminal regions (Table S1).

For GRA7, 13 polymorphic peptide sequences were selected. All peptide sequences were located near the C-terminus. In comparison to GRA7 type I (RH strain), eight aa substitutions were observed in type II (BEVERLEY strain) and 15 aa substitutions in type III (NED strain) (Table S1). All GRA7 peptides were derived from antigenic, hydrophilic regions. They were selected from regions putatively located on the protein surface or in putative α -helical regions. Four peptides lacked proline residues.

For the SAG2A protein, four polymorphic peptides from the C-terminal region were chosen. The selected peptide regions met the criteria of antigenicity, hydrophilicity, surface probability and presence of proline residues. However, the peptides failed to present an α -helical structure (**Table S1**). Peptides were derived either from a polymorphic protein region common for clonal types I and III (strains S48, NED) or from a region specific for clonal type II (strains LGE96-1, BEVERLEY).

8.3.4.3 Selection of 27 peptides appropriate for *T. gondii* serotyping in cats

In total, 101 peptides presenting single type-specific polymorphisms (I [n=27], II [n=29] and III [n= 21]) as well as common polymorphisms for two of three clonal types simultaneously (I/II [n=6], I/III [n=12], II/III [n=6]), were used initially. For the selection of peptides suitable for *T. gondii* serotyping individual peptides were first subjected to a ROC analysis. Those peptides for which ROC analysis revealed a diagnostic capacity ($AUC \geq 0.7$) were further analyzed by ANOVA and LSD-Post-Hoc-Test.

For each group of peptides specific for a particular clonal type, an individual set of reference sera was used in ROC analysis, which included sera from *T. gondii* serologically negative cats (n=52) and sera from experimentally-infected cats (n=21). In the individual ROC analyses, 40 of the 101 analyzed peptides yielded on AUC value ≥ 0.7 (**Table S4**) and were thus included in a second phase of selection.

According to ANOVA and LSD-Post-Hoc-Test analysis, 13 of 40 peptides selected in the first step presented low clonal type specificity, i.e. they were also recognized with high intensity by sera with heterologous type specificity. Therefore these peptides were not included in the final peptide panel used for serotyping.

A total of 27 remaining peptides were recognized by sera with homologous specificity (**Table S4**). Diagnostic specificity, i.e. the level of restriction of reactions to sera from animals infected with a clonal type homologous to the type-specificity of the aa sequence of this

individual peptide, ranked from 59% to 98%. Diagnostic sensitivity ranged between 5% and 100% (**Table S4**). The peptides selected for serological typing were derived from GRA1, 3, 5, 6, 7 and SAG2A proteins. Nine of the 27 peptides were novel, while 18 had previously been published (Kong, Grigg et al. 2003). In the peptide panel established in the present study, the type-specificities were almost equally distributed over the three clonal types of *T. gondii* (type I: 10 peptides, type II: 12 peptides, type III: 11 peptides). The aa sequences of the 27 peptides showed the following specificities in detail: type I (n=4), type II (n=10), type III (n=7), type I/II (n=2) and type I/III (n=4).

8.3.4.4 Serotyping in cats infected with known *T. gondii* type

Clonal type I-infected cats: The mean CN-MSIVs by which peptides with clonal type I-specific aa sequences (I, I/II, I/III) were recognized by sera of clonal type I-infected cats (n=17) were significantly higher than the mean CN-MSIVs by which peptides with type II- or III-specific, i.e. heterologous, aa sequences were recognized by the same sera (**Table 2**, ANOVA, LSD \geq 0.523, p-value < 0.05). The GRA3-I/III-28 peptide was recognized by the significantly highest MSIVs in this group (**Fig. 1 [A]**), followed by GRA5-I-41, GRA7-I/II-215 and GRA6-I-216 (ANOVA, LSD \geq 0.968, p-value < 0.05). The lowest anti-clonal type I-specific reactivity was observed for peptide GRA6-I-173 (**Fig. 1 [A]**). The diagnostic sensitivity of individual peptides presenting clonal type I-specificity (I, I/II, I/III) ranged from 5% to 94% and the diagnostic specificity from 64% to 98% (**Table S4**).

The prevalence of positive and negative serum-peptide reactions within the group of type I-infected cats was analysed using a log-linear model. The resulting contingency tables and deviations from the hypothesis of independence were visualized by mosaic plots (**Fig. 1 [B]**). Positive clonal type I-specific peptide reactions were quantitatively overrepresented (Pearson residuals > 2, p-value < 0.05) among sera of cats infected with type I *T. gondii*. In addition, type I/II- and I/III-specific peptide reactions were also statistically significantly overrepresented as indicated by Pearson residuals > 3 (p-value < 0.01). All type II- and III-specific positive peptide reactions were underrepresented (Pearson residuals < -1, and < -3, p-value < 0.1 and 0.01 respectively) among sera from type I-infected cats (**Fig. 1 [B]**).

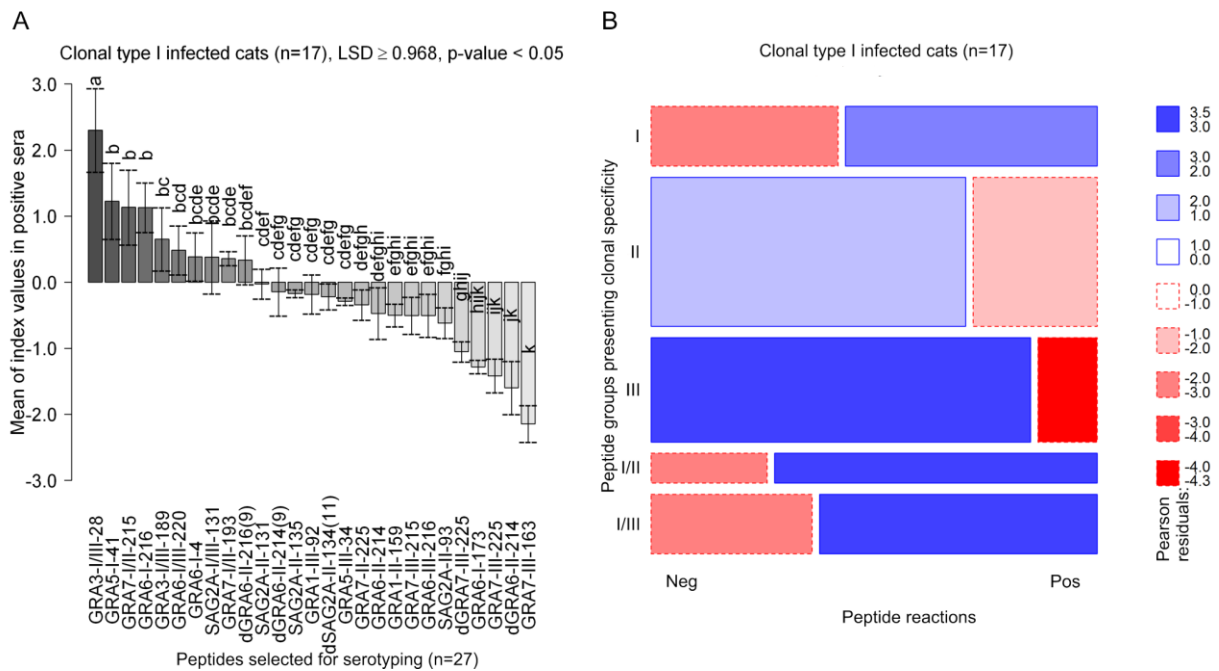


Fig. 1. In *Toxoplasma gondii* type I infected cats reactions against type I, I/II and I/III specific peptides are strongest and are overrepresented in number.

Intensities (MSIVs) by which clonal type I infected cats reacted with individual peptides were analyzed using ANOVA and the Least Significant Difference (LSD)-Post-Hoc-Test (A). Whiskers represent 95% confidence intervals of the means of MSIV (bars). The differences between the means of MSIVs were regarded as statistically significant, when they were equal or higher than the LSD values. Different letters above the whiskers indicate significant differences between the mean intensities in the LSD-Post-Hoc-Test.

To evaluate whether positive or negative serum reactions against clonal type-specific peptide cohorts were over- or underrepresented in cats infected with *T. gondii* clonal type I, a log-linear model analysis was used and the results presented in a mosaic plot (B). The size of each box in the mosaic plot corresponds to the observed frequencies of positive (Pos) and negative (Neg) peptide reactions as well as the number of analyzed peptides within each peptide cohort. Pearson residuals represent standardized deviations of observed from expected values. The Pearson residuals 0-2 with solid blue line indicate that the number of positive or negative reactions is higher, but not statistically significantly higher than expected (Pearson chi-squared p-value < 0.1). Blue scale shadings suggest the statistically significant rejection of the null hypothesis, i.e. overrepresentation of reactions against particular peptide groups (Pearson residuals > 2 , Pearson chi-squared p-value < 0.05). Dashed red lines indicate an underrepresentation of positive or negative peptide reactions which is not statistically significant. Red scale shadings suggest a statistically significant rejection of the null hypothesis, i.e. underrepresentation of peptide reactions within the analyzed peptide group (Pearson residuals < -2 Pearson chi-squared p-value, 0.05).

Clonal type II infected cats: Analysis of sera from cats infected with clonal type II *T. gondii* (n=3) revealed that peptides presenting type II-specific aa sequences (II, I/II) were recognized by significantly higher mean CN-MSIVs as compared to those peptides with

heterologous specificity, i.e. clonal type I or III (**Table 2**; ANOVA, $LSD \geq 1.034$, $p\text{-value} > 0.05$). The dGRA6-II-214(9) peptide was recognized by the significantly highest mean of CN-MSIVs (**Fig. 2 [A]**), as compared to the remaining peptides used for serotyping (ANOVA, $LSD \geq 1.854$, $p\text{-value} < 0.05$). The lowest means of clonal type II-specific CN-MSIVs were observed in GRA7-II-225, SAG2A-II-93 and GRA1-II-159. Peptides specific for clonal type I or III were recognized by markedly lower intensity as compared to those peptides presenting clonal type II specificity (ANOVA, $LSD \geq 1.854$, $p\text{-value} < 0.05$) (**Fig. 2 [A]**). The diagnostic sensitivity of peptides with clonal type II specificity (II, I/II) ranged between 66% and 100% and their specificity ranged from 58% to 98% (**Table S4**).

Estimation of the prevalence of positive peptide reactions by log-linear modelling showed a statistically significant (Pearson residuals > 3 , $p\text{-value} < 0.01$) overrepresentation of clonal type II- as well as clonal type I/II-specific peptide reactions (Pearson residuals > 2 , $p\text{-value} < 0.05$). In contrast, reactions against peptides with clonal type I- or III-specific sequences were significantly underrepresented (Pearson residuals < -2 , $p\text{-value} < 0.05$) in cats infected with clonal type II *T. gondii* (**Fig. 2 [B]**).

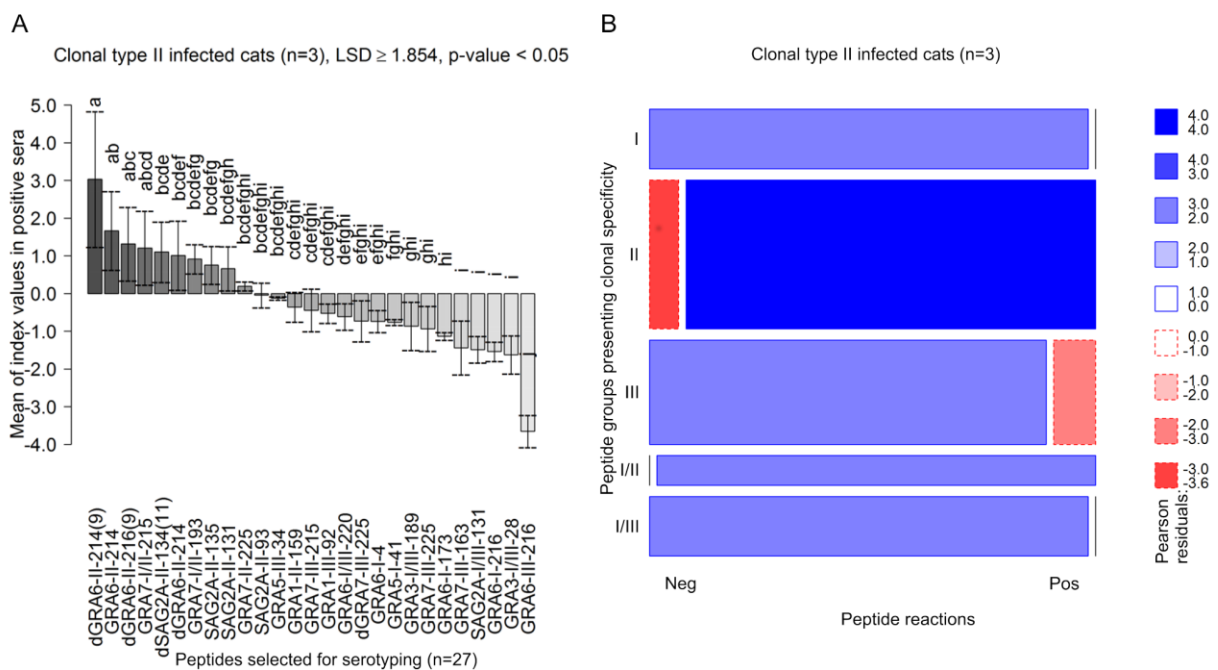


Fig. 2. In *Toxoplasma gondii* type II infected cats reactions against type II and I/II specific peptides are strongest and overrepresented in number.

Intensities (MSIVs) by which clonal type II infected cats reacted with individual peptides were analyzed using ANOVA and the Least Significant Difference (LSD)-Post-Hoc-Test (A). To evaluate whether positive or negative

serum reactions against clonal type-specific peptide cohorts were over- or underrepresented in cats infected with *T. gondii* clonal type II, a log-linear model analysis was used and the results presented in a mosaic plot (B).

Detailed explanations of [A] and [B] are provided in Fig. 1.

Clonal type III infected cat: The significantly highest CN-MSIVs of a serum from a cat infected with clonal type III *T. gondii* were observed in peptides with type I/III-specific aa sequences, followed by the CN-MSIVs observed in the group of clonal type III-specific peptides (**Table 2**, ANOVA, $LSD \geq 1.128604$, $p\text{-value} < 0.05$). The highest CN-MSIVs were observed in the peptides GRA3-I/III-189, GRA3-I/III-28 and GRA6-I/III-220. All peptides with clonal type III-specific sequences were recognized as positive, but reactions were close to the peptide-specific cut-offs (**Fig. 3 [A]**).

Five peptides with heterologous specificity (GRA7-II-225, GRA6-I-216, SAG2A-II-131 and GRA7-I/II-215) were also recognized by the serum. However, the MSIVs recorded for these peptides were markedly lower (**Fig. 3 [A]**) as compared to peptides with a homologous aa sequence specificity.

