



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**PATRICIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS**

**ESTUDOS DE CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**  
**NA TOXOPLASMOSE AGUDA EM OVINOS E ASPECTOS**  
**EPIDEMIOLÓGICOS**

Salvador, BA

2013

**PATRICIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS**

**ESTUDOS DE CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA  
NA TOXOPLASMOSE AGUDA EM OVINOS E ASPECTOS  
EPIDEMIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da  
Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Dias Costa

Co-orientador: Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Salvador, BA

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

S237 Santos, Patrícia Oliveira Meira  
Estudos de cinética da resposta imunológica na  
toxoplasmose aguda em ovinos e aspectos epidemiológicos /  
Patrícia Oliveira Meira Santos. – Salvador, 2013.  
91 f.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Dias Costa  
Co-orientador: Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Imunologia. 2. Epidemiologia. 3. Ovinos. I. Costa, Maria  
de Fátima Dias. II. Portela, Ricardo Wagner Dias. III.  
Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 577.27

## AGRADECIMENTOS

Queria agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, que trilharam ou cruzaram meu caminho em uma, poucas ou muitas oportunidades... Pessoas que apareceram uma única vez, mas aparentemente foram enviadas por uma força maior. E que com uma palavra, ou uma gesto, transformaram minha visão de um problema, de vida e de mundo!

### Aos Professores Maria de Fátima Dias Costa e Ricardo Wagner Dias Portela

Pela orientação recebida em todos momentos, dentro e fora da bancada. Pelos ensinamentos e conselhos que servirão de guia na minha carreira acadêmica. E, ao Professor Ricardo, pela confiança em minhas atitudes e deduções, além da amizade cultivada e já enraizada que muito me alegra e, sem dúvida, me transformou numa pessoa melhor.

### Ao Professor Roberto José Meyer Nascimento

Por toda ajuda e tempo oferecido. Pelo acolhimento nos momentos de dúvidas experimentais e não experimentais. Cuja postura e dedicação são exemplos a serem seguidos.

### Aos Laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular (Labimuno-ICS-UFBA), Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIm)

O presente trabalho é fruto de todo apoio e ajuda que recebi nesses três ambientes. A tranquilidade e energia presentes foram fatores positivos para todas etapas do trabalho desenvolvido. Muito obrigada Dilcéia.

### À Universidade Federal do Ceará – Campus Cariri, em especial ao Professor Claudio Gleidiston Lima da Silva, coordenador do Curso de Medicina

Agradeço pelo apoio nos diversos momentos de afastamento de minhas atividades docentes e administrativas. Sem a compreensão exata das árduas tarefa de realizar doutorado em outro estado, teria sido impossível participar de todas etapas experimentais e concretizar o presente trabalho.

### À Doutoranda Maria Tereza Barreto Guedes

Que participou de praticamente todas as etapas experimentais. Pela indispensável e constante presença na bancada. Pelos risos, gostos e desgostos vividos juntamente. E também pela amizade, iniciada junto com os experimentos e mantida até hoje.

### Aos colegas do grupo de trabalho e do programa de pós-graduação

Dan Loureiro, Bruno Lopes, Aretha Borges, Ludmilla Sena, Bianca Cardeal, Thiago Souza, Geraldo Pedral, José Tadeu, Ricardo Fraga. Todos foram companheiros, tornaram momentos simples em inesquecíveis, e estenderam a mão nas situações necessárias.

#### Aos alunos do curso médico

Roana Lacerda, Amanda Soeiro, Ciro Oliveira e Daniel Facundo, que viajaram muitos quilômetros para participar de algumas etapas experimentais. Pela energia contagiante e pelas demonstrações de confiança.

#### Aos funcionários do Labimuno e da fazenda experimental

Chica, Rafaela, Zilda, Luciane, Manuel, José e Mário: pela ajuda irrestrita e compreensão que a pressa e falta de tempo, que eu demonstrava algumas vezes, era reflexo do curto espaço de tempo que eu dispunha.

Ari, Chico e Bado: pela disponibilidade e disposição sempre presentes.

#### Aos amigos de sempre

Paloma Passos, Thaís Marques, Mayla Fernandes, Ely Cerqueira, Ana Cândida Prado, Henry Poncio, sempre com palavras positivas e conscientes que minha ausência era apenas física e momentânea.

Em especial ao François Cantalista, por ultrapassar as barreiras da amizade. Pelo estímulo, carinho e apoio nos muitos momentos de dificuldade.

#### À minha família, essencial e especial

Única em todos os sentidos. Onde sempre encontro suporte psicológico e sentimental. Que compreenderam minhas ausências nas datas festivas, mesmo estando eu em Salvador. Especialmente minha mãe Denise, exemplo que procuro seguir, luz do meu caminho, com uma força inspiradora frente a adversidades. E a meu sobrinho e afilhado Cauã, que tem hoje apenas 8 anos mas soube compreender, melhor que muitos adultos, minhas obrigações nesse momento da vida. Você dois são espíritos de muita luz que amo demais!

#### Aos animais

Se possível fosse realizar ciência sem sacrificar nenhuma vida animal, sem promover dor ou desconforto, sem sombra de dúvida eu a faria. Como essa não é a realidade atual, devo no mínimo agradecer aos animais. Respeito-os imensamente e lamento a necessidade de seu uso.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

## RESUMO

O protozoário *Toxoplasma gondii* tem os felídeos como seus hospedeiros definitivos e diversos outros animais como hospedeiros intermediários. Em ovinos e humanos, a toxoplasmose é responsável por abortamentos e doença neonatal quando a primoinfecção ocorre durante a gestação. Apesar da resposta imunológica desenvolvida pelos hospedeiros, o protozoário persiste no organismo parasitado, e a ingestão de carne ovina (crua ou mal cozida) contaminada constitui importante fonte de infecção humana. Recentemente, proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GlyC) têm sido apontadas como importantes na ativação da resposta imune inata e constituem grande parte das proteínas de superfície de taquizoítos de *T. gondii*, além de serem reconhecidas por soros humanos na fase aguda da toxoplasmose. O presente estudo objetivou estudar a cinética da resposta imunológica humoral e celular na fase aguda da infecção pelo *T. gondii* em ovinos, e após imunização com GlyC, e desenvolver teste sorológico baseado em GlyC. O ELISA para detecção de IgG anti-lisado antigênico (LA) e anti-GlyC apresentou 100% e 30% de sensibilidade, e 96% e 94% de especificidade, respectivamente. Os ovinos infectados produziram IgM anti-LA e GlyC, e IgG anti-GlyC ( $p < 0.05$ ); e os imunizados, IgM anti-LA e IgG anti-LA e GlyC ( $p < 0.05$ ). A imunização com GlyC induziu aumento de células CD8+ e redução de células expressando MHC de classe II na circulação 60 dias após a injeção. O ELISA baseado em GlyC apresenta alta especificidade. GlyC é imunogênico para a espécie ovina e deve ser melhor avaliado como ferramenta diagnóstica e profilática na referida espécie.

**Palavras chave:** *Toxoplasma gondii*. Glicoconjugados. Resposta Imune. Ovino.

## ABSTRACT

The protozoan *Toxoplasma gondii* has felids as definitive hosts and many other animals as intermediate hosts. In sheep and humans, toxoplasmosis is responsible for abortions and neonatal disease when the primary infection occurs during pregnancy. Despite the immune response developed by the host, the parasite persists in the parasitized organism, and the ingestion of sheep meat (raw or undercooked) contaminated is an important source of human infection. Recently, glycosylphosphatidylinositol (GlyC) linked proteins, which constitutes much of the surface proteins of *T. gondii* tachyzoites, have been identified as important in the activation of innate immune response, and are recognized by human sera in the acute phase of toxoplasmosis. The present study aimed to study the kinetics of the humoral and cellular immune response in the acute phase of *T. gondii* infection in sheep, and after immunization with GlyC, and to develop serological assay based on GlyC as antigens. ELISA for the detection of IgG anti-lysate antigen (LA) and anti-GlyC showed 100% and 30% of sensitivity, and specificity of 96% and 94%, respectively. The infected sheep produced IgM anti-LA and anti-GlyC, and IgG anti-GlyC ( $p < 0.05$ ); and the immunized sheep, IgM anti-LA and IgG anti-LA and anti-GlyC ( $p < 0.05$ ). Immunization with GlyC induced an increase in CD8 + cells and reduction of cells expressing MHC class II in the circulation 60 days after injection. The ELISA based on GlyC presented high specificity. GlyC is immunogenic for sheep and should be further evaluated as a diagnostic and prophylactic tool in this specie.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; Glycoconjugates; Immune Response; Sheep.

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito 01

- Figura 1.** Diagrama da curva ROC dos ensaios imunodiagnósticos para *T. gondii* obtido pelo SPSS v.12.0..... 35
- Figura 2.** Resultados individuais das amostras séricas de ovinos previamente testadas pelo ensaio de imunofluorescência, e testado por dois diferentes sistemas imunoenzimáticos, para identificação de IgG específica anti-*T. gondii*.....36

### Manuscrito 02

- Figura 1.** Mapa do Estado da Bahia e suas sub-regiões, conforme proposto pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.....45
- Figura 2.** Soroprevalência aparente e real da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida do Estado da Bahia, Brasil.....46
- Figura 3.** Níveis de soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida no Estado da Bahia, e sua relação com o manejo.....47
- Figura 4.** Níveis de soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida do Estado da Bahia e influência da idade.....48

### Manuscrito 03

- Figura 1.** Níveis de IgM específicos contra lisado antigênico e glicoconjugados derivados de *T. gondii*.....63
- Figura 2.** Níveis de IgG específicos contra lisado antigênico e glicoconjugados derivados de *T. gondii*.....64
- Figura 3.** Percentagem de células CD4+, CD8+, MHC de classe I+ e MHC de classe II+ no sangue periférico dos ovinos.....66

## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito 01

**Tabela 1.** Parâmetros do ensaio imunoenzimático baseado em lisado antigênico e glicoconjugados de taquizoítos de *T. gondii*, em amostras de soros previamente testadas no ensaio de referência.....33

**Tabela 2.** Tabela de contingência dois-por-dois com os resultados de ELISA-LA e ELISA-GlyC, e do teste de referência..... 34

### Manuscrito 03

**Tabela 1.** Percentagem de células CD4+, CD8+, MHC de classe I+ e MHC de classe II+ no sangue dos ovinos.....65

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>04</b>
2.1 A OVINOCULTURA BRASILEIRA .....	04
2.2 TOXOPLASMOSE .....	06
2.2.1 Agente etiológico .....	07
2.2.2 Patogênese em ovinos .....	09
2.2.3 Epidemiologia .....	10
2.2.4 Resposta imune e escape parasitário .....	11
2.2.5 Diagnóstico .....	14
2.2.6 Tratamento e profilaxia .....	16
2.3 GLICOCONJUGADOS .....	17
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	<b>20</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
5.1. MANUSCRITO 01: Proteínas GPI ancoradas de <i>T. gondii</i> conferem especificidade mas baixa sensibilidade na detecção de IgG específica de ovinos em ensaio de ELISA .....	22
5.1.1 Introdução .....	22
5.1.2 Materiais e Métodos .....	24
5.1.3 Resultados .....	27
5.1.4 Discussão .....	28
5.1.5 Conclusões .....	32