Since only one reference serum specific for clonal III was available, it was not possible to establish a statistically significant log-linear model for the prevalence of positive or negative peptide reactions. Nevertheless, clonal type III- as well as I/III-specific positive peptide reactions were quantitatively overrepresented (Pearson residuals > 1 , $p\text{-value} < 0.1$), whereas positive reactions from clonal type I-, II- and I/II-specific peptides were underrepresented (**Fig. 3 [B]**).

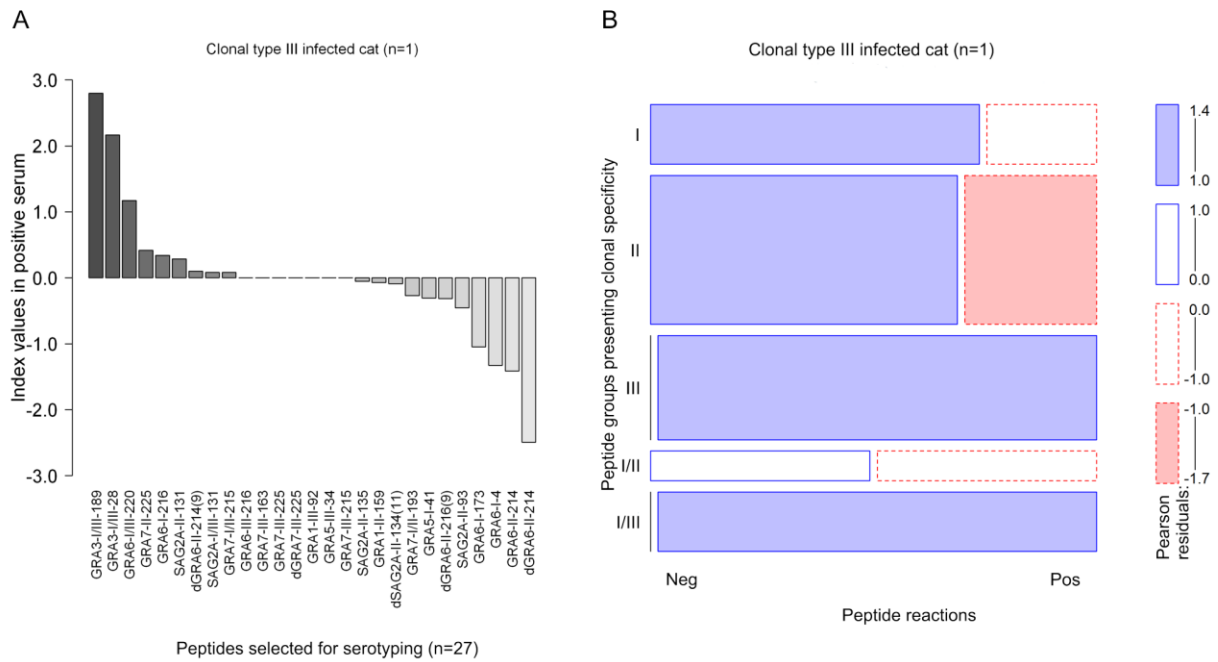


Fig. 3. In a *Toxoplasma gondii* type III infected cat type III and I/III specific peptides were recognized strongest and were overrepresented in number.

Intensities (MSIVs) by which clonal type III infected cats reacted with individual peptides were analyzed using ANOVA and the Least Significant Difference (LSD)-Post-Hoc-Test (A). To evaluate whether positive or negative serum reactions against clonal type-specific peptide cohorts were over- or underrepresented in a cat infected with *T. gondii* clonal type III, a log-linear model analysis was used and the results presented in a mosaic plot (B).

Detailed explanations of [A] and [B] are already given in Fig. 1.

8.3.4.5 Clonal type II specific reactions dominate in naturally infected cats

Sera collected from naturally *T. gondii* seropositive cats from Germany (n=86) showed the strongest reactions (i.e. highest CN-MSIVs) with peptides of aa sequences homologous to clonal type II (II and I/II) as compared to reactions with peptides of clonal type I- or III-specific aa sequences (**Table 2**; ANOVA, $LSD \geq 0.259$, p-value < 0.05).

The highest CN-MSIVs were observed for peptide SAG2A-II-93 followed by dGRA6-II-216(9), GRA7-I/II-215, GRA6-II-214 and SAG2A-II-135, which were both also recognized by significantly higher positive CN-MSIVs as compared to most remaining peptides, except GRA7-II-225, GRA5-III-34 and GRA7-I/II-193 (ANOVA, $LSD \geq 0.471$, p-value < 0.05) (**Fig. 4 [A]**).

SAG2A-II-93 was the peptide recognized by the highest number of *T. gondii* seropositive field sera (n=67, [77.9%]), followed by SAG2A-II-135 (n=60 [69.7%]), dGRA6-II-216(9) (n=52, [60.4%]) and GRA6-II-214 (n=52, [60.4%]) (**Table S4**).

Log-linear model analysis revealed that reactions with peptides displaying clonal type II-specific aa sequences (II, I/II) were statistically significantly overrepresented (Pearson residuals > 4, Chi-squared p-value < 0.001) (**Fig. 4 [B]**), whereas positive clonal type I- or III-specific peptide reactions were significantly underrepresented (**Fig. 4 [B]**).

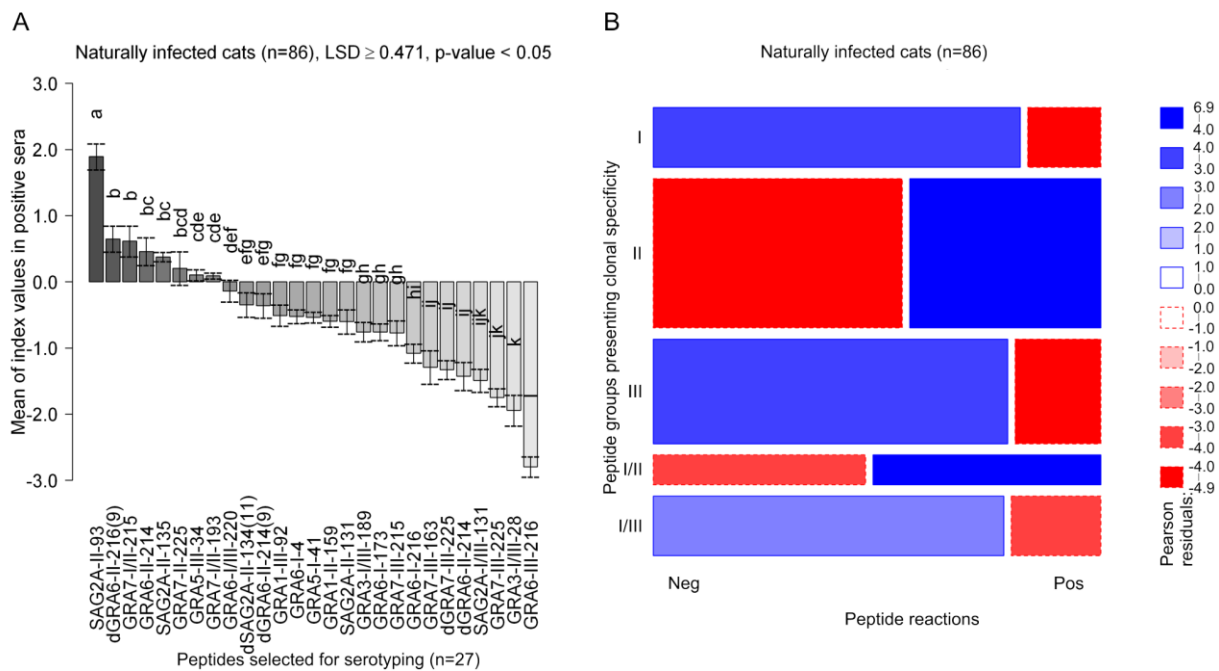


Fig. 4. In naturally *Toxoplasma gondii* seropositive cats strongest reactions were observed against type II and I/II specific peptides and reactions against these peptides were overrepresented.

Intensities (MSIVs) by which naturally infected cats reacted with individual peptides were analyzed using ANOVA and the Least Significant Difference (LSD)-Post-Hoc-Test (A). To evaluate whether positive or negative serum reactions against clonal type-specific peptide cohorts were over- or underrepresented in naturally *T. gondii* infected cats, a log-linear model analysis was carried out and results presented as mosaic plot (B).

Detailed explanations of [A] and [B] are already given in Fig. 1.

8.3.4.6 Cats infected with non-canonical *T. gondii* recognized mainly type I/III specific peptides

Cats infected with non-canonical *T. gondii* showed the strongest reactions, i.e. the highest mean CN-MSIVs, against peptides presenting aa sequences specific for type I and III (**Table 2**; type I/III peptides). Peptides with type I/II specific aa sequences were also recognized by

significantly higher means of CN-MSIVs compared to peptides with sequences specific for type III (**Table 2**). Statistically significant differences were not observed among the clonal type I-, II- and III-specific peptide groups (**Table 2**; ANOVA, LSD ≥ 0.9 , p-value < 0.05).

Peptides GRA3-I/III-28 and SAG2A-I/III-131 were recognized with the highest mean CN-MSIVs. Lower CN-MSIVs were observed in SAG2A-II-131, GRA3-I/III-189, GRA5-I-41 and GRA6-I/III-220; however, the differences in reaction intensities were not statistically significant when compared with those against GRA3-I/III-28 and SAG2A-I/III-131. The remaining peptides were recognized in average by significantly lower index values (LSD ≥ 1.662 , p-value < 0.05) (**Fig. 5 [A]**).

GRA3-I/III-189 peptide was recognized by all sera (100%), while 6 of 7 sera (86%) detected SAG2A-I/III-131 and GRA3-I/III-28 (**Table S4**).

Log-linear analysis of positive and negative peptide reactions among clonal type-specific peptides revealed that reactions with peptides containing sequences specific for both, type I and III, were statistically significantly overrepresented (Pearson residuals >3 , p-value < 0.01), whereas clonal type I- and III-specific peptide reactions were underrepresented (Pearson residuals <-1 , p-value < 0.1). No significant differences were observed in the frequency of positive and negative reactions among clonal type II- and I/II-specific peptide cohorts (Pearson residuals $-1 < 0 < 1$, p-value > 0.1) (**Fig. 5 [B]**).

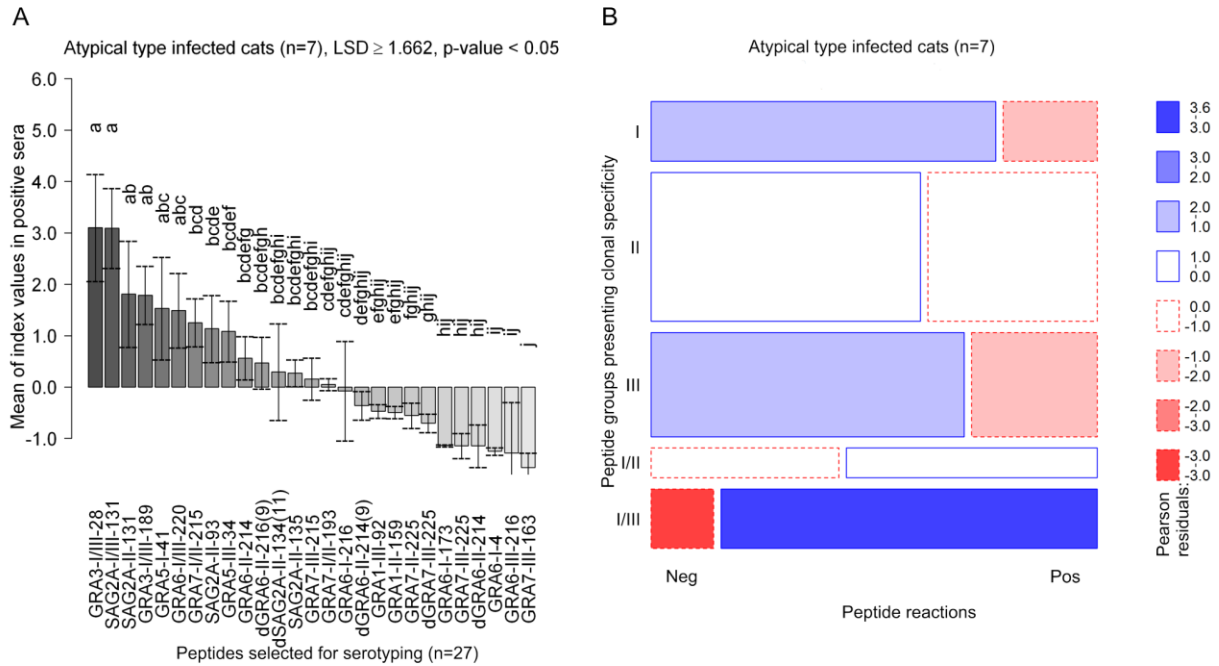


Fig. 5. In cats infected with non-canonical *Toxoplasma gondii* strongest reactions were observed against type I/III specific peptides and the number of reactions against these peptides were overrepresented.

Intensities (MSIVs) by which non-canonical type infected cats reacted with individual peptides were analyzed using ANOVA and the Least Significant Difference (LSD)-Post-Hoc-Test (A). To evaluate whether positive or negative serum reactions against clonal type-specific peptide cohorts were over- or underrepresented in cats infected with atypical *T. gondii*, a log-linear model analysis was used and the results presented in a mosaic plot (B).

Detailed explanations of [A] and [B] are already given in Fig. 1.

8.3.4.7 Peptide patterns of naturally seropositive cats resemble those of cats with type II infection

Each tested serum recognized several peptides with a different MSIV. To detect similarities among the tested sera in the recognized peptide patterns, explorative analysis of the data using a XY-fused supervised Kohonen network (XYF-SKN) was performed.

The Y-map of SKN is presented in the **Fig. 6 [A]**, where sera from five cat groups (i.e. three groups consisting of reference sera for type I, II or III, one group of sera from non-canonical type infected cats and one group of sera from cats naturally infected with *T. gondii*) are clustered according to their similarity in peptide reactivity.

Almost all sera from cats infected by clonal types I (n=12) and III (n=1) clustered in one unit (grid node 7) (**Fig. 6 [C]**). Two sera of type II (ME49 and TgCatSw1) infected cats clustered

together in the second unit (grid node **2**) with 27.9% (n=24) of the sera obtained from naturally seropositive cats sampled in Germany (**Fig. 6 [A], [C]**). The third type II-specific serum from a cat infected with TgSdCo1 grouped with 30.2% (n=26) of the sera obtained from naturally-seropositive cats sampled in Germany in the grid node **3** (**Fig. 6 [A], [C]**).

Five of seven sera collected from cats infected by non-canonical *T. gondii* clustered separately in grid node **8** together with one serum of a naturally seropositive cat and three sera from cats infected with *T. gondii* clonal type I (**Fig. 6 [A], [C]**). Four further sera from naturally seropositive cats were assigned to the node **5** together with one serum from a cat infected with *T. gondii* type I (**Fig. 6 [A], [C]**). Sera from the cats infected with TgCatBr2 from Brazil and TgBbUS1 from Alaska were grouped together with sera from clonal type II infected cats and naturally-seropositive cats in grid node **2** (**Fig. 6 [A], [C]**).

In the grid nodes **1**, **4** and **6** only sera from naturally-seropositive cats (n=30) were present (**Fig. 6 [A], [C]**).

XYF-SKN classification analysis of serum-peptide reactions predicted three cat groups consisting mainly of animals infected with non-canonical *T. gondii* (**A**, red), clonal type I (**I**, green) or with natural infection (**N**, blue) (**Fig. 6 [A], [B]**). Group **N** (**Fig. 6 [A]**, blue) consisted of 84 (97.7%) sera of naturally infected cats and of all three sera from cats infected with *T. gondii* type II. Two sera from cats infected with *T. gondii* clonal type I and two sera collected from cats infected by non-canonical *T. gondii* fell also into this group. The second group **I** (**Fig. 6 [A]**, green) consisted of a single grid node (**7**) with 12 type-I-sera, one type-III-serum and one serum from a naturally infected cat. The third group **A** (**Fig. 6 [A]**, red) consisted also of a single grid node (**8**) with five sera from cats infected with non-canonical *T. gondii* strains, three sera from type I infected cats and one serum from a naturally infected cat.

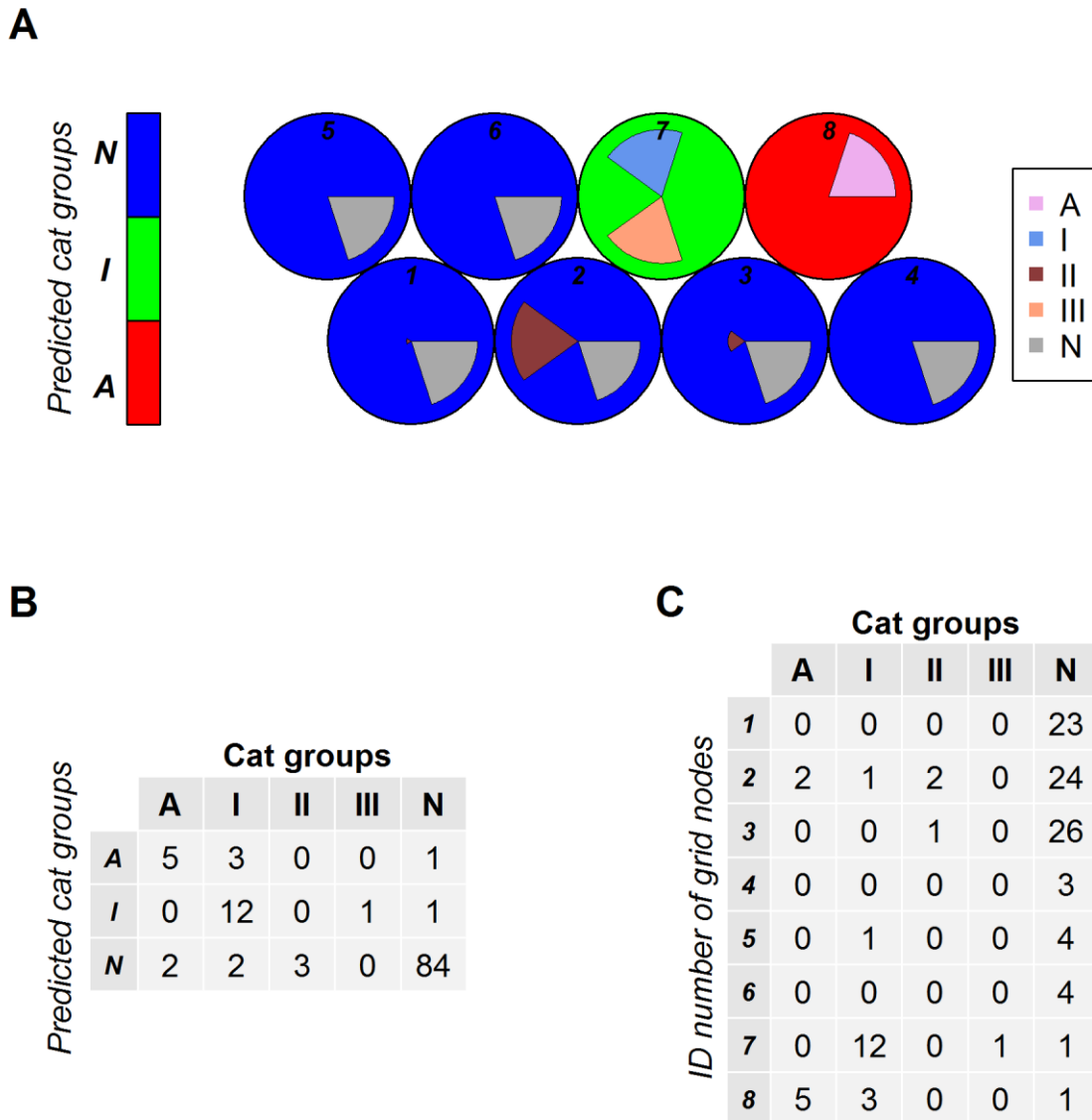


Fig. 6. Naturally *Toxoplasma gondii* seropositive cats and cats with a known clonal type II infection recognized similar peptide patterns.

To explore whether there are particular patterns of anti-peptide reactions among all serologically positive *T. gondii* cat sera, a XY-fused Selforganizing Kohonen Network analysis (XYF-SKN) was performed. Figure (A) presents the clustering of various groups of *T. gondii* positive cat sera in a Y-map. Most of the sera derived from cats infected with non-canonical *T. gondii* types (A), infected by clonal types I, II or III (I, II, or III), or naturally infected cats (N) clustered in the grid nodes 1 to 8 either together (type I and III infected [node 7] as well as the type II and naturally infected cats [nodes 1 to 6]) or separately (cats infected with non-canonical *T. gondii* [node 8]). Three cat groups were predicted using XYF-SKN, e.g. a cat group infected with non-canonical *T. gondii* strains (A), a clonal type I infected group (I) and a naturally-infected cat group (N). Predicted cat groups are presented by different background colours of grid nodes, e.g. A by red, I by green and N by blue. Figure (B) shows the number of group-specific sera within predicted clusters (A, I and N), further confirming that sera of naturally infected cats clustered

mainly with type II reference sera. Figure (C) shows the number of group-specific sera within eight grid nodes in Figure (A).

8.3.5 Discussion

Several studies conducted with human and murine sera have shown that the antibody response against *T. gondii* is partially specific for the clonal type of the parasite (Kong, Grigg et al. 2003, Xiao, Buka et al. 2009). Based on these findings non-invasive typing methods using synthetic peptides or recombinant polypeptides in serotyping ELISAs or microarrays were developed and used to investigate the presence of antibodies to specific clonal types of *T. gondii* in infected humans and animals (Kong, Grigg et al. 2003, Peyron, Lobry et al. 2006, Sousa, Ajzenberg et al. 2009, Xiao, Buka et al. 2009, Sousa, Canada et al. 2010, Maksimov, Zerweck et al. 2012). To our knowledge, there is no published information about a clonal type-specific antibody responses to *T. gondii* and serotyping in cats, although the cat plays a major role as an important definitive host in the epidemiology of the *T. gondii* infection.

The availability of sera from individuals with a known clonal type of *T. gondii* infection is a prerequisite for developing serotyping tools. Since sera from humans with a known clonal type of *T. gondii* infection are very rare, sera from infected mice were used to evaluate peptides that were possibly suitable for serotyping with human sera (Kong, Grigg et al. 2003). Fortunately, we were in a position to use sera from experimentally infected cats to evaluate candidate peptides, i.e. to identify those peptides that showed optimal specificity for serotyping.

Some of the experimentally infected cats, whose sera were made available for the present study, had originally been used for oocysts production and were therefore orally inoculated with tissue cysts. It must be expected that this way of infection did not only induce the development of intestinal stages like schizonts and later-on gamonts, but also caused the establishment of extraintestinal stages such as tachyzoites and bradyzoites (Dubey 1995). As a consequence, cats shedding oocysts often develop a long-lasting humoral immune response against tachyzoites and bradyzoites. The resulting antibodies could be used for serotyping in order to determine the clonal type of *T. gondii* infection in individual cats. Since seroconversion to *T. gondii* is usually permanent, typing is not only possible in cats actually shedding oocysts (in Europe only a small proportion of less than 1% of all cats (Schaes,

Vrhovec et al. 2008)) but also in the vast majority of animals that became infected with *T. gondii* in the past but failed to excrete oocysts or were not checked for oocyst shedding when they were bled. Serotyping may therefore allow a less biased view on the clonal types of *T. gondii* circulating in a cat population as compared to genotyping, which is necessarily restricted to a very small proportion of the cat population.

In the present study, we analyzed a total of 101 *T. gondii* polymorphic peptides, i.e. peptides with clonal type specific aa sequences to identify molecules suitable for the typing of *T. gondii* in cats using sera of the infected animals. Sera from experimentally infected cats or cats, for which the type of the infecting *T. gondii* had been determined, as well as seronegative cats were used to select appropriate peptides, i.e. peptides with optimal specificity and sensitivity. From these 101 peptides, 54 had previously been characterized for *T. gondii* serotyping in humans (Kong, Grigg et al. 2003). Another 47 peptides were selected for the present study using a bioinformatical approach that employed a propensity scale method (El-Manzalawy und Honavar 2010). Eighteen of the 54 peptides taken from the literature and 9 of the 47 peptides selected by bioinformatics revealed AUC values ≥ 0.7 in ROC analysis and were shown to react in a clonal type-specific manner with cat sera. Interestingly, we found that peptides previously described as suitable for *T. gondii* serotyping in humans and mice (Kong, Grigg et al. 2003, Nowakowska, Colon et al. 2006, Maksimov, Zerweck et al. 2012) could also be used with feline sera. Obviously, such peptides contain clonal type-specific epitopes that are recognized by antibodies produced by a broad variety of vertebrate species including humans, mice and cats, and possibly also other intermediate hosts of *T. gondii*. However, a large number of peptides showed a low clonal type-specificity in cats – although their aa sequences had indicated clonal type specificity – and were therefore not included into the final serotyping peptide panel. Similar results were obtained when peptides with polymorphic epitopes were validated with mouse sera (Kong, Grigg et al. 2003). The low type-specificity of particular peptides may be explained by a strong immunoreactivity in the non-polymorphic parts of these peptides. Further refinement of such peptides, e.g. by varying the length of their non-polymorphic portions may help to achieve type-specific reactivity (Kong, Grigg et al. 2003).

Our experiments led to the detection of 27 peptides deemed suitable for typing canonical clonal types of *T. gondii* infection in cats using sera obtained from these animals. We thus believe that this panel of polymorphic, clonal type-specific peptides can be used for epidemiological studies in cats in areas, where canonical types of *T. gondii* prevail, i.e. in Europe and North America. We applied the peptide panel to determine the distribution of the clonal types of *T. gondii* infection among naturally seropositive cats from Europe based on

DNA from oocysts from naturally infected cats (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010). Genotyping and serotyping could therefore be compared for cats from the same region. Serotyping results in naturally seropositive cats revealed that clonal type II-specific peptides were recognized by the significantly highest MSIVs as compared to peptides with other sequence specificities. Moreover, type II-specific serum-peptide reactions were significantly overrepresented as compared to reactions with the remaining peptide groups. Explorative data analysis using XYF-SKN prediction revealed that 97.7% of sera (84/86) obtained from naturally seropositive cats recognized similar peptide patterns as cats with a known *T. gondii* type II-infection. Only a minority of naturally seropositive cats (2.3%) recognized a peptide pattern similar either to that detected in cats infected with clonal types I or III, or cats infected with non-canonical *T. gondii* types. We therefore assume that the majority of naturally seropositive cats from Germany were infected with type II *T. gondii*, which is in accord with genotyping results obtained with DNA from oocysts shed by cats (Schaes, Vrhovec et al. 2008, Herrmann, Pantchev et al. 2010) and with *T. gondii* serotyping results performed with human sera from Germany (Maksimov, Zerweck et al. 2012). The consistency of the typing results obtained with different methods and with material from different species indicates that serotyping of *T. gondii* using feline sera is a suitable method for epidemiological studies on the distribution of canonical clonal types of *T. gondii*.

One of the problems that might occur with serotyping is the possibility of mixed or superinfections with more than one canonical type of *T. gondii*. Genotyping results suggest that mixed or superinfections can occur in cats (Dubey, Moura et al. 2009, Al-Kappany, Rajendran et al. 2010), but there is no information on the expected frequency. It can be hypothesized that mixed or superinfection may be more likely in areas where more than one of the canonical types of *T. gondii* coexist. Since infection in cats seem to be clearly age-dependent (Opsteegh, Haveman et al. 2012), limiting serotyping to young cats (≤ 2 years of age) might be suitable to reduce the risk of misclassification due to mixed or superinfection in epidemiological studies.

Sousa et al. (2008) (Sousa, Ajzenberg et al. 2008) reported on the serotyping in humans infected with non-canonical *T. gondii* types from Africa and South America by using peptides derived from clonal type II- and I/III-specific polymorphic GRA6 protein regions. Most of these human sera recognized mainly a clonal type I/III GRA6 peptide (Sousa, Ajzenberg et al. 2008). In the present study, we serotyped cats infected with non-canonical *T. gondii* from Brazil (TgCatBr1, 2, 5) and North America (TgBbUS1 and TgGoatUS6). Interestingly, these sera recognized clonal type I/III-specific peptides with the significantly highest mean MSIVs and the number of positive type I/III peptides reactions were significantly overrepresented in

these sera. Strong reactions with individual peptides specific for clonal types I, II or III were also observed. The strong antibody (IgG) reactivity against type I/III-specific peptides in cats infected with non-canonical *T. gondii* may indicate that especially proteins with epitopes common in type I/III are expressed by these non-canonical strains. Since sequences of proteins from these atypical *T. gondii* isolates are not available, it was not possible to test this hypothesis.

In conclusion, in the present study we showed that cats mount an antibody response that is specific for the *T. gondii* clonal type and identified 27 peptides suitable for *T. gondii* serotyping in cats. Our results suggest that most *T. gondii* seropositive cats in Germany are infected with type II *T. gondii*. This finding is in accord with previous findings reporting a predominance of type II *T. gondii* in oocysts shed by cats in Germany (Herrmann, Pantchev et al. 2010) and with *T. gondii* serotyping in humans from Germany, which also suggested that type II infections prevailed (Maksimov, Zerweck et al. 2012). Further studies with larger numbers of well-defined sera may help to improve the evaluation of polymorphic peptides and to identify more peptides suitable for *T. gondii* serotyping in cats.

8.3.6 Acknowledgments

We acknowledge the excellent technical assistance of Andrea Bärwald, Lieselotte Minke and Robert Carus.