5.2	MANUSCRITO 02: Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos de raça definida do Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e zootécnicos .....	37
5.2.1	Introdução .....	37
5.2.2	Materiais e Métodos .....	39
5.2.3	Resultados .....	40
5.2.4	Discussão .....	41
5.2.5	Conclusões .....	44
5.3	MANUSCRITO 03: Cinética da resposta imunológica aguda em ovinos após infecção experimental ou imunização com glicoconjugados derivados de <i>T. gondii</i> .....	49
5.3.1	Introdução .....	49
5.3.2	Materiais e Métodos .....	51
5.3.3	Resultados .....	55
5.3.4	Discussão .....	57
5.3.5	Conclusões .....	61
6.	<b>CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	<b>67</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>
8.	<b>ANEXOS</b> .....	<b>90</b>
	ANEXO A: Submissão à Veterinary Parasitology .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

O filo Apicomplexa compreende parasitos intracelulares obrigatórios que podem invadir e crescer no interior das células do hospedeiro (QUEIROZ, 1998). O *Toxoplasma gondii* é um membro deste filo, apresentando importância médica e médica-veterinária por induzir abortamentos, natimortos e neonatos fracos e infectados. O referido protozoário é importante causa de abortamento em ovinos e caprinos em muitos países, especialmente na Nova Zelândia, Reino Unido e Noruega (HARTLEY & MARSHALL, 1957; WALDELAND, 1976; DUBEY & BEATTIE, 1988; DUBEY & WELCOME, 1988; DUBEY et al., 1990; DUMÈTRE et al., 2006).

A primeira identificação do agente etiológico da toxoplasmose ocorreu simultaneamente em um roedor na Tunísia e um coelho no Brasil (NICOLE & MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). O *T. gondii* pode infectar diversas espécies de animais de sangue quente, incluindo humanos e ovinos (DUBEY & BEATTIE, 1988; WALTNER-TOEWS et al., 1991; ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). Quanto às formas parasitárias com capacidade de multiplicação, o parasito apresenta os taquizoítos e bradizoítos, cuja divisão é rápida e lenta, respectivamente (FRENKEL, 1973). Cistos teciduais, contendo bradizoítos, são resistentes a enzimas digestivas, constituindo fonte de infecção para carnívoros (JACOBS et al., 1960a,b).

Hospedeiros intermediários podem se infectar de forma congênita, pela ingestão de oocistos fecais maduros ou de carne contaminada com cistos teciduais (WOLF et al., 1939; HUTCHISON, 1965; De MOURA et al., 2006). Os oocistos são produzidos após o desenvolvimento do estágio sexuado do protozoário no intestino delgado dos hospedeiros definitivos felinos, em especial gatos domésticos (DUBEY et al., 1970a,b), os quais podem eliminar milhões de oocistos após a infecção, constituindo importante fonte de contaminação ambiental (DUBEY, 2001).

Os primeiros relatos de acometimento reprodutivo em ovinos ocorreram na década de 50, com a identificação do protozoário em tecidos placentários procedentes de abortamento e em tecidos fetais (HARTLEY et al., 1954; HARTLEY & MARSHALL, 1957). Abortamentos em ovelhas, causados por *T. gondii*, são relatados mundialmente, com grande impacto econômico. No Reino Unido, o protozoário é um dos três principais agentes indutores de abortamento em ovelhas, responsável por 1 a 2% de perda neonatal por ano, o que equivale a mais de 500 mil

borregos (BLEWETT & TREES, 1987; FREYRE et al., 1999; MASALA et al., 2007; [www.defra.gov.uk/vla/reports](http://www.defra.gov.uk/vla/reports)). No Uruguai, Freyre et al. (1999) estimaram entre 14.000 e 40.000 o número de fetos de ovinos que foram abortados devido à infecção com *T. gondii*, com perda anual podendo ultrapassar 4.5 milhões de dólares.

Os ovinos podem se infectar de forma vertical ou horizontal (DUNCANSON et al., 2001; KATZER et al., 2011). Após ingestão, há liberação dos esporozoítos que invadem e se multiplicam no epitélio intestinal, transformando-se em taquizoítos (DUBEY, 1984). A disseminação para diversos tecidos ocorre e, estando a ovelha gestante, os parasitos invadem e se multiplicam no septo caruncular materno e atingem as células trofoblásticas fetais (BUXTON & FINLAYSON, 1986). A severidade da doença está na dependência do estágio gestacional no momento da infecção. Quanto mais precoce a gestação, mais severas serão as consequências para o feto, podendo ser fatal se a infecção ocorrer antes de 70 dias de gestação (WATSON & BEVERLEY, 1971; BUXTON & FINLAYSON, 1986;).

Vários testes sorológicos são utilizados para diagnóstico da toxoplasmose em ovinos. Teste de aglutinação modificada (MAT), imunofluorescência indireta (IFAT) e hemaglutinação indireta (IHA), aglutinação em látex (LAT) e ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) foram descritos na literatura, com sensibilidades e especificidades variadas (MORENO et al. 1991; OLIVEIRA-SIQUEIRA et al., 1993; SAVIO & NIETO, 1995; MAINAR-JAIME & BARBERÁN, 2007; SHAAPAN, EL-NAWAWI & TAWFIK, 2008). No ELISA, o uso de antígenos totais e recombinantes tem sido empregado para detecção de anticorpos em soros de ovinos (TENTER et al., 1992; SAGER et al., 2003; MAINAR-JAIME & BARBERÁN, 2007; CABALLERO-ORTEGA et al., 2008; SHAAPAN et al., 2008; SOUSA et al., 2009; GHONEIM et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011). Em humanos, diagnósticos acurados, em especial diferenciando fase aguda da toxoplasmose, tem sido obtidos com uso de glicoconjugados (GlyC) (PORTELA et al., 2004; GIRALDO et al., 2002).

A biosíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI) é essencial para sobrevivência de *T. gondii* (WICHROSKI & WARD, 2003). Os quatro antígenos imunodominantes dos taquizoítos do protozoário são ancorados a GPI (TOMAVO et al., 1989). Boothroyd (2009) descreveu diferenças nos grupos de proteínas GPI ancoradas na superfície dos diferentes estágios parasitários. A grande proporção de proteínas ancoradas a GPI nas formas parasitárias de rápida multiplicação, e sua importância na capacidade invasiva do parasito, assim como na modulação da resposta imunológica do hospedeiro (BLACK & BOOTHROYD, 2000; DZIERSZINSKI et al., 2000; JACQUET et al., 2001; LEKUTIS et al., 2001; DEBIERRE-

GROCKIEGO et al. 2003, 2007a, 2010) tornam esses antígenos de interesse para estudos de desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. De conhecimento do nosso grupo de pesquisa, nenhum trabalho na literatura relata o uso de GlyC para a espécie ovina em um ensaio diagnóstico.

Ciente que a técnica de ELISA apresenta alta sensibilidade (MALIK et al., 1990; WALTNER-TOEWS et al., 1991; ESTEBAN-REDONDO & INNES 1998; ESTEBAN-REDONDO et al. 1999; CLEMENTINO et al., 2007; SHAAPAN et al., 2008), e que as proteínas GPI ancoradas são reconhecidas pelo sistema imune humano e murino (PORTELA et al., 2004; GIRALDO et al., 2002; WICHROSKI & WARD, 2003; DEBIERRE-GROCKIEGO et al. 2003, 2007a,b, 2009), o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imunológica na fase aguda da infecção experimental pelo *T. gondii* em ovinos, assim como após imunização com GlyC derivados de taquizoítos do protozoário, de forma a caracterizar o perfil linfocitário, os momentos e as proporções de produção das imunoglobulinas, além de desenvolver ensaio imunodiagnóstico baseado em GlyC.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A ovinocultura brasileira**

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem para consumo de carne e leite, além do uso da lã como proteção. Atualmente, a ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes graças ao excelente poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações desta espécie animal (VIANA, 2008).

No Brasil, o rebanho de ovinos está crescendo rapidamente. Em 2010, havia 17.4 milhões de animais no território nacional, representando um aumento de 3.4% comparado com o ano anterior, e de 21.8% comparado a 1998. O maior número de cabeças (56.7%) está em regiões nordestinas, sendo a Bahia o estado com maior número de animais na região: 18% do rebanho nacional, o que perfaz mais de 3.1 milhões de animais (IBGE, 2010; IBGE Séries Estatísticas, 2012). A predominante vegetação nativa da caatinga, que cobre 80% do nordeste, é usada como principal fonte de alimentação para a maioria dos ovinos (EMBRAPA CAPRINOS, 2005).

A ovinocultura brasileira é considerada uma importante atividade econômica, apresentando diversos benefícios financeiros e sociais, além de grandes perspectivas de desenvolvimento, em especial na Região Nordeste. A exportação de pele ovina acumulada no período de 1992 a 1999 foi de US\$ 87.1 milhões e, em 2000, representou US\$ 7.1 milhões (BORGES et al., 2003).

Mesmo sendo um negócio economicamente rentável, a produção/oferta de carne ovina ainda não atende o mercado interno. O Brasil continua importando carne de ovino, especialmente do Uruguai, o que demonstra a importância do agronegócio da ovinocultura como estratégia para o desenvolvimento rural (COELHO, 1999; WANDER et al., 2002; VIANA, 2008). O sucesso dessa atividade é determinado, entre outros fatores, pela taxa de cordeiros para abate, que varia em função do número de matrizes e seu subsequente desempenho reprodutivo (SASA, 2002).

A região Nordeste do Brasil constitui um centro latino-americano de ovinocultura especializada em raças deslanadas adaptadas ao clima tropical (tais como Morada Nova e Santa Inês), que apresentam alta rusticidade e cujo aproveitamento da carne e pele é de grande importância para a agropecuária, tanto convencional quanto familiar (CAVALCANTI & SILVA, 1988; MENDONÇA JR., 1995; VIANA, 2008). Todavia, algumas raças deslanadas

apresentam uma diminuição no padrão de qualidade devido ao manejo inadequado, principalmente no tocante a sanidade e a reprodução, com reflexos nos índices de produtividade.

No Nordeste, assim como no Centro-oeste, cerca de 50% da carne ovina consumida é proveniente do Uruguai, da Argentina e da Nova Zelândia, demonstrando o mercado ainda a ser conquistado em território nacional, especialmente na região nordestina (EMBRAPA CAPRINOS, 2005). Com a crescente procura por subprodutos da ovinocultura (SANTANA, 1999), há um número maior de empresários dispostos a investir nessa atividade, o que resulta em uma busca maior por tecnificação do manejo em geral, e por medidas de saúde preventivas mais eficazes e de pronto acesso (EMBRAPA CAPRINOS, 2005).