8.3.7 References

1. Dabritz HA, Conrad PA (2010) Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses Public Health* 57: 34-52.
2. Elmore SA, Jones JL, Conrad PA, Patton S, Lindsay DS, et al. (2010) *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol* 26: 190-196.
3. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, et al. (2012) Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5844-5849.
4. Su C, Zhang X, Dubey JP (2006) Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36: 841-848.
5. Herrmann DC, Barwald A, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, et al. (2012) *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Vet Res* 43: 39.
6. Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, et al. (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34: 1185-1196.
7. Ajzenberg D (2011) Unresolved questions about the most successful known parasite. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9: 169-171.
8. Dubremetz JF, Lebrun M (2012) Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* 14: 1403-1410.
9. Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC (2003) Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis* 187: 1484-1495.
10. Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, et al. (2002) Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186: 684-689.
11. Boothroyd JC, Grigg ME (2002) Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5: 438-442.

12. Jamieson SE, Peixoto-Rangel AL, Hargrave AC, Roubaix LA, Mui EJ, et al. (2010) Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes Immun* 11: 374-383.
13. Jamieson SE, Cordell H, Petersen E, McLeod R, Gilbert RE, et al. (2009) Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 162-169.
14. Jamieson SE, de Roubaix LA, Cortina-Borja M, Tan HK, Mui EJ, et al. (2008) Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *PLoS one* 3: e2285.
15. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, et al. (2008) Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e277.
16. Fekkar A, Ajzenberg D, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, et al. (2011) Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J Clin Microbiol* 49: 1513-1517.
17. Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, et al. (2012) Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect* 18: E221-231.
18. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP (2001) Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis* 184: 633-639.
19. Herrmann DC, Pantchev N, Vrhovec MG, Barutzki D, Wilking H, et al. (2010) Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int J Parasitol* 40: 285-292.
20. Schares G, Vrhovec MG, Pantchev N, Herrmann DC, Conraths FJ (2008) Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. *Vet Parasitol* 152: 34-45.
21. Herrmann DC, Maksimov P, Maksimov A, Sutor A, Schwarz S, et al. (2012) *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: seroprevalence and genotypes. *Vet Parasitol* 185: 78-85.
22. Al-Kappany YM, Rajendran C, Abu-Elwafa SA, Hilali M, Su C, et al. (2010) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. *J Parasitol* 96: 1112-1114.

23. Al-Kappany YM, Rajendran C, Ferreira L, Kwok O, Abu-Elwafa S, et al. (2010) High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable *Toxoplasma gondii*, tissue distribution, and isolate designation. *J Parasitol* 96: 1115-1118.
24. Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, et al. (1994) Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 80: 293-301.
25. Dubey JP (2008) The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 55: 467-475.
26. Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, et al. (2006) Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect* 8: 2333-2340.
27. Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, et al. (2008) Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect* 10: 742-747.
28. Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Darde ML (2008) Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1380-1386.
29. Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Gross U, et al. (2012) Analysis of Clonal Type-Specific Antibody Reactions in *Toxoplasma gondii* Seropositive Humans from Germany by Peptide-Microarray. *PloS one* 7: e34212.
30. Xiao J, Buka SL, Cannon TD, Suzuki Y, Viscidi RP, et al. (2009) Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. *Microbes Infect* 11: 1011-1018.
31. Dubey JP (2004) Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 126: 57-72.
32. Chen ZW, Gao JM, Huo XX, Wang L, Yu L, et al. (2011) Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China. *Vet Parasitol* 10.1016/j.vetpar.2011.06.013.
33. Dubey JP, Moura L, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan GV, et al. (2009) Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high

- frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. Parasitology 136: 589-594.
34. Dubey JP, Quirk T, Pittt JA, Sundar N, Velmurugan GV, et al. (2008) Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada. J Parasitol 94: 42-45.
 35. Montoya A, Miro G, Mateo M, Ramirez C, Fuentes I (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). Vet Parasitol 160: 159-162.
 36. Dubey JP (1996) Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. J Parasitol 82: 957-961.
 37. Dubey JP (1995) Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. J Parasitol 81: 410-415.
 38. Ale-Davoud SJ, Javazadeh blouri A, H. Sadeghi A, Sabzghabaie MAM, Latifi SM, et al. (2006) Preparation of Ethic codes for studies on laboratory animals. J Babol Univ Med Sci 8: 55-64.
 39. Hosseinijad M (2012) Evaluation of an indirect ELISA using a tachyzoite surface antigen SAG1 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. Exp Parasitol 132: 556-560.
 40. Fazaeli A, Carter PE, Darde ML, Pennington TH (2000) Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis. Int J Parasitol 30: 637-642.
 41. Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, et al. (2009) Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. Clin Vaccine Immunol 16: 1158-1169.
 42. Fischer HG, Stachelhaus S, Sahm M, Meyer HE, Reichmann G (1998) GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. Mol Biochem Parasitol 91: 251-262.
 43. Fazaeli A, Ebrahimzadeh A (2007) A new perspective on and re-assessment of SAG2 locus as the tool for genetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates. Parasitol Res 101: 99-104.

44. Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP (2000) Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. J Parasitol 86: 960-971.
45. Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. J Mol Biol 120: 97-120.
46. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157: 105-132.
47. Jameson BA, Wolf H (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. Comput Appl Biosci 4: 181-186.
48. Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol 55: 836-839.
49. Dubey JP, Desmonts G (1987) Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet J 19: 337-339.
50. Dubey JP, Morales JA, Sundar N, Velmurugan GV, Gonzalez-Barrientos CR, et al. (2007) Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica. J Parasitol 93: 710-711.
51. Lunde MN, Jacobs L (1983) Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 69: 806-808.
52. Howe DK, Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis 172: 1561-1566.
53. Hosseininejad M, Azizi HR, Hosseini F, Schares G (2009) Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. Vet Parasitol 164: 315-319.
54. Spycher A, Geigy C, Howard J, Posthaus H, Gendron K, et al. (2011) Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* causing fatal systemic toxoplasmosis in an immunocompetent 10-year-old cat. J Vet Diagn Invest 23: 104-108.
55. Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, et al. (2004) *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. J Parasitol 90: 721-726.

56. Dubey JP, Rajendran C, Ferreira LR, Kwok OC, Sinnett D, et al. (2010) A new atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from a wild black bear in Alaska. *J Parasitol* 96: 713-716.
57. Maksimov P, Buschtons S, Herrmann DC, Conraths FJ, Gorlich K, et al. (2011) Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Vet Parasitol* 182: 140-149.
58. Schares G, Peters M, Wurm R, Barwald A, Conraths FJ (1998) The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 80: 87-98.
59. Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Gross U, et al. (2012) Peptide microarray analysis of *in silico*-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin Vaccine Immunol* 19: 865-874.
60. Nahtman T, Jernberg A, Mahdavifar S, Zerweck J, Schutkowski M, et al. (2007) Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. *J Immunol Methods* 328: 1-13.
61. Ngo Y, Advani R, Valentini D, Gaseitsiwe S, Mahdavifar S, et al. (2009) Identification and testing of control peptides for antigen microarrays. *J Immunol Methods* 343: 68-78.
62. Pamelard F, Even G, Apostol C, Preda C, Dhaenens C, et al. (2009) PASE: a web-based platform for peptide/protein microarray experiments. *Methods Mol Biol* 570: 413-430.
63. Vigil A, Ortega R, Jain A, Nakajima-Sasaki R, Tan X, et al. (2010) Identification of the feline humoral immune response to *Bartonella henselae* infection by protein microarray. *PLoS one* 5: e11447.
64. Meyer D, Zeileis A, Hornik K (2006) The strucplot framework: visualizing multi-way contingency tables with VCD. *J Stat Softw* 17.
65. Buydens LMC, Wehrens R (2007) Self- and Super-organizing Maps in R: The kohonen Package. *J Stat Softw* 21.
66. Melssen W, Wehrens R, Buydens L (2006) Supervised Kohonen networks for classification problems. *Chemometr Intell Lab* 83: 99-113.
67. Toronen P, Kolehmainen M, Wong G, Castren E (1999) Analysis of gene expression data using self-organizing maps. *FEBS Lett* 451: 142-146.

68. Wang J, Delabie J, Aasheim H, Smeland E, Myklebost O (2002) Clustering of the SOM easily reveals distinct gene expression patterns: results of a reanalysis of lymphoma study. *BMC Bioinformatics* 3: 36.
69. Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Darde ML (2010) Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol* 169: 24-28.
70. El-Manzalawy Y, Honavar V (2010) Recent advances in B-cell epitope prediction methods. *Immunome Res* 6 Suppl 2: S2.
71. Nowakowska D, Colon I, Remington JS, Grigg M, Golab E, et al. (2006) Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 44: 1382-1389.
72. Opsteegh M, Haveman R, Swart AN, Mensink-Beerepoot ME, Hofhuis A, et al. (2012) Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. *Prev Vet Med* 104: 317-326.

8.3.8 Table 1. Positive and negative TgSAG1 immunoblot reactions versus reciprocal *Toxoplasma gondii* IFAT titers in feline field and reference sera (n=166).

TgSAG1 immunoblot	Reciprocal <i>Toxoplasma gondii</i> IFAT titre*												
	<25	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
Negative	12	25	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positive	0	0	0	0	2	2	5	17	26	15	19	22	6

*:Positive reciprocal IFAT cut-off > 200

8.3.9 Table 2. Means of cut-off normalized mean reaction values in peptide and cat groups analyzed by ANOVA/LSD Post-Hoc-Test

Cat groups* (Least significant difference, LSD)	Means of CN-MSIV within peptide groups (95% CI)**				
	I	II	III	I/II	I/III
I (≥ 0.523)	0.37 (0.14...0.6)	-0.38 (-0.28...-0.48)	-0.87 (-0.76...0.98)	0.75 (0.46...1.04)	0.95 (0.68...1.22)
II (≥ 1.034)	-1.04 (-1.17...-0.91)	0.93 (0.64...1.22)	-1.12 (-1.41...-0.83)	1.06 (0.58...1.54)	-1.15 (-1.39...-0.91)
III (≥ 1.129)	-0.59 (-0.97...-0.21)	-0.41 (-0.69...-0.13)	0 (0...0)	-0.09 (-0.27...0.09)	1.55 (0.96...2.14)
N (≥ 0.259)	-0.73 (-0.79...-0.67)	0.03 (-0.04...0.1)	-1.19 (-1.26...1.12)	0.35 (0.23...0.47)	-1.08 (-1.18...-0.98)
A (≥ 0.902)	-0.23 (-0.62...0.16)	0.2 (-0.01...0.39)	-0.56 (-0.77...-0.35)	0.65 (0.36...0.94)	2.37 (1.97...2.77)

*Cat groups: I, cats infected with *Toxoplasma gondii* clonal type I (n=17); II, cats infected with *T. gondii* clonal type II (n=3); III, cat infected with *T. gondii* clonal type III (n=1); N, naturally *T. gondii* infected cats (n=86); A, cats infected with non-canonical *T. gondii* types; **Peptide groups: I, II, or III, peptides with *T. gondii* type I, II, or III specific amino acid (aa) sequences; I/II, peptides with aa sequences specific for both, type I and II; I/III, peptides with aa sequences specific for both, type I and III; CI: confidence interval; CN-MSIV: Cut-off normalized mean reaction values (reaction value – cut-off value = CN-MSIV); In bold: statistically significant higher mean of CN-MSIVs according to ANOVA/LSD Post-Hoc-Test

9 Literaturverzeichnis

- Abu-Madi, M. A., N. Al-Molawi und J. M. Behnke (2008). "Seroprevalence and epidemiological correlates of *Toxoplasma gondii* infections among patients referred for hospital-based serological testing in Doha, Qatar." Parasit Vectors **1**(1): 39.
- Ajzenberg, D. (2011). "Unresolved questions about the most successful known parasite." Expert Rev Anti Infect Ther **9**(2): 169-171.
- Ajzenberg, D. (2012). "High burden of congenital toxoplasmosis in the United States: the strain hypothesis?" Clin Infect Dis **54**(11): 1606-1607.
- Ajzenberg, D., A. L. Banuls, C. Su, A. Dumetre, M. Demar, B. Carne und M. L. Darde (2004). "Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **34**(10): 1185-1196.
- Ajzenberg, D., A. L. Banuls, M. Tibayrenc und M. L. Darde (2002). "Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups." Int J Parasitol **32**(1): 27-38.
- Ajzenberg, D., N. Cogne, L. Paris, M. H. Bessieres, P. Thulliez, D. Filisetti, H. Pelloux, P. Marty und M. L. Darde (2002). "Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings." J Infect Dis **186**(5): 684-689.
- Ajzenberg, D., F. Collinet, A. Mercier, P. Vignoles und M. L. Darde (2010). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay." J Clin Microbiol **48**(12): 4641-4645.
- Ajzenberg, D., A. Dumetre und M. L. Darde (2005). "Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*." J Clin Microbiol **43**(4): 1940-1943.
- Ajzenberg, D., H. Yera, P. Marty, L. Paris, F. Dalle, J. Menotti, D. Aubert, J. Franck, M. H. Bessieres, D. Quinio, H. Pelloux, L. Delhaes, N. Desbois, P. Thulliez, F. Robert-Gangneux, C. Kauffmann-Lacroix, S. Pujol, M. Rabodonirina, M. E. Bognoux, B. Cuisenier, C. Duhamel, T. H. Duong, D. Filisetti, P. Flori, F. Gay-Andrieu, F. Pratlong, G. Nevez, A. Totet, B. Carne, H. Bonnabau, M. L. Darde und I. Villena (2009). "Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings." J Infect Dis **199**(8): 1155-1167.
- Al-Kappany, Y. M., C. Rajendran, S. A. Abu-Elwafa, M. Hilali, C. Su und J. P. Dubey (2010). "Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes." J Parasitol **96**(6): 1112-1114.
- Al-Kappany, Y. M., C. Rajendran, L. Ferreira, O. Kwok, S. Abu-Elwafa, M. Hilali und J. Dubey (2010). "High prevalence of toxoplasmosis in cats from Egypt: isolation of viable *Toxoplasma gondii*, tissue distribution, and isolate designation." J Parasitol **96**(6): 1115-1118.
- Ale-Davoud, S. J., A. Javazadeh blouri, A. H. Sadeghi, M. A. M. Sabzghabaie, S. M. Latifi, N. R. und B. Larijani (2006). "Preparation of Ethic codes for studies on laboratory animals." J Babol Univ Med Sci **8**(3): 55-64.

- Alexander, M., K. Janitschke und R. Pein (1971). "[Course of titer curves in the Sabin-Feldman test in latent *Toxoplasma*-infected mice following experimentally induced methylcholanthrene fibrosarcoma]." Klin Wochenschr **49**(23): 1264-1267.
- Altcheh, J., N. S. Diaz, C. M. Pepe, V. Martin, M. Nigro, H. Freilij und S. O. Angel (2006). "Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis." Diagn Microbiol Infect Dis **56**(2): 161-165.
- Andresen, H. und F. F. Bier (2009). "Peptide microarrays for serum antibody diagnostics." Methods Mol Biol **509**: 123-134.
- Asai, T., S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi und T. Takeuchi (1995). "Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **270**(19): 11391-11397.
- Aspinall, T. V., E. C. Guy, K. E. Roberts, D. H. Joynson, J. E. Hyde und P. F. Sims (2003). "Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications." Int J Parasitol **33**(1): 97-103.
- Aubert, D., D. Ajzenberg, C. Richomme, E. Gilot-Fromont, M. E. Terrier, C. de Gevigney, Y. Game, D. Maillard, P. Gibert, M. L. Darde und I. Villena (2010). "Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France." Vet Parasitol **171**(3-4): 346-349.
- Barlow, D. J., M. S. Edwards und J. M. Thornton (1986). "Continuous and discontinuous protein antigenic determinants." Nature **322**(6081): 747-748.
- Barragan, A. und L. D. Sibley (2002). "Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence." J Exp Med **195**(12): 1625-1633.
- Beghetto, E., W. Buffolano, A. Spadoni, M. Del Pezzo, M. Di Cristina, O. Minenkova, E. Petersen, F. Felici und N. Gargano (2003). "Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy." J Clin Microbiol **41**(12): 5414-5418.
- Beghetto, E., A. Pucci, O. Minenkova, A. Spadoni, L. Bruno, W. Buffolano, D. Soldati, F. Felici und N. Gargano (2001). "Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries." Int J Parasitol **31**(14): 1659-1668.
- Beghetto, E., A. Spadoni, L. Bruno, W. Buffolano und N. Gargano (2006). "Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products." J Clin Microbiol **44**(6): 2133-2140.
- Beghetto, E., A. Spadoni, W. Buffolano, M. Del Pezzo, O. Minenkova, E. Pavoni, A. Pucci, R. Cortese, F. Felici und N. Gargano (2003). "Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries." Int J Parasitol **33**(2): 163-173.
- Behnke, M. S., A. Khan, J. C. Wootton, J. P. Dubey, K. Tang und L. D. Sibley (2011). "Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(23): 9631-9636.
- Beverly, J. K. (1959). "Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice." Nature **183**(4671): 1348-1349.

- Binas, M. und A. M. Johnson (1998). "A polymorphism in a DNA polymerase alpha gene intron differentiates between murine virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **28**: 1033-1040.
- Blader, I. J. und J. P. Saeij (2009). "Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence." Apmis **117**(5-6): 458-476.
- Blythe, M. J. und D. R. Flower (2005). "Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods." Protein Sci **14**(1): 246-248.
- Boothroyd, J. C. und M. E. Grigg (2002). "Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?" Curr Opin Microbiol **5**(4): 438-442.
- Brinkman, K., S. Debast, R. Sauerwein, F. Ooyman, J. Hiel und J. Raemaekers (1998). "*Toxoplasma* retinitis/encephalitis 9 months after allogeneic bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **21**(6): 635-636.
- Burg, J. L., D. Perelman, L. H. Kasper, P. L. Ware und J. C. Boothroyd (1988). "Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **141**(10): 3584-3591.
- Buydens, L. M. C. und R. Wehrens (2007). "Self- and Super-organizing Maps in R: The kohonen Package." J Stat Soft **21**(i05).
- Buydens, L. M. C. und R. Wehrens (2007). "Self- and Super-organizing Maps in R: The kohonen Package." J Stat Softw **21**(i05).
- Buzoni-Gatel, D. und C. Werts (2006). "*Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system." Trends Parasitol **22**(10): 448-452.
- Cardona, N., A. de-la-Torre, H. Siachoque, M. A. Patarroyo und J. E. Gomez-Marin (2009). "*Toxoplasma gondii*: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis." Exp Parasitol **123**(2): 199-202.
- Carruthers, V. B. (1999). "Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells." Parasitol Int **48**(1): 1-10.
- Carruthers, V. B., S. Hakansson, O. K. Giddings und L. D. Sibley (2000). "*Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment." Infect Immun **68**(7): 4005-4011.
- Cesbron-Delauw, M. F. (1994). "Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship." Parasitol Today **10**(8): 293-296.
- Chen, C., X. Zhou, Y. Tian, X. Zou und P. Cai (2006). "Predicting protein structural class with pseudo-amino acid composition and support vector machine fusion network." Anal Biochem **357**(1): 116-121.
- Chen, Z. W., J. M. Gao, X. X. Huo, L. Wang, L. Yu, F. Halm-Lai, Y. H. Xu, W. J. Song, G. Hide, J. L. Shen und Z. R. Lun (2011). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China." Vet Parasitol.
- Correa, D., I. Canedo-Solares, L. B. Ortiz-Alegria, H. Caballero-Ortega und C. P. Rico-Torres (2007). "Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host." Parasite Immunol **29**(12): 651-660.

- Crouch, C. F. (1995). "Enzyme immunoassays for IgG and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* based on enhanced chemiluminescence." J Clin Pathol **48**(7): 652-657.
- Cunha-Júnior, J. P., D. A. Silva, N. M. Silva, M. A. Souza, G. R. Souza, C. R. Prudencio, C. P. Pirovani, M. C. Cezar, B. F. Barbosa, L. R. Goulart und J. R. Mineo (2010). "A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection." Immunobiology **215**(1): 26-37.
- Dabritz, H. A. und P. A. Conrad (2010). "Cats and *Toxoplasma*: implications for public health." Zoonoses Public Health **57**(1): 34-52.
- Dardé, M. L. (1996). "Biodiversity in *Toxoplasma gondii* " Curr Top Microbiol Immunol **219**: 27-41.
- Dardé, M. L., B. Bouteille und M. Pestre-Alexandre (1988). "Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels." Am J Trop Med Hyg **39**(6): 551-558.
- Dardé, M. L., H. Riahi, B. Bouteille und M. Pestre-Alexandre (1992). "Isoenzyme analysis of *Hammondia hammondi* and *Toxoplasma gondii* sporozoites." J Parasitol **78**(4): 731-734.
- Davis, S. W. und J. P. Dubey (1995). "Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats." J Parasitol **81**(6): 882-886.
- Dawoud, H. A., H. M. Ageely, A. H. El Shake und A. A. Heiba (2009). "Latex agglutination and indirect immunofluorescence tests in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* in Saudi Arabia." J Egypt Soc Parasitol **39**(1): 1-9.
- Degauque, N., C. Mariat, J. Kenny, D. Zhang, W. Gao, M. D. Vu, S. Alexopoulos, M. Oukka, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, V. Kuchroo, X. X. Zheng und T. B. Strom (2008). "Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice." J Clin Invest **118**(2): 735-741.
- Del Bono, V., A. Canessa, P. Bruzzi, M. A. Fiorelli und A. Terragna (1989). "Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy." J Clin Microbiol **27**(9): 2133-2135.
- Delair, E., P. Latkany, A. G. Noble, P. Rabiah, R. McLeod und A. Brezin (2011). "Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis." Ocul Immunol Inflamm **19**(2): 91-102.
- Demar, M., D. Ajzenberg, D. Maubon, F. Djossou, D. Panchoe, W. Punwasi, N. Valery, C. Peneau, J. L. Daigre, C. Aznar, B. Cottrelle, L. Terzan, M. L. Darde und B. Carme (2007). "Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects." Clin Infect Dis **45**(7): e88-95.
- Demar, M., D. Hommel, F. Djossou, C. Peneau, R. Boukhari, D. Louvel, A. M. Bourbigot, V. Nasser, D. Ajzenberg, M. L. Darde und B. Carme (2012). "Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana." Clin Microbiol Infect **18**(7): E221-231.
- Denkers, E. Y. und R. T. Gazzinelli (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-569.

- Derouin, F., C. Leport, S. Pueyo, P. Morlat, J. L. Ecobichon, B. Letrillart, G. Chene, B. Luft, J. Aubertin, R. Hafner, J. L. Vilde und R. Salamon (1996). "Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients." AIDS **10**(13): 1521-1527.
- Diza, E., F. Frantzidou, E. Souliou, M. Arvanitidou, G. Gioula und A. Antoniadis (2005). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in northern Greece during the last 20 years." Clin Microbiol Infect **11**(9): 719-723.
- Duarte, J. H., S. Zelenay, M. L. Bergman, A. C. Martins und J. Demengeot (2009). "Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions." Eur J Immunol **39**(4): 948-955.
- Dubey, J. (2010). Toxoplasmosis of Animals and Humans Taylor and Francis Group, LLC.
- Dubey, J. P. (1995). "Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats." J Parasitol **81**(3): 410-415.
- Dubey, J. P. (1996). "Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats." J Parasitol **82**(6): 957-961.
- Dubey, J. P. (1998). "Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **28**(7): 1019-1024.
- Dubey, J. P. (1998). "Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion." Parasitology **116**(Pt 1): 43-50.
- Dubey, J. P. (1998). "*Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures." J Parasitol **84**(4): 862-865.
- Dubey, J. P. (2001). "Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice." J Parasitol **87**(1): 215-219.
- Dubey, J. P. (2004). "Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis." Vet Parasitol **126**(1-2): 57-72.
- Dubey, J. P. (2005). "Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: *in vivo* stage conversion and strain variation." Vet Parasitol **133**(4): 289-298.
- Dubey, J. P. (2008). "The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years." J Eukaryot Microbiol **55**(6): 467-475.
- Dubey, J. P. (2009). "History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **39**(8): 877-882.
- Dubey, J. P. (2010). "*Toxoplasma gondii* Infections in Chickens (*Gallus domesticus*): Prevalence, Clinical Disease, Diagnosis and Public Health Significance." Zoonoses Public Health **57**(1): 60-73.
- Dubey, J. P. (2010). Toxoplasmosis of animals and humans. Boca Rotan, CRC Press.
- Dubey, J. P. und J. L. Carpenter (1993). "Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990)." J Am Vet Med Assoc **203**(11): 1556-1566.

- Dubey, J. P. und G. Desmonts (1987). "Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts." Equine Vet J **19**(4): 337-339.
- Dubey, J. P. und J. K. Frenkel (1976). "Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts." J Protozool **23**(4): 537-546.
- Dubey, J. P. und J. L. Jones (2008). "*Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States." Int J Parasitol **38**(11): 1257-1278.
- Dubey, J. P., M. R. Lappin und P. Thulliez (1995). "Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts." J Parasitol **81**(6): 887-893.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay und C. A. Speer (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-299.
- Dubey, J. P., N. L. Miller und J. K. Frenkel (1970). "Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **56**(3): 447-456.
- Dubey, J. P., N. L. Miller und J. K. Frenkel (1970). "*Toxoplasma gondii* life cycle in cats." J Am Vet Med Assoc **157**(11): 1767-1770.
- Dubey, J. P., J. A. Morales, N. Sundar, G. V. Velmurugan, C. R. Gonzalez-Barrientos, G. Hernandez-Mora und C. Su (2007). "Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from Costa Rica." J Parasitol **93**(3): 710-711.
- Dubey, J. P., L. Moura, D. Majumdar, N. Sundar, G. V. Velmurugan, O. C. Kwok, P. Kelly, R. C. Krecek und C. Su (2009). "Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies." Parasitology **136**(6): 589-594.
- Dubey, J. P., I. T. Navarro, C. Sreekumar, E. Dahl, R. L. Freire, H. H. Kawabata, M. C. Vianna, O. C. Kwok, S. K. Shen, P. Thulliez und T. Lehmann (2004). "*Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates." J Parasitol **90**(4): 721-726.
- Dubey, J. P., T. Quirk, J. A. Pittt, N. Sundar, G. V. Velmurugan, O. C. Kwok, D. Leclair, R. Hill und C. Su (2008). "Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada." J Parasitol **94**(1): 42-45.
- Dubey, J. P., C. Rajendran, L. R. Ferreira, O. C. Kwok, D. Sinnett, D. Majumdar und C. Su (2010). "A new atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from a wild black bear in Alaska." J Parasitol **96**(4): 713-716.
- Dubey, J. P., S. K. Shen, O. C. Kwok und P. Thulliez (1997). "Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats." Parasitology **115** (Pt 1): 9-14.
- Dubremetz, J. F. und M. Lebrun (2012). "Virulence factors of *Toxoplasma gondii*." Microbes Infect **14**(15): 1403-1410.
- Eckert, J., K. T. Friedhoff, H. Zahner und P. Deplazes (2008). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Enke Verlag.

- Ee, T. Y., M. Singh und E. H. Yap (1989). "The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." Southeast Asian J Trop Med Public Health **20**(1): 71-79.
- El-Manzalawy, Y. und V. Honavar (2010). "Recent advances in B-cell epitope prediction methods." Immunome Res **6 Suppl 2**: S2.
- El-Manzalawy, Y. und V. Honavar (2010). "Recent advances in B-cell epitope prediction methods." Immunome Res **6** (Suppl 2): S2.
- Elmore, S. A., J. L. Jones, P. A. Conrad, S. Patton, D. S. Lindsay und J. P. Dubey (2010). "*Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention." Trends Parasitol **26**(4): 190-196.
- Emini, E. A., J. V. Hughes, D. S. Perlow und J. Boger (1985). "Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide." J Virol **55**(3): 836-839.
- Falsey, J. R., M. Renil, S. Park, S. Li und K. S. Lam (2001). "Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays." Bioconjug Chem **12**(3): 346-353.
- Fazaeli, A., P. E. Carter, M. L. Dardé und T. H. Pennington (2000). "Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by GRA6 gene sequence analysis." Int J Parasitol **30**(5): 637-642.
- Fazaeli, A. und A. Ebrahimzadeh (2007). "A new perspective on and re-assessment of SAG2 locus as the tool for genetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates." Parasitol Res **101**(1): 99-104.
- Fekkar, A., D. Ajzenberg, B. Bodaghi, F. Touafek, P. Le Hoang, J. Delmas, P. Y. Robert, M. L. Dardé, D. Mazier und L. Paris (2011). "Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France." J Clin Microbiol **49**(4): 1513-1517.
- Ferreira Ade, M., R. W. Vitor, A. C. Carneiro, G. P. Brandao und M. N. Melo (2004). "Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR)." Infect Genet Evol **4**(2): 131-142.
- Fischer, H. G., S. Stachelhaus, M. Sahm, H. E. Meyer und G. Reichmann (1998). "GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 251-262.
- Flori, P., G. Chene, M. N. Varlet und R. T. Sung (2009). "*Toxoplasma gondii* serology in pregnant woman: characteristics and pitfalls." Ann Biol Clin (Paris) **67**(2): 125-133.
- Foudrinier, F., I. Villena, R. Jaussaud, D. Aubert, C. Chemla, F. Martinot und J. M. Pinon (2003). "Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis." J Clin Microbiol **41**(4): 1681-1686.
- Frenkel, J. K., J. P. Dubey und N. L. Miller (1970). "*Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts." Science **167**(3919): 893-896.
- Friese, K., M. Weigel und F. Melchert (1994). "[Diagnosis and therapy of congenital toxoplasmosis]." Geburtshilfe Frauenheilkd **54**(8): M99-101.