Na Bahia, a ovinocultura é caracterizada por diferentes tipos de unidades produtivas variando de agronegócio familiar até modelos industriais (ARAÚJO FILHO, 2006). Muitos dos rebanhos estão em sistema extensivo, com poucas práticas de manejo sanitário, o que contribui para baixa produtividade dessa criação (CONAB, 2006).

As condições sanitárias presentes nas criações de ovinos, juntamente com a ausência ou uso inadequado de tecnologias de manejo, constituem os dois pilares em que se apoiam as mais importantes causas de baixa produção e rentabilidade aos caprinovinocultores da região semi-árida do Brasil (PINHEIRO et al., 2000). De um modo geral, no Brasil, a fertilidade dos rebanhos de corte geralmente apresenta índices extremamente baixos. Em grande parte, essa reduzida fertilidade deve-se a problemas reprodutivos em fêmeas, agravados por aspectos nutricionais e/ou sanitários desfavoráveis.

Dentre as causas de baixa produtividade da ovinocultura, associadas à reprodução e a sobrevivência das crias, são as altas taxas de abortamentos associados a parasitoses, tais como a toxoplasmose, a qual já foi descrita como sendo extremamente disseminada no Brasil (PITA-GONDIM et al., 1999; Da SILVA et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2004; FIGLIUOLO et al., 2004; ROMANELLI et al. 2007; PINHEIRO JR et al., 2009; SOARES et al., 2009; UENO et al., 2009; MORAES et al., 2011). A infecção primária de ovelhas prenhas por *Toxoplasma gondii* pode gerar resultados graves como: morte fetal com reabsorção, abortamentos, fetos mumificados, natimortos, nascimento de animais fracos que sobrevivem clinicamente normais, porém infectados por toda vida, com o parasito presente em cistos situados no cérebro e nos músculos (BUXTON, 1998; ASPINALL et al., 2002; MASALA et al., 2003, 2007; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998; HALOS et al. 2010; DUBEY et al., 1990; STEUBER et al, 1995; DUNCANSON et al.,

2001; PEREIRA-BUENO et al., 2004, INNES et al., 2007; JACOBS et al., 1960a,b; DUBEY & BEATTIE, 1988; WEINMAN & CHANDLER, 1954).

## 2.2. Toxoplasmose

A toxoplasmose é mundialmente prevalente em humanos e em várias espécies de animais (DUBEY & BEATTIE, 1988), e gera grandes perdas econômicas na ovinocultura (DUBEY & BEATTIE, 1988; BUXTON et al., 2007).

A primeira identificação em humanos (WOLF et al., 1939) foi em uma criança recém-nascida com encefalomielite e retinite. As formas parasitárias livres e intracelulares foram encontradas nas lesões, *post mortem*, e a inoculação de fragmentos teciduais em animais possibilitou isolamento do agente. A partir de então, diversos relatos foram publicados (PINKERTON & WEINMAN, 1940; PINKERTON & HENDERSON, 1941; SABIN, 1941; WILDER, 1952; TEUTSCH et al., 1979; SILVEIRA et al., 1988; SROKA, 2001; CHO & NAM, 2012; SOARES et al., 2012).

Em humanos imunocompetentes, a toxoplasmose é assintomática em 80 a 90% dos casos. Os indivíduos sintomáticos podem apresentar linfadenopatias, acompanhadas ou não de febre e mal estar (TENTER, HECKEROTH & WEISS, 2000).

Os avanços médicos e a imunossupressão relacionada aos transplantes contribuíram para o aumento da detecção dos quadros clínicos da toxoplasmose (COHEN, 1970; RUSKIN & REMINGTON, 1976). Na década de 80, com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os casos de acometimento neurológico em adultos, que eram raros, passaram a ser frequentes, sendo fatais se não tratados (LUFT et al., 1984; NAVIA et al., 1986; ISRAELSKI & REMINGTON, 1988). A encefalite toxoplasmática em adultos foi tida como sugestiva de AIDS, representando a perda do equilíbrio parasito-hospedeiro em quadros de infecção crônica (GALLINO et al., 1996), mas essa situação se atenuou com os avanços no tratamento de indivíduos HIV soropositivos.

Em 1948, houve o desenvolvimento de um teste diagnóstico sorológico para toxoplasmose (SABIN & FELDMAN, 1948), que foi considerado o padrão ouro por muitos anos. E diversas pesquisas foram realizadas nos anos seguintes ao descobrimento do parasito, na tentativa de elucidar o ciclo biológico, o que só foi concretizado no final da década de 60 e início da década de 70 (HUTCHISON et al., 1971; DUBEY, MILLER & FRENKEL, 1970a,b; SHEFFIELD & MELTON, 1970).

### 2.2.1. Agente Etiológico

O filo Apicomplexa compreende parasitos intracelulares obrigatórios altamente adaptados, que conseguem invadir e se desenvolver dentro das células hospedeiras (QUEIROZ, 1998). Um dos membros deste filo, a família Sarcocystidae, possui mais de 200 espécies reconhecidas de coccídeos heteroxenos formadores de cistos teciduais nos hospedeiros intermediários, sendo subdividida em duas subfamílias, a Sarcocystinae e a Toxoplasmatinae (MUGRIDGE et al., 1999).

A subfamília Toxoplasmatinae compreende quatro gêneros diferentes, dentro dos quais pelo menos duas espécies, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, são de importância médica e médico-veterinária, podendo causar problemas reprodutivos (HARTLEY & MARSHALL, 1957; DUBEY & BEATTIE, 1988; DUBEY & WELCOME, 1988; DUBEY et al., 1990; LIND & BUXTON, 2000).

Diversas espécies de animais de sangue quente consistem os hospedeiros intermediários do protozoário. Os felídeos silvestres ou domésticos, por sua vez, são os hospedeiros definitivos, e neles o parasito realiza a multiplicação enteroepitelial que culmina com a reprodução sexuada e eliminação de oocistos pelas fezes, com contaminação do meio ambiente (DUBEY, 1977).

A análise genética através do estudo do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFPL), realizada com amostras da Europa e América do Norte, enquadra a maioria das linhagens de *T. gondii* em três distintas linhagens clonais, tipos ou famílias: I, II e III (SIBLEY & BOOTHROYD, 1992; HOWE & SIBLEY, 1995). Essas famílias diferem quanto a virulência e padrão de ocorrência epidemiológica, apresentando diferenças genéticas de até 1% (SIBLEY & BOOTHROYD, 1992; SU et al., 2006).

Cerca de 95% das cepas caracterizadas estão dentro do padrão supradescrito, 5% são classificadas como recombinantes e 1% são denominadas exóticas. Isolados do tipo II foram encontrados em material de aborto no Reino Unido, Dinamarca, França, Estados Unidos e Irã, sendo que nos dois últimos países também foram identificados o tipo III (OWEN & TREES, 1999; JUNGENSEN et al., 2002; DUMÈTRE et al., 2006; ZIA-ALI et al., 2007; DUBEY et al., 2008). Segundo alguns autores, a toxoplasmose em humanos está geralmente associada ao tipo II, sendo os demais tipos encontrados em menor proporção (HOWE & SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997). No Brasil, casos de toxoplasmose ocular humana foram analisados por Vallochi et al. (2005), que encontraram predominantemente a linhagem tipo I.

Estudos publicados na literatura apontam para uma grande variabilidade genética do *T. gondii* presentes em outras regiões do globo terrestre (DUBEY et al., 2002; FUX et al., 2003; AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; EL BEHAIRY et al., 2013), inclusive nos Estados Unidos (DUBEY et al., 2013). Na população brasileira, Khan et al. (2006) sugeriu uma diversidade clonal. Pena et al. (2008) estudaram isolados de cachorros, gatos e frangos, obtidos no Brasil, e demonstraram alta diversidade populacional de *T. gondii*, sugerindo alta taxa de recombinação. Essas cepas foram classificadas em BrI (induz 100% de mortalidade em camundongos infectados), BrII (com virulência intermediária), BrIII (não virulenta) e BrIV (também com virulência intermediária).

Durante o ciclo biológico, o parasito apresenta uma forma proliferativa de rápida multiplicação, denominada taquizoíto ou trofozoíto, e formas encistadas em tecidos chamadas de bradizoítos ou citozoítos (FRENKEL, 1973). Essas formas parasitárias apresentam diferenças ultraestruturais. Quanto à resistência à ação do suco gástrico, os taquizoítos são sensíveis, e os cistos teciduais são resistentes (JACOBS et al., 1960a; FERGUSON & HUTCHISON 1987).

Oocistos são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos não imunes dois a três dias após a contaminação, podendo permanecer por duas a três semanas (DUBEY & BEATTIE, 1988). No meio ambiente, ocorre a esporulação do oocisto, originando dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (DUBEY et al., 1970a,b). Após a ingestão de oocistos, os esporozoítos se multiplicam nas células intestinais e dos linfonodos mesentéricos antes da parasitemia (BUXTON, 1998). Mais de 100 milhões de oocistos podem ser eliminados nesse período, o que demonstra a intensa contaminação ambiental (PLANT et al., 1974; McCOLGAN et al., 1988).

Carnívoros e herbívoros podem se infectar de forma horizontal ou vertical (DUNCANSON et al., 2001; KATZER et al., 2011). A ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais repletos de bradizoítos, ou ingestão de oocistos esporulados junto com alimentos, água ou mãos e objetos contaminados consistem importantes fontes de infecção. Diversos autores apontam a transmissão congênita como rara e na dependência da infecção ocorrer em fêmeas no início da gestação, com os taquizoítos alcançando a placenta e o feto (WOLF et al., 1939; JACOBS et al., 1960a). Publicação recente, contudo, demonstrou a presença de *T. gondii* em borregos nascidos de ovelhas cronicamente infectadas (EDWARDS & DUBEY, 2013).

### 2.2.2. Patogênese em ovinos

Diversos trabalhos na literatura apontam o *T. gondii* como importante agente etiológico de abortamento em ovelhas (FREYRE et al., 1999; MASALA et al., 2007). Apesar do acometimento reprodutivo em fêmeas infectadas, nenhuma alteração reprodutiva em machos foi relacionada ao protozoário (LOPES et al., 2009).

A infecção primária de ovelhas prenhas com *T. gondii* pode gerar resultados graves semelhantes ao que ocorre com mulheres gestantes, inclusive seguindo a mesma relação idade gestacional/infecção: morte fetal com reabsorção, abortamentos, fetos mumificados, natimortos, nascimento de animais fracos ou sobrevivência do borrego clinicamente normal, porém infectado por toda vida, com o parasito presente em cistos situados em cérebro e músculos (BUXTON, 1998). Até pouco tempo atrás acreditava-se que gestações subsequentes não seriam interrompidas em virtude da infecção crônica parasitária (McCOLGAN et al., 1988) contudo publicação recente demonstra o contrário (EDWARDS & DUBEY, 2013).