- Fritz, H. M., K. R. Buchholz, X. Chen, B. Durbin-Johnson, D. M. Rocke, P. A. Conrad und J. C. Boothroyd (2012). "Transcriptomic analysis of *Toxoplasma* development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts." PloS one **7**(2): e29998.
- Fuentes, I., J. M. Rubio, C. Ramirez und J. Alvar (2001). "Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples." J Clin Microbiol **39**(4): 1566-1570.
- Gao, X., X. Zhou und E. Gulari (2003). "Light directed massively parallel on-chip synthesis of peptide arrays with t-Boc chemistry." Proteomics **3**(11): 2135-2141.
- Garcia, J. L., S. M. Gennari, I. T. Navarro, R. Z. Machado, S. A. Headley, O. Vidotto, J. J. Silva Guimaraes, F. M. Bugni und M. Igarashi (2008). "Evaluation of IFA, MAT, ELISAs and immunoblotting for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in paired serum and aqueous humour samples from experimentally infected pigs." Res Vet Sci **84**(2): 237-242.
- Garnier, J., D. J. Osguthorpe und B. Robson (1978). "Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins." J Mol Biol **120**(1): 97-120.
- Gaseitsiwe, S., D. Valentine, R. Ahmed, S. Mahdavifar, I. Magalhaes, J. Zerweck, M. Schutkowski, E. Gautherot, F. Montero, A. Ehrnst, M. Reilly und M. Maeurer (2009). "MHC class II molecule - peptide complex analysis on a microarray chip." Clin Vaccine Immunol **16**(4): 567-573.
- Gaseitsiwe, S., D. Valentini, S. Mahdavifar, I. Magalhaes, D. F. Hoft, J. Zerweck, M. Schutkowski, J. Andersson, M. Reilly und M. J. Maeurer (2008). "Pattern recognition in pulmonary tuberculosis defined by high content peptide microarray chip analysis representing 61 proteins from *M. tuberculosis*." PLoS ONE **3**(12): e3840.
- Geissler, S., W. Sokolowska-Köhler, R. Bollmann, P. R. Jungblut und W. Presber (1999). "*Toxoplasma gondii* infection: analysis of serological response by 2-DE immunoblotting." FEMS Immunol Med Microbiol **25**(3): 299-311.
- Gilbert, R. E., K. Freeman, E. G. Lago, L. M. Bahia-Oliveira, H. K. Tan, M. Wallon, W. Buffolano, M. R. Stanford und E. Petersen (2008). "Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe." PLoS Negl Trop Dis **2**(8): e277.
- Godard, I., F. Darcy, D. Deslee, J. P. Dessaint und A. Capron (1990). "Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies." Infect Immun **58**(8): 2446-2451.
- Golkar, M., K. Azadmanesh, G. Khalili, B. Khoshkholgh-Sima, J. Babaie, C. Mercier, M. P. Brenier-Pinchart, H. Fricker-Hidalgo, H. Pelloux und M. F. Cesbron-Delauw (2008). "Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein." Diagn Microbiol Infect Dis **61**(1): 31-39.
- Gorgievski-Hrisoho, M., D. Germann und L. Matter (1996). "Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*." J Clin Microbiol **34**(6): 1506-1511.

- Grigg, M. E., S. Bonnefoy, A. B. Hehl, Y. Suzuki und J. C. Boothroyd (2001). "Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries." Science **294**(5540): 161-165.
- Grigg, M. E. und J. C. Boothroyd (2001). "Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene." J Clin Microbiol **39**(1): 398-400.
- Grigg, M. E., J. Ganatra, J. C. Boothroyd und T. P. Margolis (2001). "Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis." J Infect Dis **184**(5): 633-639.
- Grigg, M. E. und Y. Suzuki (2003). "Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*." Microbes Infect **5**(7): 685-690.
- Groß, U. (2004). "[Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]." Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz **47**(7): 692-697.
- Groß, U., T. Roos, D. Appoldt und J. Heesemann (1992). "Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using immunoblot technique." J Clin Microbiol **30**(6): 1436-1441.
- Groß, U., T. Roos, D. Appoldt und J. Heesemann (1992). "Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 by using the immunoblot technique." J Clin Microbiol **30**(6): 1436-1441.
- Guo, Z. G., U. Groß und A. M. Johnson (1997). "*Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction." Parasitol Res **83**(5): 458-463.
- Guo, Z. G. und A. M. Johnson (1995). "Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction." Parasitology **111** (Pt 2): 127-132.
- Harning, D., J. Spenter, A. Metsis, J. Vuust und E. Petersen (1996). "Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies." Clin Diagn Lab Immunol **3**(3): 355-357.
- Haste Andersen, P., M. Nielsen und O. Lund (2006). "Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures." Protein Sci. **15**(11): 2558-2567.
- Herrmann, D. C., A. Bärwald, A. Maksimov, N. Pantchev, M. G. Vrhovec, F. J. Conraths und G. Schares (2012). "*Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III." Vet Res **43**(1): 39.
- Herrmann, D. C., P. Maksimov, A. Maksimov, A. Sutor, S. Schwarz, W. Jaschke, A. Schliephake, N. Denzin, F. J. Conraths und G. Schares (2012). "*Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: seroprevalence and genotypes." Vet Parasitol **185**(2-4): 78-85.
- Herrmann, D. C., N. Pantchev, M. G. Vrhovec, D. Barutzki, H. Wilking, A. Fröhlich, C. G. Luder, F. J. Conraths und G. Schares (2010). "Atypical *Toxoplasma gondii*

genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany." Int J Parasitol **40**(3): 285-292.

Hill, R. D. und C. Su (2012). "High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice." Vet Parasitol **187**(1-2): 36-43.

Holec-Gasior, L., J. Kur und E. Hisczynska-Sawicka (2009). "GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis." Clin Vaccine Immunol **16**(4): 510-514.

Holec-Gasior, L., J. Stanczak, P. Myjak und J. Kur (2008). "[Occurrence of *Toxoplasma gondii* specific antibodies in group of forestry workers from pomorskie and warminsko-mazurskie provinces]." Wiad Parazytol **54**(3): 231-236.

Holec, L., A. Gasior, A. Brillowska-Dabrowska und J. Kur (2008). "*Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies." Exp Parasitol **119**(1): 1-6.

Holland, G. N. (2004). "Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management." Am J Ophthalmol **137**(1): 1-17.

Holland, G. N., K. G. Lewis und G. R. O'Connor (2002). "Ocular toxoplasmosis: a 50th anniversary tribute to the contributions of Helenor Campbell Wilder Foerster." Arch Ophthalmol **120**(8): 1081-1084.

Hommann, M., U. Schotte, R. Voigt, H. Glutig, T. Grube, B. Kupper, A. Kornberg, K. Richter und J. Scheele (2002). "Cerebral toxoplasmosis after combined liver-pancreas-kidney and liver-pancreas transplantation." Transplant Proc **34**(6): 2294-2295.

Honore, S., A. Couvelard, Y. J. Garin, C. Bedel, D. Henin, M. L. Darde und F. Derouin (2000). "[Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients]." Pathol Biol (Paris) **48**(6): 541-547.

Hopp, T. P. und K. R. Woods (1981). "Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(6): 3824-3828.

Hosseininejad, M. (2012). "Evaluation of an indirect ELISA using a tachyzoite surface antigen SAG1 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats." Exp Parasitol **132**(4): 556-560.

Hosseininejad, M., H. R. Azizi, F. Hosseini und G. Schares (2009). "Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for sero-diagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection." Vet Parasitol **164**(2-4): 315-319.

Houseman, B. T. und M. Mrksich (2002). "Towards quantitative assays with peptide chips: a surface engineering approach." Trends Biotechnol **20**(7): 279-281.

Howe, D. K., S. Honore, F. Derouin und L. D. Sibley (1997). "Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis." J Clin Microbiol **35**(6): 1411-1414.

Howe, D. K. und L. D. Sibley (1995). "*Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease." J Infect Dis **172**(6): 1561-1566.

- Huskinson, J., P. N. Stepick-Biek, F. G. Araujo, P. Thulliez, Y. Suzuki und J. S. Remington (1989). "*Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection." J Clin Microbiol **27**(9): 2031-2038.
- Igarashi, M., F. Kano, K. Tamekuni, P. M. Kawasaki, I. T. Navarro, O. Vidotto, M. C. Vidotto, R. Z. Machado und J. L. Garcia (2008). "*Toxoplasma gondii*: cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7." Genet Mol Res **7**(2): 305-313.
- Jacobs, D., M. Vercammen und E. Saman (1999). "Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain." Clin Diagn Lab Immunol **6**(1): 24-29.
- Jameson, B. A. und H. Wolf (1988). "The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants." Comput Appl Biosci **4**(1): 181-186.
- Jamieson, S. E., H. Cordell, E. Petersen, R. McLeod, R. E. Gilbert und J. M. Blackwell (2009). "Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 162-169.
- Jamieson, S. E., L. A. de Roubaix, M. Cortina-Borja, H. K. Tan, E. J. Mui, H. J. Cordell, M. J. Kirisits, E. N. Miller, C. S. Peacock, A. C. Hargrave, J. J. Coyne, K. Boyer, M. H. Bessieres, W. Buffolano, N. Ferret, J. Franck, F. Kieffer, P. Meier, D. E. Nowakowska, M. Paul, F. Peyron, B. Stray-Pedersen, A. R. Prusa, P. Thulliez, M. Wallon, E. Petersen, R. McLeod, R. E. Gilbert und J. M. Blackwell (2008). "Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis." PLoS One **3**(6): e2285.
- Jamieson, S. E., A. L. Peixoto-Rangel, A. C. Hargrave, L. A. Roubaix, E. J. Mui, N. R. Boulter, E. N. Miller, S. J. Fuller, J. S. Wiley, L. Castellucci, K. Boyer, R. G. Peixe, M. J. Kirisits, L. S. Elias, J. J. Coyne, R. Correa-Oliveira, M. Sautter, N. C. Smith, M. P. Lees, C. N. Swisher, P. Heydemann, A. G. Noble, D. Patel, D. Bardo, D. Burrowes, D. McLone, N. Roizen, S. Withers, L. M. Bahia-Oliveira, R. McLeod und J. M. Blackwell (2010). "Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis." Genes Immun. **11**(5): 374-383.
- Janitschke, K., T. Held, D. Kruiger, R. Schwerdtfeger, G. Schlier und O. Liesenfeld (2003). "Diagnostic value of tests for *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in patients undergoing bone marrow transplantation." Clin Lab **49**(5-6): 239-242.
- Joosten, R. P., T. A. te Beek, E. Krieger, M. L. Hekkelman, R. W. Hooft, R. Schneider, C. Sander und G. Vriend (2011). "A series of PDB related databases for everyday needs." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D411-419.
- Joosten, R. P. und G. Vriend (2007). "PDB improvement starts with data deposition." Science **317**(5835): 195-196.
- Joosten, R. P., T. Womack, G. Vriend und G. Bricogne (2009). "Re-refinement from deposited X-ray data can deliver improved models for most PDB entries." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **65**(Pt 2): 176-185.
- Jung, C., C. Y. Lee und M. E. Grigg (2004). "The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins." Int J Parasitol **34**(3): 285-296.

- Kafsack, B. F., J. D. Pena, I. Coppens, S. Ravindran, J. C. Boothroyd und V. B. Carruthers (2009). "Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells." Science **323**(5913): 530-533.
- Kamerkar, S. und P. H. Davis (2012). "*Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection." J Parasitol Res **2012**: 589295.
- Kato, M., F. G. Claveria, Y. Maki, K. Sanda, T. Tanaka, Y. Omata, H. Nagasawa und N. Suzuki (2007). "Reactivity of synthetic SAG1 (p30) peptide sequences with RH, S273 and Beverley strain-induced anti-*Toxoplasma gondii* antibodies." Pathobiology **74**(1): 50-56.
- Kato, M., F. G. Claveria, Y. Maki, T. Tanaka, N. Suzuki und H. Nagasawa (2005). "*Toxoplasma gondii* antigens GRA1 (p24) and SAG1 (p30): a comparison of their stimulatory influence on T-cell activation and cytokine expression in in vitro cultures." Pathobiology **72**(3): 160-164.
- Khan, A., J. P. Dubey, C. Su, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal und L. D. Sibley (2011). "Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America." Int J Parasitol **41**(6): 645-655.
- Khan, A., C. Jordan, C. Muccioli, A. L. Vallochi, L. V. Rizzo, R. Belfort, W. A. V. Ricardo, C. Silveira und L. D. Sibley (2006). "Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil." Emerg Infect Dis **12**(6): 942-949.
- Khan, A., N. Miller, D. S. Roos, J. P. Dubey, D. Ajzenberg, M. L. Darde, J. W. Ajioka, B. Rosenthal und L. D. Sibley (2011). "A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*." mBio **2**(6): e00228-00211.
- Khan, A., C. Su, M. German, G. A. Storch, D. B. Clifford und L. D. Sibley (2005). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains." J Clin Microbiol **43**(12): 5881-5887.
- Khan, A., S. Taylor, C. Su, A. J. Mackey, J. Boyle, R. Cole, D. Glover, K. Tang, I. T. Paulsen, M. Berriman, J. C. Boothroyd, E. R. Pfefferkorn, J. P. Dubey, J. W. Ajioka, D. S. Roos, J. C. Wootton und L. D. Sibley (2005). "Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*." Nucleic Acids Res **33**(9): 2980-2992.
- Kijlstra, A. und E. Jongert (2008). "Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat." Int J Parasitol **38**(12): 1359-1370.
- Kim, K., R. Bulow, J. Kampmeier und J. C. Boothroyd (1994). "Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells." Infect Immun **62**(1): 203-209.
- Klaren, V. N. und R. Peek (2001). "Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis." J Immunol **167**(11): 6263-6269.
- Klun, I., O. Djurkovic-Djakovic und P. Thulliez (2007). "Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally exposed sheep." Zoonoses Public Health **54**(3-4): 165-168.