Para a espécie ovina, a principal forma de contato com o protozoário é pós-natal, em virtude da contaminação de alimentos e/ou pastagens com oocistos esporulados (PLANT et al., 1974; FAULL et al., 1986). Entretanto, a importância da transmissão congênita tem sido amplamente evidenciada (DUNCANSON et al., 2001; MORLEY et al., 2005).

Dez dias após a infecção experimental, os parasitos já são detectados na corrente sanguínea e o ovino apresenta piroxia (DUBEY & SHARMA, 1980; REID et al., 1982; WASTLING et al., 1993; LOPES et al., 2009). São observados aumento da frequência respiratória e da temperatura corpórea do terceiro ao oitavo dia pós-infecção experimental (ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999).

Dois dias após a inoculação de taquizoítos em ovinos, há produção de IFN $\gamma$  (INNES et al., 1995). Com a cronicidade e ativação de apropriada resposta imune, há transformação de taquizoítos em bradizoítos, os quais se multiplicam lentamente em cistos teciduais cerebrais e musculares, especialmente coração, persistido no organismo animal por toda vida, o que contribui para o alto índice de contaminação da carne e seus derivados e, conseqüentemente, com a transmissão horizontal (BUXTON, 1998; ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; ASPINALL et al., 2002; HALOS et al., 2010).

Quando a infecção acontece durante a gestação, ocorre metástase parasitária e disseminação para o feto, sendo encontrada grande quantidade de taquizoítos nos fluidos amniótico e alantóico no 35º dia da infecção. O sistema imune fetal adquire habilidade

progressiva de responder à infecção por *T. gondii* a partir do 70º dia. Por essa razão, infecções que ocorrem antes dessa idade resultam em morte fetal com reabsorção, mumificação, maceração ou abortamento. Quando a infecção ocorre mais tardiamente na gestação, os danos são menores e podem desencadear natimortos, ou nascimento de borregos fracos ou clinicamente normais, apesar de infectados (BUXTON & FINLAYSON, 1986).

A resposta humoral do feto ao *T. gondii* é visível pelos altos níveis de imunoglobulinas (Ig) presentes no conteúdo estomacal (IgG) e no fluido amniótico (IgM e IgG) (MARQUES et al., 2012).

### **2.2.3. Epidemiologia**

Infecções por *T. gondii* em ovinos são relatadas em diversos países, com índices de soropositividade variáveis (HARTLEY & MARSHALL, 1957; WALDELAND, 1976; DUBEY & BEATTIE, 1988; DUBEY & WELCOME, 1988; DUBEY et al., 1990; STEUBER et al., 1995; LIND & BUXTON, 2000; DUMÈTRE et al., 2006). Alguns estudos demonstram aumento da soroprevalência à toxoplasmose relacionada à idade, o que indica uma intensa contaminação ambiental com oocistos e que a maioria das infecções em ovinos ocorre pós-natal (WALDELAND, 1977; BLEWETT & WATSON, 1983; DUBEY & BEATTIE, 1988; LUNDEN et al., 1994; MARTIN & AITKEN, 2000; FIGLIUOLO et al., 2004; KATZER et al., 2011), apesar da ausência de correlação soropositividade e presença de gatos encontrada por alguns autores (PINHEIRO JR et al., 2009; TZANIDAKIS et al., 2012).

Em São Paulo, Figliuolo et al. (2004) obtiveram 597 amostras séricas de animais de 30 fazendas e encontraram pelo menos um animal sorologicamente positivo em cada propriedade, sendo 34,7% a soropositividade total para *T. gondii*, utilizando a imunofluorescência indireta.

A Bahia, por deter o maior efetivo de ovinos do país (IBGE, 2010; IBGE SÉRIES ESTATÍSTICAS, 2012), pode ser o estado nordestino mais afetado. Nas regiões semiáridas, onde os animais são criados de forma extensiva na vegetação espinhosa da Caatinga, há um ambiente favorável à contaminação dos animais e consequente disseminação da doença. No referido estado, 18,5% dos ovinos de 10 propriedades foram identificados como positivos para o protozoário por aglutinação em látex (PITA GONDIM et al., 1999).

A infecção é de grande impacto econômico em virtude da indução de abortamentos. Em 2007, Masala et al. relataram positividade para *T. gondii* pela reação da polimerase em cadeia (PCR) em 18,1% e 13,1% de fetos e placentas, respectivamente, pertencentes a 366 amostras

de abortos de ovelhas, na Itália. No Uruguai, entre 1992 e 1994, em uma determinada população ovina de 18 fazendas de oito regiões estudadas, estimou-se que os abortamentos relacionados à toxoplasmose variaram de 1,4 a 3,9% dos casos, equivalente a uma perda de US\$ 1,4 a 4,7 milhões em todo país (FREYRE et al., 1999).

Preocupante também é o fato da intensa contaminação de carne usada para consumo humano. Shahiduzzaman et al. (2011) analisaram a positividade em bovinos, caprinos e ovinos criados para abate, e os maiores índices foram encontrados para a espécie ovina (40%). A análise da contaminação da carne foi realizada por PCR em 71 amostras do Reino Unido, com 38% (27/71) de positividade para o locus SAG2 de *T. gondii* (ASPINALL et al., 2002).

A ingestão de carne ovina mal cozida contendo bradizoítos de *T. gondii* é uma importante fonte de infecção humana (DUBEY & SHARMA, 1980) e pouco se sabe sobre a densidade de cistos teciduais. Estima-se que a existência possa ser inferior a 1 cisto tecidual / 50 g de carne (DUBEY et al., 1996), o que dificulta o diagnóstico histológico e remete à reflexão da importância da ingestão de carne na contaminação humana por toxoplasmose. Estudos experimentais demonstram uma grande variação na prevalência de contaminação de carne suína e ovina, utilizadas na alimentação humana, de 1,5 a 38% (WARNEKULASURIYA et al., 1998; ASPINALL et al., 2002).

#### **2.2.4. Resposta Imune e Escape Parasitário**

Pela característica de intracelularidade obrigatória do *T. gondii*, a resposta imune celular é a mais importante para proteger os hospedeiros da infecção. Contudo, a resposta humoral, assim como a inata, também são ativadas em indivíduos com toxoplasmose (GAZZINELLI et al., 1993; INNES & VERMEULEN, 2006).

A presença do parasito, com estimulação macrofágica direta, induz a síntese de IL-12 e, subsequentemente, de IFN $\gamma$  por células NK de camundongo (SUZUKI et al. 1988; GAZZINELLI et al. 1993; HAYASHI et al. 1996; YAP & SHER, 1999). Neutrófilos e células dendríticas também produzem altos níveis de IL-12 (GAZZINELLI et al., 1993, 1994; BLISS et al., 1999). A influência de citocinas na atração de macrófagos é relatada, em especial IL-6, que estimula a síntese hepática de proteínas de fase aguda (APPELBERG et al., 1994).

Sob ação das citocinas Th1, tem início a resposta imune humoral, que pode persistir por anos (DUBEY & BEATTIE, 1988). Na espécie ovina, a síntese de anticorpos IgM é visível na 2ª semana pós-infecção (p.i.), com pico na 3ª semana p.i., sendo predominante no 1º mês p.i.,

e podendo ser detectada até o 3º mês p.i. Infecções experimentais subsequentes não promovem elevação de IgM específica (BLEWETT et al., 1983; McCOLGAN et al., 1988; TREES et al., 1989; TENTER et al., 1992; ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999).

Apesar da IgM anti-*T. gondii* ser considerada o principal marcador sorológico para diagnósticos de infecções recentes, a literatura aponta níveis persistentes de IgM por meses após a infecção humana (FERREIRA & CAMARGO, 2002).

Após o pico de IgM, segue-se a produção de IgG, a qual predomina no 2º mês p.i. Significante produção de IgG em ovinos após infecção oral com oocistos foi verificada no 14º dia p.i. (BLEWETT et al., 1983; McCOLGAN et al., 1988; ESTEBAN-REDONDO & INNES, 1998). Esses animais estão imunes ao protozoário, apesar da infecção persistir, com os parasitos situados em cistos teciduais. Os anticorpos produzidos podem desempenhar intenso papel protetor em infecções subsequentes (INNES & VERMEULEN, 2006).

A indução de resposta imune celular do perfil Th1 é importante para o controle da proliferação parasitária. Estudos *in vitro* usando células de ovinos demonstraram que IFN $\gamma$  produzida por essa espécie animal inibe a multiplicação intracelular dos taquizoítos, com possível morte do parasito (SUZUKI et al., 1988; OURA et al., 1993; YAP & SHER, 1999). A síntese de IFN $\gamma$  ocorre no 2º dia da infecção de ovinos com cepa atenuada (S48) de *T. gondii* (INNES et al., 1995).

A atuação de IFN $\gamma$  associada a outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6, tem efeito sinérgico (SIBLEY et al. 1991; CHAO et al. 1994; HALONEN et al., 1998). Os mecanismos intracelulares antiparasitários induzidos por IFN $\gamma$  consistem na formação de metabólitos reativos de oxigênio e óxido nítrico, e no acúmulo de membros da família p47 GTPase que promovem a ruptura do vacúolo parasitóforo (MURRAY et al. 1979; DÄUBENER et al. 1996; MARTENS et al. 2005).

A ação conjunta de linfócitos T e IFN $\gamma$  é a principal ferramenta imunológica contra *T. gondii* (MOSMANN & COFFMAN, 1987; INNES et al., 1995; INNES & WASTLING, 1995). A resposta celular inicial à infecção por *T. gondii* é predominantemente de linfócitos T CD4+, que atuam na regulação da resposta imune. Por volta do 10º dia p.i., há significativo aumento de células CD8+, que atuarão como células efetoras na imunidade (SUZUKI & REMINGTON, 1988; DENKERS & GAZZINELLI, 1998; GAZZINELLI et al., 1991, 1992; BUXTON et al., 1994; INNES et al., 1995).

Associada à secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ), a infecção por *T. gondii* induz síntese de citocinas anti-inflamatórias, tal como fator transformador de crescimento (TGF $\beta$ ) e IL-10. Neste processo, a IL-10 atua essencialmente em células fagocíticas e células apresentadoras de antígenos, inibindo a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias (OSWALD et al., 1992; MOORE et al., 2001). Esse efeito antagônico das citocinas, com caráter imunossupressor inflamatório, tem ação favorável tanto para o parasito quanto para o hospedeiro: para o parasito, frente à redução da atividade microbicida dos macrófagos, primariamente induzida por IFN $\gamma$ , o que possibilita a multiplicação intracelular do parasito.; e para o hospedeiro, visto que um processo flogístico excessivo poderia culminar com a morte do animal parasitado (BOGDAN & NATHAN 1993; GAZZINELLI et al. 1996a, b).

A expansão clonal de linfócitos citotóxicos ocorre em maior proporção que de linfócitos auxiliares. Adicionalmente, células CD4<sup>+</sup> de animais infectados por *T. gondii* se tornam irresponsivas à estimulação antigênica *in vitro*, favorecendo a propagação parasitária. Há aumento da apoptose em células CD4<sup>+</sup>, possivelmente pela morte celular passiva. Contudo, a apoptose de células parasitadas por *T. gondii* é inibida por diversos mecanismos, como inibição da cascata da caspase e resistência à citotoxicidade por células T (mediada por Fas, granzimas e perforinas), contribuindo para o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro, com longevidade para hospedeiro e protozoário (LUFT et al., 1984; SKLENAR et al., 1986; KHAN et al., 1996; NASH et al., 1998; GOEBEL et al., 2001; PAYNE et al., 2003).

Após a ligação de IFN $\gamma$  a receptores específicos, presentes em quase todas as células, diversas respostas antimicrobianas podem ser ativadas. Estima-se que esta citocina regule a expressão de diversos genes relacionados com a produção de proteínas envolvidas na criação de barreiras efetivas contra os patógenos (PESTKA et al., 2004), como as moléculas co-estimulatórias e as de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II por diversos tipos de células (BOEHM et al., 1997).

Um interessante mecanismo de escape de *T. gondii* é a alteração na expressão de MHC de classe I e II, que normalmente são reguladas positivamente por IFN $\gamma$  em diversos tipos celulares. Na infecção, IFN $\gamma$  não consegue aumentar a síntese dessas moléculas na superfície de macrófagos derivados da medula óssea (LÜDER et al., 1998). Há inibição da síntese de MHC de classe II em macrófagos, linfócitos B, astrócitos e micróglia de algumas espécies animais. Esse efeito em MHC de classe II é observado em células infectadas e células

vizinhas sem infecção parasitária, independente da síntese de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF $\beta$ , assim como prostaglandina E e óxido nítrico (LÜDER et al., 2003; McKEE et al., 2004).

McKee et al. (2004) não demonstrou alteração na expressão de MHC de classe II em células dendríticas (DCs) imaturas após estímulo com *T. gondii* viável, mas o oposto ocorria quando o estímulo era com parasitos mortos ou extratos parasitários. Nem a presença de lipopolissacarídeo induziu aumento da expressão de MHC de classe II quando parasitos viáveis estavam presentes. Em DCs que maturaram antes do encontro com o protozoário, a expressão de MHC de classe II parece não se alterar. Contudo, DCs imaturas foram ativadas por *T. gondii* para o aumento da expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias *in vitro* e *in vivo* nos experimentos de Pepper et al. (2008). As DCs induziram a proliferação células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas virgens, constituindo a principal célula envolvida no processamento e apresentação de peptídeos do parasito. Outro papel importante das DCs na toxoplasmose, verificada pelos autores, é a produção de altos níveis de IL-12 e apresentação cruzada de peptídeos para linfócitos T CD8<sup>+</sup> apontando o importante papel dessas células na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa.

O risco da infecção durante a gestação reside na modulação imunológica na interface materno-fetal. A supressão dos mecanismos inflamatórios, com mínima expressão de IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , tornam a placenta e o feto susceptíveis à invasão parasitária durante a parasitemia por *T. gondii*. Caso a infecção ocorra precocemente durante a gestação, as consequências para o feto serão fatais (BUXTON & FINLAYSON, 1986; ENTRICAN & WHEELHOUSE, 2006), mas se a infecção ocorrer em gestação anterior ou antes do cruzamento, a imunidade e memória imunológica desenvolvidas irão garantir parto normal e nascimento de neonato não infectado (WATSON & BEVERLEY, 1971; McCOLGAN et al., 1988). Contudo, indícios de que a proteção imunológica não é absoluta foram publicados esse ano (EDWARDS & DUBEY, 2013).

### **2.2.5. Diagnóstico**

Na atualidade, as técnicas sorológicas são as mais utilizadas no diagnóstico da toxoplasmose, mas resultados falso-positivos e falso-negativos podem acontecer. Anticorpos específicos na fase aguda da toxoplasmose podem estar ausentes, assim como em quadros imunossupressivos (LIN et al., 2000; BERTOZZI et al., 1999; DECOSTER et al., 1988a;

DECOSTER et al., 1988b). Por esse motivo, alguns autores encorajam o uso de testes diagnósticos com alvos diferentes, como Ghoneim et al., que sugerem o diagnóstico concomitante com uma técnica sorológica e outra molecular, especialmente para caprinos e ovinos.

Vários testes diagnósticos ou kits têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da toxoplasmose ovina, incluindo aglutinação direta, hemaglutinação indireta, western blotting (WB), reação da polimerase em cadeia (PCR), aglutinação modificada (MAT), aglutinação em látex, imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático em fase sólida (ELISA) (DUBEY et al., 1987; HARKINS et al., 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999; PAYNE et al., 1988; SEEFELDT et al., 1989; TENTER et al., 1992; TREES et al., 1989; WASTLING et al., 1995). Alguns destes testes já foram ferramentas diagnósticas em estudos sorológicos desta parasitose em países como Uruguai, Estados Unidos, Austrália, Suécia e Egito (RIFAAT et al., 1979; UGGLA et al., 1983; DUBEY et al., 1986; MUNDAY et al., 1987; MALIK et al., 1990; EL-GHAYSH & MANSOUR, 1994; SÁVIO & NIETO, 1995). Dos testes acima mencionados, a imunofluorescência indireta é altamente específica, mas demonstra sensibilidade não tão elevada, além de requerer material especial e ser afetada pela subjetividade na leitura (MALIK et al., 1990), enquanto o ELISA apresenta grande sensibilidade, é quantitativo, de baixo custo, podendo ser automatizado (DUBEY et al., 1995).

Sensibilidade e especificidade variam entre as diversas metodologias utilizadas, assim como na dependência do antígeno empregado no ensaio. Para o diagnóstico de infecção natural por *T. gondii* em ovinos, MAT e ELISA demonstraram sensibilidades superiores a 90%, sendo o MAT (96%) mais sensível que o ELISA (90.1%) (SHAAPAN, EL-NAWAWI & TAWFIK, 2008).

Para a espécie ovina, a sensibilidade nos ensaios de ELISA usando lisado antigênico total de taquizoítos de *T. gondii* varia de 61% a 94%, com especificidade variando de 82 a 100% (WERRE et al., 2002; CABALLERO-ORTEGA et al., 2008; SHAAPAN et al., 2008; SCHAEFER et al., 2011; SAKATA et al., 2012). Os métodos de produção de taquizoítos (*in vivo* ou *in vitro*) e obtenção de antígenos variam significativamente entre laboratórios, assim como a possibilidade do antígeno conter fragmentos celulares ou materiais utilizados no cultivo parasitário. Esses fatores podem ser responsáveis pelas grandes variações nos parâmetros, em especial na sensibilidade, dos ensaios padronizados por diferentes grupos de pesquisa.

Diferenças no reconhecimento antigênico por anticorpos IgM e IgG foram descritas na década de 80. Robusta resposta de IgM contra polissacarídeos e proteínas de *T. gondii* é encontrada no início da infecção. Anticorpos IgG, por sua vez, reconhecem proteínas derivadas do parasito, mas IgG anti-polissacarídeos são observados ocasionalmente e em baixos títulos (MINEO et al., 1980). Partanen et al. (1984) identificaram como principais alvos de anticorpos IgM dois polipeptídeos com peso molecular de 25 e 35 kDa. O reconhecimento pela IgG abrangeu diversos peptídeos, predominantemente na faixa de 30 a 67 kDa. Frente a essas diferenças, uma alternativa de conferir diagnóstico mais acurado para diferenciação de fase aguda ou crônica da toxoplasmose consiste no uso de peptídeos imunodominantes exclusivos de *T. gondii*. Antígenos recombinantes podem ser utilizados em testes sorológicos, contudo publicações com essa característica para a espécie ovina ainda são discretas. Especificamente para ovinos, ensaios usando antígeno tradicional do endozoíto (TEA), e antígenos recombinantes H11 (rH11), antígeno de superfície de *T. gondii* - SAG1 (rSAG1), grânulos de proteínas densas - GRA (rGRA), antígeno do cisto tecidual - MAG1 (rMAG) foram publicados, com sensibilidade variando de 34% (rH11) a 96% (TEA ou rSAG1), e especificidade chegando a 100% (SAGER et al., 2003; HISZCZYŃSKA-SAWICKA et al., 2010, 2011). Com o uso de SAG purificado, Tzanidakis et al. (2012) encontraram 93.9% de sensibilidade, e nenhum resultado falso-positivo.

O uso de proteínas ancoradas a GPI ou de glicosilinositolfosfolipídeos (GIPLs) é descrito apenas em diagnósticos para a espécie humana, na pesquisa de anticorpos IgM, IgG e IgA (GIRALDO et al., 2002; PORTELA et al., 2004), com aparente produção preferencial de IgG anti-GlyC, e de IgA e IgM anti-GIPLs.

#### **2.2.6. Tratamento e Profilaxia**

Em humanos, a associação de sulfonamidas com pirimetamina é o tratamento padrão ouro de escolha na comunidade médica, seguida de clindamicina (ARAUJO & REMINGTON, 1974; REMINGTON et al., 2006). Em mulheres gestantes, o uso profilático de espiramicina é indicado pela não toxicidade da droga associado a sua incapacidade de atravessar a barreira placentária (DESMONTS & COUVREUR, 1974). O uso de monensina ou sulfamezatina associada à pirimetamina, reduziu número de abortamentos em ovelhas e mortalidade de borregos (BUXTON et al., 1988; BUXTON et al., 1993).

Apesar dos dados conflitantes acerca da influência positiva ou negativa da presença de gatos em propriedades rurais com prática de ovinocultura e soropositividade para *T. gondii* (WALTNER & TOEWS et al., 1991; FIGLIUOLO et al., 2004; PINHEIRO JR et al., 2009; MORAES et al., 2011), é recomendável impedir o acesso de gatos domésticos e/ou selvagens nos locais de criação de animais, especialmente nos pastos. Manejo intensivo deve ser preferível ao extensivo, aliado a bom manejo de água e comida (WALTNER & TOEWS et al., 1991; PINHEIRO JR et al., 2009; MORAES et al., 2011). Congelar ou cozinhar a carne antes do consumo humano ou animal consiste medida preventiva de simples implementação (DUBEY et al., 1990; KOTULA et al. 1991).

Já está disponível uma vacina de segunda geração para a espécie ovina, com uma cepa atenuada de *T. gondii* denominada S48. Esse isolado é capaz de induzir infecção transitória sem cronicidade do processo infeccioso, pois S48 não tem habilidade para se transformar em taquizoítos (BUXTON et al., 1993a). Após administração de S48, há adequado processamento e apresentação de seus peptídeos ao sistema imunológico (BUXTON & INNES, 1995), com indução de imunidade humoral e celular (linfócitos CD4+, CD8+ e IFN $\gamma$ ) que previnem a proliferação do protozoário após ingestão dos oocistos, com impedimento à colonização da placenta e do feto prevenindo, por tanto, o abortamento (BUXTON et al., 1994; WASTLING et al., 1994; WASTLING et al., 1995; INNES et al., 1995). A vacina está comercialmente disponível na Europa, sendo indicada para uso antes do cruzamento para prevenção de toxoplasmose congênita em ovinos. Experimentos demonstram imunidade duradoura por 18 meses (BUXTON et al., 1993a, 1994).