- Kniel, K. E., D. S. Lindsay, S. S. Sumner, C. R. Hackney, M. D. Pierson und J. P. Dubey (2002). "Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries." J Parasitol **88**(4): 790-793.
- Kong, J. T., M. E. Grigg, L. Uyetake, S. Parmley und J. C. Boothroyd (2003). "Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides." J Infect Dis **187**(9): 1484-1495.
- Kotresha, D. und R. Noordin (2010). "Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis." Apmis **118**(8): 529-542.
- Kotresha, D., D. Poonam, Y. Muhammad Hafiznur, G. Saadatnia, O. Nurulhasanah, O. Sabariah, S. Y. Tan, A. K. Izzati Zahidah und N. Rahmah (2012). "Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis." Trop Biomed **29**(1): 129-137.
- Krausse, T., W. Straube, S. Wiersbitzky, V. Hitz und A. Kewitsch (1993). "[Screening for toxoplasmosis in pregnancy--a pilot program in Northeast Germany]." Geburtshilfe Frauenheilkd **53**(9): 613-618.
- Kulkarni-Kale, U., S. Bhosle und A. S. Kolaskar (2005). "CEP: a conformational epitope prediction server." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W168-171.
- Kyte, J. und R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-132.
- Lang, C., U. Groß und C. G. Lüder (2007). "Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*." Parasitol Res **100**(2): 191-203.
- Larsen, J. E., O. Lund und M. Nielsen (2006). "Improved method for predicting linear B-cell epitopes." Immunome Res **2**: 2.
- Lass, A., H. Pietkiewicz, B. Szostakowska und P. Myjak (2012). "The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental fruits and vegetables samples." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(6): 1101-1108.
- Lecordier, L., M. P. Fourmaux, C. Mercier, E. Dehecq, E. Masy und M. F. Cesbron-Delauw (2000). "Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies." Clin Diagn Lab Immunol **7**(4): 607-611.
- Lehmann, T., C. R. Blackston, S. F. Parmley, J. S. Remington und J. P. Dubey (2000). "Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes." J Parasitol **86**(5): 960-971.
- Lekutis, C., D. J. Ferguson, M. E. Grigg, M. Camps und J. C. Boothroyd (2001). "Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme." Int J Parasitol **31**(12): 1285-1292.
- Levitt, M. (1976). "A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding." J Mol Biol **104**(1): 59-107.
- Liang, L., M. Doskaya, S. Juarez, A. Caner, A. Jasinskas, X. Tan, B. E. Hajagos, P. J. Bradley, M. Korkmaz, Y. Guruz, P. Felgner und D. H. Davies (2011). "Identification of potential serodiagnostic and subunit vaccine antigens by antibody profiling of toxoplasmosis cases in Turkey." Mol Cell Proteomics **10**(7): M110.006916.

- List, C., W. Qi, E. Maag, B. Gottstein, N. Muller und I. Felger (2010). "Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray." PLoS Negl Trop Dis **4**(8): e771.
- Lorenz, P., M. Kreuzer, J. Zerweck, M. Schutkowski und H. J. Thiesen (2009). "Probing the epitope signatures of IgG antibodies in human serum from patients with autoimmune disease." Methods Mol Biol **524**: 247-258.
- Lunde, M. N. und L. Jacobs (1983). "Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **69**(5): 806-808.
- MacBeath, G. und S. L. Schreiber (2000). "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination." Science **289**(5485): 1760-1763.
- Maksimov, P., S. Buschtöns, D. C. Herrmann, F. J. Conraths, K. Görlich, A. M. Tenter, J. P. Dubey, U. Nagel-Kohl, B. Thoms, L. Botcher, M. Kuhne und G. Schares (2011). "Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany." Vet Parasitol **182**(2-4): 140-149.
- Maksimov, P., J. Zerweck, A. Maksimov, A. Hotop, U. Gross, U. Pleyer, K. Spekker, W. Daubener, S. Werdermann, O. Niederstrasser, E. Petri, M. Mertens, R. G. Ulrich, F. J. Conraths und G. Schares (2012). "Peptide microarray analysis of *in silico*-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans." Clin Vaccine Immunol **19**(6): 865-874.
- Maksimov, P., J. Zerweck, A. Maksimov, A. Hotop, U. Groß, K. Spekker, W. Daubener, S. Werdermann, O. Niederstrasser, E. Petri, M. Mertens, R. G. Ulrich, F. J. Conraths und G. Schares (2012). "Analysis of clonal type-specific antibody reactions in *Toxoplasma gondii* seropositive humans from Germany by peptide-microarray." PLoS One **7**(3): e34212.
- Maksimov, P., J. Zerweck, A. Maksimov, A. Hotop, U. Gross, K. Spekker, W. Daubener, S. Werdermann, O. Niederstrasser, E. Petri, M. Mertens, R. G. Ulrich, F. J. Conraths und G. Schares (2012). "Analysis of Clonal Type-Specific Antibody Reactions in *Toxoplasma gondii* Seropositive Humans from Germany by Peptide-Microarray." PloS one **7**(3): e34212.
- McLeod, R., K. M. Boyer, D. Lee, E. Mui, K. Wroblewski, T. Karrison, A. G. Noble, S. Withers, C. N. Swisher, P. T. Heydemann, M. Sautter, J. Babiarz, P. Rabiah, P. Meier, M. E. Grigg und G. Toxoplasmosis Study (2012). "Prematurity and severity are associated with *Toxoplasma gondii* alleles (NCCCTS, 1981-2009)." Clin Infect Dis **54**(11): 1595-1605.
- Melnyk, O., X. Duburcq, C. Olivier, F. Urbes, C. Auriault und H. Gras-Masse (2002). "Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays." Bioconjug Chem **13**(4): 713-720.
- Melssen, W., R. Wehrens und L. Buydens (2006). "Supervised Kohonen networks for classification problems." Chemometr Intell Lab **83**(2): 99-113.
- Mercier, A., S. Devillard, B. Ngoubangoye, H. Bonnabau, A. L. Banuls, P. Durand, B. Salle, D. Ajzenberg und M. L. Dardé (2010). "Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e876.
- Mercier, C., J. F. Dubremetz, B. Rauscher, L. Lecordier, L. D. Sibley und M. F. Cesbron-Delauw (2002). "Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma*

parasitophorous vacuole induced by parasite proteins." Mol Biol Cell **13**(7): 2397-2409.

Meyer, D., A. Zeileis und K. Hornik (2006). "The strucplot framework: visualizing multi-way contingency tables with VCD." J Stat Softw **17**(3).

Mezzasoma, L., T. Bacarese-Hamilton, M. Di Cristina, R. Rossi, F. Bistoni und A. Crisanti (2002). "Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases." Clin Chem **48**(1): 121-130.

Miller, C. M., N. R. Boulter, R. J. Ikin und N. C. Smith (2009). "The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **39**(1): 23-39.

Montoya, A., G. Miro, M. Mateo, C. Ramirez und I. Fuentes (2009). "Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR)." Vet Parasitol **160**(1-2): 159-162.

Montoya, J. G. und O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-1976.

Montoya, J. G. und J. S. Remington (1996). "Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis." Clin Infect Dis **23**(2): 277-282.

Montoya, J. G. und J. S. Remington (2008). "Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy." Clin Infect Dis **47**(4): 554-566.

Morisset, S., F. Peyron, J. R. Lobry, J. Garweg, J. Ferrandiz, K. Musset, J. E. Gomez-Marin, A. de la Torre, M. Demar, B. Carne, C. Mercier, J. F. Garin und M. F. Cesbron-Delauw (2008). "Serotyping of *Toxoplasma gondii*: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America." Microbes Infect **10**(7): 742-747.

Morrisette, N. S. und L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 21-38; table of contents.

Nahtman, T., A. Jernberg, S. Mahdavifar, J. Zerweck, M. Schutkowski, M. Maeurer und M. Reilly (2007). "Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data." J Immunol Methods **328**(1-2): 1-13.

Ngo, H. M., H. C. Hoppe und K. A. Joiner (2000). "Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion." Trends Cell Biol **10**(2): 67-72.

Ngo, Y., R. Advani, D. Valentini, S. Gaseitsiwe, S. Mahdavifar, M. Maeurer und M. Reilly (2009). "Identification and testing of control peptides for antigen microarrays." J Immunol Methods **343**(2): 68-78.

Nguyen, T. D., G. Bigaignon, J. Vanbroeck, M. Vercammen, T. N. Nguyen, M. Delmee, M. Turneer, S. F. Wolf und J. P. Coutelier (1998). "Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses." Infect Immun **66**: 2991-2995.

Nicolle, C. und L. Manceaux (1908). "Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi." C R Seances Acad Sci **147**: 763-766.

Nowakowska, D., I. Colon, J. S. Remington, M. Grigg, E. Golab, J. Wilczynski und L. D. Sibley (2006). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis." J Clin Microbiol **44**(4): 1382-1389.

- Oldenhove, G., N. Bouladoux, E. A. Wohlfert, J. A. Hall, D. Chou, L. Dos Santos, S. O'Brien, R. Blank, E. Lamb, S. Natarajan, R. Kastenmayer, C. Hunter, M. E. Grigg und Y. Belkaid (2009). "Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection." Immunity **31**(5): 772-786.
- Opsteegh, M., R. Haveman, A. N. Swart, M. E. Mensink-Beerepoot, A. Hofhuis, M. F. Langelaar und J. W. van der Giessen (2012). "Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands." Prev Vet Med **104**(3-4): 317-326.
- Opsteegh, M., P. Teunis, M. Mensink, L. Zuchner, A. Titilincu, M. Langelaar und G. J. van der (2010). "Evaluation of ELISA test characteristics and estimation of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch sheep using mixture models." Prev Vet Med **96**(3-4): 232-240.
- Ozkan, A. T., B. Celebi, C. Babur, A. Lucio-Forster, D. D. Bowman und D. S. Lindsay (2008). "Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cats of the Ankara region of Turkey Using the Sabin-Feldman dye test and an indirect fluorescent antibody test." J Parasitol **94**(4): 817-820.
- Pamelard, F., G. Even, C. Apostol, C. Preda, C. Dhaenens, V. Fafeur, R. Desmet und O. Melnyk (2009). "PASE: a web-based platform for peptide/protein microarray experiments." Methods Mol Biol **570**: 413-430.
- Panicker, R. C., X. Huang und S. Q. Yao (2004). "Recent advances in peptide-based microarray technologies." Comb Chem High Throughput Screen **7**(6): 547-556.
- Parker, J. M., D. Guo und R. S. Hodges (1986). "New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites." Biochemistry **25**(19): 5425-5432.
- Parmley, S. F., U. Groß, A. Sucharczuk, T. Windeck, G. D. Sgarlato und J. S. Remington (1994). "2 Alleles of the Gene Encoding Surface-Antigen P22 in 25 Strains of *Toxoplasma-Gondii*." J Parasitol **80**(2): 293-301.
- Parmley, S. F., U. Groß, A. Sucharczuk, T. Windeck, G. D. Sgarlato und J. S. Remington (1994). "Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **80**(2): 293-301.
- Parmley, S. F., U. Gross, A. Sucharczuk, T. Windeck, G. D. Sgarlato und J. S. Remington (1994). "Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **80**(2): 293-301.
- Pasare, C. und R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-1036.
- Pellois, J. P., X. Zhou, O. Srivannavit, T. Zhou, E. Gulari und X. Gao (2002). "Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips." Nat Biotechnol **20**(9): 922-926.
- Pena, H. F., S. M. Gennari, J. P. Dubey und C. Su (2008). "Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil." Int J Parasitol **38**(5): 561-569.
- Peyron, F., J. R. Lobry, K. Musset, J. Ferrandiz, J. E. Gomez-Marin, E. Petersen, V. Meroni, B. Rausher, C. Mercier, S. Picot und M. F. Cesbron-Delauw (2006). "Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women:

predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America)." Microbes Infect **8**(9-10): 2333-2340.

Pfreppe, K. I., G. Enders, M. Gohl, D. Krczal, H. Hlobil, D. Wassenberg und E. Soutschek (2005). "Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis." Clin Diagn Lab Immunol **12**(8): 977-982.

Plattner, F., F. Yarovinsky, S. Romero, D. Didry, M. F. Carlier, A. Sher und D. Soldati-Favre (2008). "*Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response." Cell Host Microbe **3**(2): 77-87.

Ponomarenko, J., H. H. Bui, W. Li, N. Fusseder, P. E. Bourne, A. Sette und B. Peters (2008). "ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes." BMC bioinformatics **9**: 514.

Radke, J. R., M. J. Gubbels, M. E. Jerome, J. B. Radke, B. Striepen und M. W. White (2004). "Identification of a sporozoite-specific member of the *Toxoplasma* SAG superfamily via genetic complementation." Mol Microbiol **52**(1): 93-105.

Raffi, F., J. Franck, H. Pelloux, F. Derouin, V. Reliquet, P. Ambroise-Thomas, J. P. Aboulker, C. Leport und H. Dumon (1999). "Specific anti-toxoplasmic IgG antibody immunoblot profiles in patients with AIDS-associated *Toxoplasma* encephalitis." Diagn Microbiol Infec Dis **34**(1): 51-56.

Rajendran, C., C. Su und J. P. Dubey (2012). "Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations." Infect Genet Evol **12**(2): 359-368.

Rapberger, R., A. Lukas und B. Mayer (2007). "Identification of discontinuous antigenic determinants on proteins based on shape complementarities." J Mol Recognit **20**(2): 113-121.

Redlich, A. und W. A. Müller (1998). "Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay." Parasitol Res **84**(9): 700-706.

Reineke, U. und M. Schutkowski (2009). Epitope mapping protocols, Humana Press.

Reineke, U., R. Volkmer-Engert und J. Schneider-Mergener (2001). "Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology." Curr Opin Biotechnol **12**(1): 59-64.

Renold, C., A. Sugar, J. P. Chave, L. Perrin, J. Delavelle, G. Pizzolato, P. Burkhard, V. Gabriel und B. Hirschel (1992). "*Toxoplasma* encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome." Medicine (Baltimore) **71**(4): 224-239.

Rodrigues, I. M., A. M. Castro, M. B. Gomes, W. N. Amaral und M. M. Avelino (2009). "Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(3): 434-440.

Roggen, E. L. (2006). "Recent developments with B-cell epitope identification for predictive studies." J Immunotoxicol **3**(3): 137-149.

Roos, T., J. Martius, U. Groß und L. Schrod (1993). "Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy." Obstet Gynecol **81**(2): 243-250.

- Saathoff, M., I. Reiter-Owona und H. M. Seitz (1999). "Fünzig Jahre Sabin-Feldman-Test: Anmerkungen zur Spezifität des "Gold Standard"." J Lab Med **23**(9): 494-497.
- Sabin, A. B. und P. K. Olitsky (1937). "*Toxoplasma* and Obligate Intracellular Parasitism." Science **85**(2205): 336-338.
- Sacks, J. J., R. R. Roberto und N. F. Brooks (1982). "Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk." JAMA **248**(14): 1728-1732.
- Saeij, J. P., G. Arrizabalaga und J. C. Boothroyd (2008). "A cluster of four surface antigen genes specifically expressed in bradyzoites, SAG2CDXY, plays an important role in *Toxoplasma gondii* persistence." Infect Immun.
- Sager, H., M. Gloor, C. Björkman, S. Kritznier und B. Gottstein (2003). "Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA." Vet Parasitol **112**: 1-10.
- Saha, S. und G. P. Raghava (2006). "Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network." Proteins **65**(1): 40-48.
- Saha, S. und G. P. Raghava (2007). "Prediction methods for B-cell epitopes." Methods Mol Biol **409**: 387-394.
- Saha, S. und G. P. S. Raghava (2006). "Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network." Proteins **65**(1): 40-48.
- Schares, G., N. Pantchev, D. Barutzki, A. O. Heydorn, C. Bauer und F. J. Conraths (2005). "Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany." Int J Parasitol **35**(14): 1525-1537.
- Schares, G., M. Peters, R. Wurm, A. Barwald und F. J. Conraths (1998). "The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques." Vet Parasitol **80**(2): 87-98.
- Schares, G., M. G. Vrhovec, N. Pantchev, D. C. Herrmann und F. J. Conraths (2008). "Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries." Vet Parasitol **152**(1-2): 34-45.
- Schutkowski, M., U. Reineke und U. Reimer (2005). "Peptide arrays for kinase profiling." Chembiochem **6**(3): 513-521.
- Sensini, A. (2006). "*Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis." Clin Microbiol Infect **12**(6): 504-512.
- Sheets, C. W., D. S. Grewal und D. S. Greenfield (2009). "Ocular toxoplasmosis presenting with focal retinal nerve fiber atrophy simulating glaucoma." J Glaucoma **18**(2): 129-131.
- Shen, G., D. Behera, M. Bhalla, A. Nadas und S. Laal (2009). "Peptide-based antibody detection for tuberculosis diagnosis." Clin Vaccine Immunol **16**(1): 49-54.
- Sibley, L. D. und J. C. Boothroyd (1992). "Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage." Nature **359**(6390): 82-85.
- Skinner, L. J., J. M. Chatterton, A. W. Joss, I. L. Moir und D. O. Ho-Yen (1989). "The use of an IgM immunosorbent agglutination assay to diagnose congenital toxoplasmosis." J Med Microbiol **28**(2): 125-128.