### **2.3. Glicoconjugados**

Proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) são encontradas em células eucarióticas, na faixa de 100 mil cópias de âncoras de GPI por célula, enquanto protozoários expressam mais de 20 milhões de cópias por célula. A função dessas âncoras seria conferir uma associação mais estável entre as proteínas com a camada bilipídica da membrana celular (FERGUSON, 1999).

Wichroski e Wardi (2003) demonstraram que a síntese de GPI é essencial para a viabilidade de *T. gondii*. Estudos preliminares observaram que diversas moléculas de membrana de *T. gondii*, as quais possuem importância no desenvolvimento de uma resposta

imune eficaz contra protozoários, apresentam uma âncora GPI comum com papel primordial na ativação de macrófagos (TOMAVO et al., 1989; ALMEIDA et al., 2000).

As GPIs ancoram grande parte das proteínas de superfície de *T. gondii*, tais como SAG1, SAG2 e SAG3. A âncora é ligada por seu terminal etanolamina fosfato, via uma ligação peptídica, ao terminal C da proteína (TOMAVO et al., 1989). Zinecker et al. (2001) realizaram uma detalhada análise da âncora GPI de SAG1, e encontraram duas glicofomas principais que ancoram a proteína, com diferença apenas de uma glicose entre elas. Os mesmos autores, ao analisarem precursores de GPI, verificaram que a modificação do core da âncora acontece antes da transferência deste para a proteína.

A maioria dos antígenos de *T. gondii* pertence à família SAG, que consiste de proteínas GPI ancoradas imunodominantes nos taquizoítos e presentes apenas neste estágio evolutivo parasitário (BURG et al., 1988; DECOSTER et al., 1988b; RACHINEL et al., 2004). Nos estágios iniciais da infecção, SAG1 é um dos primeiros antígenos reconhecidos por IgM de seres humanos e camundongos, havendo também anticorpos específicos no estágio crônico da toxoplasmose (DECOSTER et al., 1988b; RACHINEL et al., 2004).

Giraldo et al. (2000) descreveram o reconhecimento de GIPLs de membrana de *T. gondii* por soros de humanos na fase aguda da toxoplasmose, e de proteínas ancoradas a GPI por soro de pacientes na fase crônica. Posteriormente, o mesmo grupo padronizou ensaio de ELISA utilizando GIPLs como antígeno, obtendo alta especificidade e sensibilidade, associada com um maior poder de discriminação entre a fase aguda e crônica da doença, sem reatividade cruzada com outras doenças infecciosas (GIRALDO et al., 2002). Em 2004, Portela et al. descreveram o emprego de IgM-GIPL-ELISA para levantamento sorológico em uma população do norte de Minas Gerais, e a correlação da presença de IgA específica contra o parasito com a gravidade da lesão ocular.

As proteínas ancoradas à GPI povoam densamente a superfície dos taquizoítos (BLACK & BOOTHROYD, 2000; LEKUTIS et al., 2001) e estão relacionadas à ligação com a célula hospedeira e modulação da resposta imunológica no animal parasitado (DZIERSZINSKI et al., 2000; JACQUET et al., 2001; LEKUTIS et al., 2001; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003, 2007a, 2010).

GPIs de diversos protozoários são reconhecidos por receptores toll-like (TLR), induzindo a secreção de TNF $\alpha$ , IL-12 e óxido nítrico por macrófagos (CAMPOS et al., 2001; De VEER et al., 2003; KRISHNEGOWDA et al., 2005; MEDEIROS et al., 2007). Na infecção por *T.*

*gondii*, a ativação de TLR 2 e 4 por GPIs conta com o envolvimento de galectina-3 (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2010), molécula que participa do recrutamento de células efectoras em infecções (HEMMI et al., 2000). O reconhecimento de GPI, derivada de taquizoítos, por TLR ativa o fator transcricional NFκB e promove a secreção de TNFα, IFNγ e IL-12 em macrófagos e células esplênicas (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003, 2007a, 2010).

Indícios de proteção à infecção por alguns protozoários pelo uso de proteínas GPI ancoradas derivadas dos mesmos foram descritos na literatura. Após vacinação, houve o desenvolvimento de resposta imunológica protetora, com ativação de linfócitos T CD8+ e secreção de IFNγ, associada à produção de Ig do perfil Th1 (BRUNA-ROMERO et al., 2004; OPHORST et al., 2007; LI, BASAGOUDANAVAR, GOWDA, 2008) ou com resposta imune humoral mista, mas conferindo proteção parcial ao desafio parasitário (MARTINS et al., 2012).

Frente aos fatos supradescritos, que demonstram a importância das proteínas GPI ancoradas e das âncoras GPI na invasão celular e modulação imunológica, é justificado o estudo da cinética da resposta imune humoral e celular, em ovinos, após infecção com taquizoítos do protozoário ou imunização com proteínas GPI ancoradas.

### **3. HIPÓTESE**

A infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos desencadeia elevação de IgM na fase aguda, e de IgG na fase crônica da infecção, com aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+. Adicionalmente, moléculas de membrana de taquizoítos de *T. gondii* são imunogênicas para a espécie ovina, podendo ser utilizadas no diagnóstico e na imunização.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo Geral:**

Estudar a resposta imunológica na fase aguda da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em ovinos, e após imunização com glicoconjugados, de forma a caracterizar o perfil linfocitário circulante, assim como os momentos e as proporções de produção das imunoglobulinas.

#### **4.2. Objetivos Específicos:**

- a) Desenvolver ELISAs baseados no uso de lisado antigênico e glicoconjugados de *T. gondii*;
- b) Analisar o status imunológico humoral em ovinos de alto padrão genético;
- c) Determinar a imunogenicidade de glicoconjugados de *T. gondii in vivo*;
- d) Avaliar a cinética da produção de anticorpos IgG e IgM específica contra lisado total e glicoproteínas de taquizoítos em ovinos infectados experimentalmente e imunizados com glicoconjugados de *T. gondii*;
- e) Apresentar a cinética da resposta imune adaptativa, na sua vertente celular, através da avaliação da imunofenotipagem leucocitária do sangue periférico de ovinos infectados experimentalmente e imunizados com glicoconjugados de *T. gondii*.

## 5. METODOLOGIA

Para realizar a cinética da resposta imunológica após infecção de ovinos com taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii*, ou após a imunização com moléculas ancoradas a GPI, e desenvolver ensaios imunodiagnósticos para toxoplasmose, o presente trabalho foi organizado em três experimentos. Inicialmente, foi realizado o cultivo celular de taquizoítos da cepa RH em quantidade suficiente para obtenção das proteínas glicoconjugadas. A extração das proteínas foi concluída e seu reconhecimento por soros de ovinos infectados naturalmente foi analisado. A expansão parasitária foi mantida, objetivando obtenção de taquizoítos viáveis para infecção.

Paralelamente, foram coletadas amostras sanguíneas de ovinos de alto valor genético e comercial. Os soros obtidos foram armazenados até o momento de realização dos ensaios.

A partir de então, três experimentos foram organizados da seguinte forma:

1. Padronização de ensaio de ELISA utilizando lisado antigênico e glicoconjugados de *T. gondii* para diagnóstico da toxoplasmose na espécie ovina.
2. Avaliação do status sorológico de ovinos de alto valor comercial e genético, criados no Estado da Bahia, correlacionando a soropositividade com as práticas de manejo aplicadas.
3. Estudo da cinética da resposta imune humoral e celular após infecção experimental ou imunização com proteínas GPI-ancoradas em ovinos.

Estes experimentos serão apresentados em forma de manuscritos/capítulos, onde a descrição completa da metodologia, resultados e discussão estão especificadas em cada manuscrito/capítulo. Conforme exigência do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIm), as referências bibliográficas estarão agrupadas no final desta tese.

# Proteínas GPI ancoradas de *T. gondii* conferem especificidade mas baixa sensibilidade na detecção de IgG específica de ovinos em ensaio de ELISA

Patrícia Meira-Santos<sup>a,b</sup>, Maria Tereza Guedes<sup>a</sup>, Dan Loureiro<sup>a</sup>, Bianca Cardeal<sup>a</sup>, Thiago de Jesus Sousa<sup>a</sup>, Bruno Lopes Bastos<sup>a</sup>, Maria de Fátima Dias Costa<sup>c</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>, Ricardo Wagner Portela<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

<sup>b</sup>Curso de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Campus Cariri, Rua Divino Salvador, 284, Rosário, Barbalha, Ceará, Brasil, 63180-000

<sup>c</sup>Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

---

## RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção crônica causada pelo *Toxoplasma gondii*, e carne ovina parasitada é uma importante fonte de contaminação para seres humanos. Com objetivo de identificar anticorpos contra *T. gondii* em amostras séricas de ovinos, um ELISA baseado em glicoconjugados (GlyC) da superfície parasitária foi desenvolvido, e comparado à imunofluorescência indireta como padrão-ouro. GlyC foi extraído de taquizoitos da cepa RH com partição clorofórmio-metanol-água. Dois diferentes sistemas imunoenzimáticos, usando GlyC (ELISA-GlyC) e lisado antigênico total do parasito (ELISA-LA) foram padronizados e os parâmetros de ambos testes foram estabelecidos. ELISA-LA mostrou sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de 100%, 96%, 91%, 93%, e 92%, respectivamente. 100% de repetibilidade, e reprodutibilidade de 100% e 67% para as amostras positivas e negativas, respectivamente, foram encontradas. ELISA-GlyC apresentou sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de 30%, 94%, 86%, 54%, e 60%, respectivamente. Reprodutibilidade e repetibilidade das amostras positivas e negativas foram de 100%. ELISA-LA é uma excelente ferramenta diagnóstica para ovinos, contudo a sensibilidade de ELISA-GlyC deve ser melhorada.

---

Palavras-Chave: Toxoplasmose; *Toxoplasma gondii*; Glicoconjugado; Ovino; ELISA.

---

## Introdução

A toxoplasmose apresenta elevada prevalência em diversos animais, incluindo humanos e ovinos (Dubey e Beattie, 1988; Waltner-Toews et al., 1991; Esteban-Redondo e Innes, 1998; Esteban-Redondo et al., 1999; Duncanson et al., 2001; Masala et al., 2007). A infecção primária de ovelhas, durante a gestação, pode resultar em morte fetal, reabsorção/abortamento, nascimento de borregos fracos, ou vivos e clinicamente normais, porém infectados (Buxton, 1998). Abortamento é um dos sinais clínicos mais comuns, mas ovinos infectados normalmente não apresentam alterações clínicas perceptíveis, se tornando carreadores assintomáticos e fonte de infecção para carnívoros, incluindo uma grande variedade de hospedeiros definitivos e humanos (Aspinall et al., 2002; Masala et al., 2007; Esteban-Redondo et al., 1999; Esteban-Redondo & Innes, 1998; Halos et al. 2010).

No Brasil, infecções na espécie ovina são descritas nas cinco regiões, com prevalência variando de 18,5% a 51,5% (Pita-Gondim et al., 1999; da Silva et al., 2003; Cavalcante et al., 2004; Figliuolo et al., 2004; Romanelli et al. 2007; Pinheiro Jr. et al., 2009; Soares et al., 2009; Ueno et al., 2009; Moraes et al., 2011). Soropositividades em ovinos e caprinos, com altos ou baixos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, foram registradas em vários países de mundo, e a variabilidade entre os estudos pode ser explicada pela variação na sensibilidade e especificidade entre as técnicas utilizadas (Sroka, 2001; Ghoneim et al., 2010; Shahiduzzaman et al., 2011; Tzanidakis et al., 2012).

As técnicas sorológicas são os principais ensaios utilizados para diagnóstico da toxoplasmose. Contudo, essas técnicas podem falhar na detecção de anticorpos específicos anti-*T. gondii* durante a fase ativa da infecção e em pacientes imunossuprimidos (Lin et al., 2000; Bertozzi et al., 1999; Decoster et al., 1988). Muitos autores descrevem o uso de ensaios sorológicos associados com a reação da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico mais acurado, especialmente em ovinos e caprinos (Ghoneim et al., 2010). Portanto, testes diagnósticos mais sensíveis são necessários.

Relativamente poucos antígenos são alvos da resposta imune. Em camundongos e humanos, alguns antígenos de superfície abundantes e imunodominantes induzem resposta imune humoral (Rachinel et al., 2004; Prince et al., 1990; Boothroyd, 2009). Entre eles, grânulos de proteínas densas (GRA1, GRA4, GRA6, GRA7), antígeno 1 do cisto tecidual (MAG1), e antígeno de superfície de *T. gondii* (SAG1, SAG2) são reconhecidos pelas células B, induzindo a produção de anticorpos específicos em ovinos (Li et al., 2010; Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010, 2011; Tzanidakis et al., 2012).

A biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI) é essencial para a sobrevivência de *T. gondii* (Wichroski e Wardi, 2003). Os quatro antígenos de superfície imunodominantes de taquizoítos de *T. gondii* são ancorados por GPI (Tomavo et al., 1989), e diferentes estágios parasitários são dominados por famílias de proteínas GPI ancoradas subgrupos estágio-específicos (Boothroyd, 2009). Proteínas GPI ancoradas existem em grande proporção na superfície do taquizoíto (Black e Boothroyd, 2000; Lekutis et al., 2001), e são implicadas na ligação à célula e na modulação da resposta imunológica (Dzierszinski et al., 2000; Jacquet et al., 2001; Lekutis et al., 2001, Debierre-Grockiego et al., 2003, 2007, 2010).

O ELISA é um importante teste diagnóstico devido a sua alta especificidade (Malik et al. 1990; Waltner-Toews et al. 1991; Esteban-Redondo e Innes 1998; Esteban-Redondo et al. 1999; Clementino et al. 2007; Shaapan et al. 2008) e sensibilidade, quando comparado ao

ensaio de imunofluorescência (Brasil, 2002). Visto que GPI é reconhecido pelo sistema imunológico, e sua biossíntese é essencial para sobrevivência do *T. gondii*, o presente trabalho objetivou desenvolver um ensaio de ELISA, usando glicoconjugados de *T. gondii* como antígenos, para detecção de anticorpos específicos em amostras séricas de ovinos.

## **Materiais e Métodos**

### *Parasitas*

Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, cepa RH (gentilmente cedida pelo Prof. Luiz Fernando Pita Gondim, Universidade Federal da Bahia), foram usados nesse estudo. Células VERO foram mantidas em meio RPMI (Sigma Aldrich) com 5% de antibiótico (5mg/mL de penicilina, 5mg/mL de estreptomicina, 10mg/mL de neomicina Gibco) e 10% de soro equino (Gibco), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Resumidamente, as células VERO cresceram até formar uma monocamada com 90% de confluência. Então, o meio de cultura foi trocado e os taquizoítos foram adicionados à cultura. Após três dias, os parasitos foram recuperados por lavagem tripla com solução fisiológica estéril e centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos, e a contagem foi realizada usando a câmara de Neubauer. O pellet foi mantido a -20°C até o uso.

Para o antígeno lisado de *T. gondii* (LA), os taquizoítos foram sonicados 5 vezes por 30 segundos no gelo. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio do ácido bicinconinico (Kit Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay, Thermo Scientific).

### *Extração dos Glicoconjugados*

Para obter uma solução enriquecida de glicoconjugados (GlyC) parasitários, uma partição em água-solvente orgânico foi realizada, como descrita por Giraldo et al. (2002). Em resumo, um pellet com 10<sup>10</sup> taquizoítos foi submetido à extração com 10 volumes de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, vol/vol/vol) por 1 hora à temperatura ambiente. Os parasitos foram mantidos no gelo e sonicados 5 vezes, por 30 segundos, com intervalo idêntico. Após centrifugação a 5000 xg por 15 minutos a 10°C, o pellet resultante foi submetido ao mesmo protocolo de extração duas vezes. Uma solução de butanol 9% em água foi acrescentada aos pellets, seguida de três centrifugações como supradescrito. Os sobrenadantes resultantes foram unidos e rotaevaporados a 4°C e 45°C, 85,5kPa (Laborthechnik), e denominado F3.

Essa fração continha GlyC, e a concentração protéica foi determinada como descrito anteriormente. F3 foi estocado à -20°C até o momento do uso no ELISA.

#### *Amostras de soros*

Noventa amostras de soro de ovinos (45 negativas e 45 positivas), como estabelecido por imunofluorescência indireta (IFAT) (Figliuolo et al., 2004), foram usadas para determinar a especificidade e sensibilidade do ensaio de ELISA usando lisado antigênico total (ELISA-LA). Para o ensaio baseado em glicoconjugados (ELISA-GlyC), 75 amostras séricas foram utilizadas: 30 de animais negativos e 45 de animais positivos, como definido por IFAT.

#### *Análises Sorológicas*

O ensaio de ELISA indireto foi utilizado para identificar a presença de IgG específica contra *T. gondii*. LA ou GlyC diluído em tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4.8g/litro;  $\text{NaHCO}_3$ , 1.5g/litro; pH 9.6) foi adicionado aos poços de placas de microtitulação de alta ligação (100  $\mu\text{L}$ /poço) (Nunc). As placas foram incubadas em câmara úmida (usada em todas etapas) a 4°C por 16 horas, e então lavadas 3 vezes em solução tamponada ( $\text{NaCl}$  8.0 g/litro;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/litro;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.2 g/litro;  $\text{KCl}$  0.2 g/litro; pH 7.4) contendo 0,05% de Tween 20 (Tween 20 0,5 mL/litro) (PBS-T). Cem microlitros do reagente de bloqueio, preparado de 5% leite de vaca desnatado em PBS, foram adicionados. A placa foi então incubada por 3 horas a 37°C. Após lavagem como descrito anteriormente, as amostras e os controles foram diluídos em PBS contendo 1% de leite de vaca desnatado (caseína 10 g/litro; PBS-M) e aplicados nos poços em duplicata. Após incubação de 1 hora a 37°C, os poços foram lavados como supramencionado. Foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de imunoglobulina anti-IgG ovina conjugada a peroxidase (Laboratório Bethyl Inc.) diluída em PBS-M, e incubada por 1 hora sob as mesmas condições descritas acima. As placas foram então lavadas como descrito anteriormente. Cem microlitros do substrato o-fenilendiamina (0.1M ácido cítrico, 7.29 mL; 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7.71 mL; pH 5.0; O-fenilendiamina Sigma, 60 mg; 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6L) foram dispensados em cada poço. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  1.5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As placas foram lidas nos comprimentos de onda de 490 e 655 nm (ELISA Multiskan MCC/340, Titertek).

Os antígenos foram diluídos em diferentes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4  $\mu\text{g}$  para LA e 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 10  $\mu\text{g}$  para GlyC. Os soros foram diluídos, de modo seriado, de 1:50 a

1:400. O conjugado, por sua vez, foi diluído 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:30.000, 1:40.000 e 1:50.000. A melhor concentração do antígeno, e a melhor diluição do soro e conjugado foram obtidas pelo método de titulação “checkerboard”, onde o maior valor na correlação entre as densidades ópticas dos positivos/negativos foi usado como referência. Os controles positivos e negativos foram formados pelo pool de 10 amostras positivas e negativas, definidas por IFAT. Os controles e soros testes dos ovinos foram testados em duplicata e a absorvância média foi calculada.

### *Análises Sorológicas*

As amostras foram classificadas em quatro diferentes grupos, com base nos resultados obtidos no ELISA: verdadeiro positivo (positivo no teste de referência IFAT e no ELISA); verdadeiro negativo (negativo no teste de referência e no ELISA); falso positivo (negativo na IFAT e positivo no ELISA); e falso negativo (positivo na IFAT e negativo no ELISA). Com esses resultados, os parâmetros de sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV), e acurácia (Ac) do ELISA para detecção de anticorpos contra *T. gondii* foram determinados usando as fórmulas abaixo, onde VP é verdadeiro positivo, VN é verdadeiro negativo, FP é falso positivo e FN é falso negativo:

$$\text{Sensibilidade} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN}$$

$$\text{Especificidade} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FP}$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FN}$$

$$\text{Acurácia} = \text{VP} + \text{VN} / \text{VP} + \text{VN} + \text{FP} + \text{FN}$$

O software SPSS v. 12.0 foi usado para calcular o índice Kappa. O nível de concordância foi classificado como descrito por Landis e Koch (1977): 0 – nenhuma concordância; 0 a 0,19 – correlação muito baixa; 0,20 a 0,39 – pobre concordância; 0,40 a 0,59 – concordância moderada; 0,60 a 0,79 – correlação substancial; e 0,80 a 1,00 – elevada correlação. A curva ROC (Receiver Operating Characteristics) foi obtida no mesmo software supramencionado.

Para verificar a repetitibilidade e reprodutibilidade, pools de amostras positivas e negativas foram testados em 3 diferentes dias por distintos técnicos em laboratório clínico (reprodutibilidade) e quarenta vezes em um mesmo dia (repetitibilidade). Os resultados desses parâmetros estão expressos em porcentagem (%) de resultados concordantes.

## **Resultados**

### *Parâmetros do ELISA*

As diluições ótimas de trabalho do LA, GlyC e conjugado foram determinadas por ensaios “checkerboard” usando diferentes diluições de antígeno, soro e conjugado. Os números de lavagens também foram avaliados. Os melhores resultados foram obtidos pela lavagem das placas 3 vezes antes da adição dos reagentes.