- Sollner, J. und B. Mayer (2006). "Machine learning approaches for prediction of linear B-cell epitopes on proteins." J Mol Recognit **19**(3): 200-208.
- Sousa, S., D. Ajzenberg, M. Marle, D. Aubert, I. Villena, J. C. da Costa und M. L. Dardé (2009). "Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping." Clin Vaccine Immunol **16**(8): 1158-1169.
- Sousa, S., D. Ajzenberg, M. Vilanova, J. Costa und M. L. Dardé (2008). "Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents." Clin Vaccine Immunol **15**(9): 1380-1386.
- Sousa, S., N. Canada, J. M. Correia da Costa und M. L. Dardé (2010). "Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals." Vet Parasitol **169**(1-2): 24-28.
- Speer, C. A., S. Clark und J. P. Dubey (1998). "Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **84**(3): 505-512.
- Spycher, A., C. Geigy, J. Howard, H. Posthaus, K. Gendron, B. Gottstein, K. Debache, D. C. Herrmann, G. Schares und C. F. Frey (2011). "Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* causing fatal systemic toxoplasmosis in an immunocompetent 10-year-old cat." J Vet Diagn Invest **23**(1): 104-108.
- Stiles, C. W. (1891). "Note preliminaire sur quelques parasites." Bulletin de la Societe zoologique de France **16**: 163-166.
- Su, C., D. Evans, R. H. Cole, J. C. Kissinger, J. W. Ajioka und L. D. Sibley (2003). "Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission." Science **299**(5605): 414-416.
- Su, C., A. Khan, P. Zhou, D. Majumdar, D. Ajzenberg, M. L. Dardé, X. Q. Zhu, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, J. P. Dubey und L. D. Sibley (2012). "Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(15): 5844-5849.
- Su, C., X. Zhang und J. P. Dubey (2006). "Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites." Int J Parasitol **36**(7): 841-848.
- Suzuki, Y. (2002). "Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*." J Infect Dis **185 Suppl 1**: S58-65.
- Sweredoski, M. J. und P. Baldi (2009). "COBEpro: a novel system for predicting continuous B-cell epitopes." Protein Eng Des Sel **22**(3): 113-120.
- Switaj, K., A. Master, P. K. Borkowski, M. Skrzypczak, J. Wojciechowicz und P. Zaborowski (2006). "Association of ocular toxoplasmosis with type I *Toxoplasma gondii* strains: direct genotyping from peripheral blood samples." J Clin Microbiol **44**(11): 4262-4264.
- Tang, Q., J. Y. Adams, C. Penaranda, K. Melli, E. Piaggio, E. Sgouroudis, C. A. Piccirillo, B. L. Salomon und J. A. Bluestone (2008). "Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction." Immunity **28**(5): 687-697.

- Tapia, V., J. Bongartz, M. Schutkowski, N. Bruni, A. Weiser, B. Ay, R. Volkmer und M. Or-Guil (2007). "Affinity profiling using the peptide microarray technology: a case study." Anal Biochem **363**(1): 108-118.
- Tenter, A. M., A. R. Heckeroth und L. M. Weiss (2000). "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans." Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-1258.
- Toronen, P., M. Kolehmainen, G. Wong und E. Castren (1999). "Analysis of gene expression data using self-organizing maps." FEBS Lett **451**(2): 142-146.
- Vallochi, A. L., C. Muccioli, M. C. Martins, C. Silveira, R. Belfort, Jr. und L. V. Rizzo (2005). "The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil." Am J Ophthalmol **139**(2): 350-351.
- Van Regenmortel, M. H. (2009). "What is a B-cell epitope?" Methods Mol Biol **524**: 3-20.
- Vasconcelos-Santos, D. V., E. M. Dodds und F. Orefice (2011). "Review for disease of the year: differential diagnosis of ocular toxoplasmosis." Ocul Immunol Inflamm **19**(3): 171-179.
- Vaudaux, J. D., C. Muccioli, E. R. James, C. Silveira, S. L. Magargal, C. Jung, J. P. Dubey, J. L. Jones, M. Z. Doymaz, D. A. Bruckner, R. Belfort, Jr., G. N. Holland und M. E. Grigg (2010). "Identification of an atypical strain of *toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil." J Infect Dis **202**(8): 1226-1233.
- Vigil, A., R. Ortega, A. Jain, R. Nakajima-Sasaki, X. Tan, B. B. Chomel, R. W. Kasten, J. E. Koehler und P. L. Felgner (2010). "Identification of the feline humoral immune response to *Bartonella henselae* infection by protein microarray." PloS one **5**(7): e11447.
- Villard, O., D. Filisetti, F. Roch-Deries, J. Garweg, J. Flament und E. Candolfi (2003). "Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis." J Clin Microbiol **41**(8): 3537-3541.
- Vollaire, M. R., S. V. Radecki und M. R. Lappin (2005). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States." Am J Vet Res **66**(5): 874-877.
- Walter, G. (1986). "Production and use of antibodies against synthetic peptides." J Immunol Methods **88**(2): 149-161.
- Walzer, K. A. und J. P. Boyle (2012). "A single chromosome unexpectedly links highly divergent isolates of *Toxoplasma gondii*." mBio **3**(1).
- Wang, J., J. Delabie, H. Aasheim, E. Smeland und O. Myklebost (2002). "Clustering of the SOM easily reveals distinct gene expression patterns: results of a reanalysis of lymphoma study." BMC Bioinformatics **3**: 36.
- Wastling, J. M., D. Harkins und D. Buxton (1994). "Western blot analysis of the IgG response of sheep vaccinated with S48 *Toxoplasma gondii* (Toxovax)." Research in Veterinary Science **57**(3): 384-386.
- Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T. Y. Roh, W. T. Watford, D. E. Schones, W. Peng, H. W. Sun, W. E. Paul, J. J. O'Shea und K. Zhao (2009). "Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and

- plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells." Immunity **30**(1): 155-167.
- Weilhammer, D. R. und A. Rasley (2011). "Genetic approaches for understanding virulence in *Toxoplasma gondii*." Brief Funct Genomics **10**(6): 365-373.
- Weiss, L. M. und J. P. Dubey (2009). "Toxoplasmosis: A history of clinical observations." Int J Parasitol **39**(8): 895-901.
- Weiss, L. M. und K. Kim (2000). "The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*." Front Biosci **5**: D391-405.
- Wenyon, C. M. (1926). Isospora in cats and dogs. Protozoology : A manual for medical men, veterinarians and zoologists C. M. Wenyon. London, Baillière, Tindall and Cox: 808-819.
- Woldemichael, T., A. L. Fontanet, T. Sahlu, H. Gilis, T. Messele, T. F. R. Dewit, H. Yeneneh, R. A. Coutinho und T. Vangool (1998). "Evaluation of the Eiken latex agglutination test for anti- *Toxoplasma* antibodies and seroprevalence of *Toxoplasma* infection among factory workers in Addis Ababa, Ethiopia." Trans R Soc Trop Med Hyg **92**(4): 401-403.
- Wolf, A., D. Cowen und B. Paige (1939). "Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals." Science **89**(2306): 226-227.
- Xiao, J., S. L. Buka, T. D. Cannon, Y. Suzuki, R. P. Viscidi, E. F. Torrey und R. H. Yolken (2009). "Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring." Microbes Infect **11**(13): 1011-1018.
- Yamamoto, Y. I., J. R. Mineo, C. S. Meneghisse, A. C. S. Guimaraes und M. Kawarabayashi (1998). "Detection in human sera of IgG, IgM and IgA to excreted/secreted antigens from *Toxoplasma gondii* by use of dot-ELISA and immunoblot assay." Ann Trop Med Parasitol **92**(1): 23-30.
- Yan, C., D. Dobbs und V. Honavar (2004). "A two-stage classifier for identification of protein-protein interface residues." Bioinformatics **20 Suppl 1**: i371-378.
- Zhang, Y. W., S. K. Halonen, Y. F. Ma, M. Wittner und L. M. Weiss (2001). "Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein." Infect Immun **69**(1): 501-507.

10 Publikationsliste

1. Tzanidakis N, Maksimov P, Conraths FJ, Kiossis E, Brozos C, Sotiraki S, Schares G. *Toxoplasma gondii* in sheep and goats: seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices. *Vet Parasitol.* 2012 Dec 21;190(3-4):340-8.
2. Schares G, Langenmayer MC, Scharr JC, Minke L, Maksimov P, Maksimov A, Schares S, Bärwald A, Basso W, Dubey JP, Conraths FJ, Gollnick NS. Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *Int J Parasitol.* 2012 Nov 15.
3. Pardini L, Maksimov P, Herrmann DC, Bacigalupe D, Rambeaud M, Machuca M, Moré G, Basso W, Schares G, Venturini MC. Evaluation of an in-house TgSAG1 (P30) IgG ELISA for diagnosis of naturally acquired *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Vet Parasitol.* 2012 Oct 26;189(2-4):204-10.
4. Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Gross U, Pleyer U, Spekker K, Däubener W, Werdermann S, Niederstrasser O, Petri E, Mertens M, Ulrich RG, Conraths FJ, Schares G. Peptide microarray analysis of *in silico*-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Jun;19(6):865-74.
5. Maksimov P, Zerweck J, Maksimov A, Hotop A, Gross U, Spekker K, Däubener W, Werdermann S, Niederstrasser O, Petri E, Mertens M, Ulrich RG, Conraths FJ, Schares G. Analysis of clonal type-specific antibody reactions in *Toxoplasma gondii* seropositive humans from Germany by peptide-microarray. *PLoS One.* 2012;7(3):e34212.
6. Herrmann DC, Maksimov P, Maksimov A, Sutor A, Schwarz S, Jaschke W, Schliephake A, Denzin N, Conraths FJ, Schares G. *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: Seroprevalence and genotypes. *Vet Parasitol.* 2012 Apr 30;185(2-4):78-85.
7. Moré G, Maksimov P, Pardini L, Herrmann DC, Bacigalupe D, Maksimov A, Basso W, Conraths FJ, Schares G, Venturini MC. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. *Vet Parasitol.* 2012 Mar 23;184(2-4):116-21.
8. Maksimov P, Buschtöns S, Herrmann DC, Conraths FJ, Görlich K, Tenter AM, Dubey JP, Nagel-Kohl U, Thoms B, Bötcher L, Kühne M, Schares G. Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* in domestic ducks and geese in Lower Saxony, Germany. *Vet Parasitol.* 2011 Dec 15;182(2-4):140-9.
9. Azevedo SS, Pena HF, Alves CJ, Guimarães Filho AA, Oliveira RM, Maksimov P, Schares G, Gennari SM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010 Apr-Jun;19(2):80-4.

10. Basso W, Moré G, Quiroga MA, Pardini L, Bacigalupe D, Venturini L, Valenzuela MC, Balducchi D, Maksimov P, Schares G, Venturini MC. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. Vet Parasitol. 2009 May 12;161(3-4):201-6. Epub 2009 Jan 20.

11 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Franz J. Conraths möchte ich herzlich für seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft, für viel Geduld und Sorgfalt beim Korrekturlesen der Publikationen sowie der Dissertation und die sehr gute Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit danken.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Gereon Schares für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen, sowie für seine stetige Unterstützung, für viel investierte Zeit, hilfreiche Diskussionen, Hilfestellung bei der Auswertung, der schriftlichen Zusammenstellung und der Korrektur der Arbeit und eine ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Arbeit.

Besonderer Dank gilt der JPT Peptide Technologies GmbH, allen voran Johannes Zerweck, Prof. Mike Schutkowski, Dr. Ulf Reimer, Robert Carus für die unermessliche Unterstützung bei der Herstellung, Durchführung und Auswertung der Peptidmikroarrays.

Dem Verbundprojekt Toxonet01/02, insbesondere den Arbeitsgruppen um Prof. Uwe Groß und Prof. Walter Däubener danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung der Katzenreferenzseren möchte ich mich bei Dr. J. P. Dubey bedanken, da ohne seine Unterstützung eine Durchführung der Teilstudie dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die Finanzierung der Studien dieser Dissertation möchte ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanken (BMBF-Förderkennziffern 01KI 0765, 01KI 1002 F).

Herrn Dr. Andreas Fröhlich und Dr. Mario Ziller möchte ich sehr für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge zum Lösen der mathematischen Unklarheiten bei der Auswertung von Peptidmikroarray-Daten danken.

Herrn Dr. Daland Herrmann möchte ich für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Ratschläge, sowie für seine Geduld beim Korrekturlesen der englischsprachigen Texte danken.

Frau Jana Sonnenburg, Herrn Dr. Mario Ziller und Herrn Dr. Dirk Höper möchte ich für die Unterstützung bei der Arbeit mit der Programmiersprache R danken.

Meinem Freund und Kollegen Dr. Walter Basso möchte ich für seine Freundschaft, stete Motivation, endlosen Gesprächen und die gründliche Einarbeitung in Labortechniken herzlich Danke sagen.

Besonderer Dank gilt außerdem dem technischen Personal am Institut für Epidemiologie, für Ratschläge, die stetige Bereitschaft Ideen in die Praxis umzusetzen und für eine nette Arbeitsatmosphäre. Besonders hervorzuheben sind Andrea Bärwald, Lilo Minke, Susann Schares und Martina Steffen.

An dieser Stelle möchte mich bei meiner Frau Aline für die tatkräftige Unterstützung im Labor, sowie im Alltag für ihr endloses Verständnis für meine langen Aufenthalte im Institut, ihre moralische Unterstützung, aufmunternde Worte, und ihre Liebe bedanken.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen danken, dass sie mir ein Tiermedizinstudium in der Ukraine ermöglicht haben, sowie für die Motivation und finanzielle Unterstützung beim Erlernen der deutschen Sprache. Meiner Mutter möchte ich ganz besonders für ihr endloses Vertrauen, ihre Liebe und ihr Verständnis danken, die mir bei meinem Weg durch das Leben die größte Hilfe waren.

Abschließend möchte ich allen herzlichst danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

12 Eigenständigkeitserklärung:

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 04.02.2013

Pavlo Maksimov