No ELISA-LA, os melhores resultados, representados pela maior diferença nas densidades ópticas (OD) entre amostras positivas e negativas, foram encontrados com 0,2 µg/poço de LA, diluição sérica 1:400 e diluição do conjugado 1:20.000. Para o ELISA-GlyC, as diluições escolhidas foram 1,0 µg/poço de GlyC, 1:200 para o soro e 1:10.000 para o conjugado.

Ambos ELISAs apresentaram reprodutibilidade de 100% e 66,7% para as amostras positivas e negativas, respectivamente (Tabela 1). No ELISA-LA, as amostras positivas e negativas apresentaram 100% de repetibilidade. No ELISA-GlyC, a repetibilidade para as amostras positivas e negativas foi de 95% e 100%, respectivamente (Tabela 1).

### *Resultados do ELISA*

Noventa amostras foram usadas para padronização do ELISA-LA, sendo 45 positivas e 45 negativas por IFAT realizado previamente (Figura 2). Comparando os resultados do ensaio desenvolvido com o teste de referência (IFAT), dois resultados discordantes foram obtidos: o ELISA-LA apresentou dois resultados falso-positivos (Tabela 2). Baseado nesse resultado, o ELISA-LA demonstrou Se, Sp, Ac, PPV e NPV de 100%, 96%, 92%, 91% e 93%, respectivamente (Tabela 1).

Setenta e cinco amostras de soro de ovinos, 40 positivas e 35 negativas, foram usadas para padronização do ELISA-GlyC (Figura 2). Os resultados das amostras no ELISA e IFAT estão presentes na tabela 2. Trinta resultados discordantes foram encontrados: 2 falso positivos e 28 falso negativos. O ELISA-GlyC demonstrou Se de 30%, Sp de 94%, Ac de 60%, PPV de 86% e NPV de 54% (Tabela 1).

O índice Kappa foi estimado pela análise do grau de concordância entre os resultados obtidos no ELISA e no teste referência, sendo encontrado 0,844 e 0,232 para ELISA-LA e ELISA-GlyC, respectivamente (Tabela 1). O ensaio de ELISA baseado em LA demonstrou

alta concordância com o teste referência. Contudo, uma pobre correlação entre ELISA-GyC e o ensaio de referência foi encontrada.

A curva ROC foi obtida usando o software SPSS v. 12.0 (Figura 1). De acordo com uma orientação arbitrária (baseada na sugestão de Swets, 1988), o valor da área sob a curva ROC (AUC) pode determinar a Ac de um ensaio: menos acurado ( $0,5 < AUC < 0,7$ ), moderadamente acurado ( $0,7 < AUC < 0,9$ ), altamente acurado ( $0,9 < AUC < 1,0$ ) e teste perfeito ( $AUC = 1$ ). A AUC dos dois ensaios padronizados no presente trabalho foi 0,982 para ELISA-LA e 0,698 para ELISA-GlyC, demonstrando a alta Ac no primeiro teste, e a pobre Ac no segundo.

## Discussão

Vários estudos têm sido realizados em busca de técnicas de diagnóstico mais eficazes, incluindo a discriminação entre a infecção aguda e crônica pelo *T. gondii*. Nos seres humanos, ELISA, PCR, imunoblotting, teste de corante Sabin Feldman, imunoensaio enzimático de micropartículas (MEIA), ensaio fluorescente ligado à enzima (ELFA), microarray, citometria de fluxo, e amplificação isotérmica loop-mediada (LAMP) estão sendo avaliados e aprimorados. Antígeno solúvel, frações parasitárias, proteínas recombinantes, amplificação de mais de um gene, e aplicação da bioinformática estão sendo utilizados e comparados em termos de eficácia (Giraldo et al., 2002; Lau e Fong, 2008; Rodrigues et al., 2009; Araújo e Ferreira, 2010; Holec-Gasior et al., 2010; Jalallou et al., 2010; Lau et al., 2010; Mesquita et al., 2010; Udonsom et al., 2010; Khammari et al., 2012; Maksimov et al., 2012; Selseleh et al., 2012a, b; Silva-dos-Santos et al., 2012; Sterkers et al., 2012; Sukuthana et al., 2012).

A identificação precoce e precisa da infecção de animais pelo *T. gondii*, especialmente naqueles amplamente utilizados como alimento humano, é tão importante como o diagnóstico da toxoplasmose em seres humanos. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver uma nova ferramenta de diagnóstico para toxoplasmose utilizando proteínas GPI ancoradas. Glicoconjugados têm sido implicados como importantes moléculas da invasão e estabelecimento de várias infecções por protozoários, com atividades imunoestimulantes e reguladora (Schofield e Hackett, 1993; Tachado et al., 1997; Almeida et al., 2000; Debierre-Grockieo et al., 2003). Em *T. gondii*, a superfície das diferentes fases é dominada por uma família de proteínas ancoradas a GPI (Burg et al., 1988; Kasper, 1989; Tomavo et al., 1989; Manger et al., 1998; Lekutis et al., 2000), e a biossíntese de âncoras de GPI é essencial para a sobrevivência de *T. gondii* (Wichroski e Ward, 2003).

No presente trabalho, dois ensaios imunoenzimáticos foram padronizados. Primeiro, taquizoítos de *T. gondii* foram sonicados, e o antígeno lisado foi usado como antígeno em ELISA-LA. Este ensaio mostrou alta Se (100%), Sp (96%), PPV (91%), PPN (93%), e Ac (92%) (Tabela 1). ELISA-LA é amplamente utilizado para a detecção de anticorpos específicos da infecção natural e experimental em ovelhas (Tenter et al., 1992; Esteban-Redondo e Innes, 1998; Redondo-Esteban et al., 1999; Sroka, 2001; Werre et al., 2002; Sager et al., 2003; Mainar-Jamie e Barberán, 2007; Shaapan et al., 2008; Ghoneim et al., 2010; Li et al., 2010; Katzer et al., 2011; Moraes et al., 2011; Schaefer et al., 2011; Sakata et al., 2012). ELISA com antígenos de taquizoítos já foi utilizado como padrão ouro por alguns grupos de pesquisa (Sager et al., 2003; Sousa et al., 2009).

Em um estudo anterior, 222 amostras de soros de ovinos de cinco fazendas em Nova York foram utilizadas para a validação do ELISA utilizando a cepa RH de *T. gondii*, que mostrou 89% de Se e Sp, tendo o teste de aglutinação como padrão ouro (Werre et al., 2002). Soros de 62 ovinos foram avaliados para IgG específica por ELISA com taquizoítos. IgG anti-*T. gondii* foi encontrada em 98,4% dos animais, um valor maior que o teste do corante de Sabin e Feldman (90,3%) e PCR (67,7%) (Ghoneim et al., 2010), demonstrando a melhoria da Se deste ELISA em comparação com outros testes diagnósticos. Em 2008, autores publicaram um estudo com ELISA indireto para toxoplasmose utilizando taquizoítos, em ovinos no México, e encontraram 92% e 88% para Se e Sp, respectivamente (Caballero-Ortega et al., 2008). Bons resultados foram encontrados para especificidade (85,9%) e sensibilidade (90,1%) do teste ELISA para a IgG anti-*T. gondii* em ovinos abatidos em um matadouro no Cairo, Egito (Shaapan et al., 2008). Os mesmos autores analisaram aglutinação modificada (MAT) e IFAT, e encontraram 96% e 80,4% de Se, 88,9% e 91,4% de Sp, respectivamente. Além disso, um estudo no estado de Santa Catarina, Brasil, procurou anticorpos contra *T. gondii* em 360 ovinos. Em comparação com nossos resultados, o ELISA apresentou parâmetros mais baixos: Se (61%), Sp (82%), PPV (81,7%) e NPV (61,3%) (Sakata et al., 2012). Schaefer et al. (2011) avaliaram um ELISA comercial para seres humanos, modificado pelo uso de conjugados de proteínas não-espécie-específicas (proteína A ou G), para o diagnóstico em seis diferentes espécies de animais. Semelhante aos nossos achados, o teste mostrou 91% de Se e 100% de Sp para a espécie ovina.

Os resultados de Ac no presente trabalho são semelhantes aos encontrados utilizando taquizoítos como antígenos em diferentes ensaios. LAT, IHAT e IFAT para IgG anti-*T. gondii*

em caprinos e ovinos foram realizadas, e a maior Ac diagnóstica foi encontrada por IFAT: 96,9 e 98,5% para caprinos e ovinos, respectivamente (Sanad e Al-Ghabban, 2007).

Apesar destes parâmetros aparentemente apropriados para os testes de ELISA descritos anteriormente, os métodos de produção de taquizoítos e antígenos podem variar significativamente entre laboratórios. Além disso, os antígenos de *T. gondii* obtidos podem ter contaminantes como fragmentos de células hospedeiras ou materiais de meios de cultura.

Os ensaios imunológicos, utilizando GlyC ou glicoinositolfosfolipídeo (GIPL) estão presentes na literatura para os seres humanos (Giraldo et al., 2002; Portela et al., 2004). Alguns grupos de investigação usam apenas uma ou poucas proteínas ancoradas por GPI, purificadas ou como proteínas recombinantes, para ovinos e outras espécies animais (Tenter et al., 1992; Sager et al., 2003; Li et al., 2010; Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010, 2011; Chong et al., 2011; Hosseinejad et al., 2009; Tzanidakis et al., 2012), e os seres humanos (Araújo e Ferreira, 2010; Holec-Gasior et al., 2010; Jalallou et al., 2010; Dai et al., 2012; Maksimov et al., 2012; Selseleh et al., 2012a, b).

No presente estudo, o teste ELISA-GlyC apresentou 30% e 94% de Se e Sp, respectivamente (Tabela 1). Em um estudo mencionado anteriormente para a espécie ovina, três ELISAs diferentes usando SAG1, antígeno tradicional endozoíta (TEA) ou recombinante H11 (H11r) mostraram resultados distintos quando comparados com antígeno somático ELISA como padrão-ouro. ELISA com SAG1 ou TEA exibiram Se de 96% e Sp de 100%. No entanto, Se e Sp de ELISA baseado em H11r corroboram os resultados de ELISA-GlyC: Se de 34% e Sp de 89% (Sager et al., 2003).

O diagnóstico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita foi realizado utilizando ELISA comercial como referência para o teste de ELISA com antígeno solúvel de taquizoítos, rSAG1 e rMIC3. A Se foi elevada para IgG e IgG1 anti-rSAG1 (99,4% e 95,4%, respectivamente), e para IgG, IgG1 e IgG2 anti-rMIC3 (86%, 90,2% e 95,9%, respectivamente). Da mesma forma que nossos achados, no entanto, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-rSAG1 apresentaram baixa Se (13,7%, 12,5% e 16,5%, respectivamente). Uma correlação inversa entre Se e Sp foi encontrada. Sp foi baixa para IgG e IgG1 anti-rSAG1 (16,6% e 23,8%, respectivamente), e baixa para IgG e IgG2 anti-rMIC3 (34,8% e 27,2%, respectivamente). Valores mais elevados, contudo, foram encontrados na Sp para os anticorpos IgG3 anti-rSAG1 (92,8%) e anti-rMIC3 (100%) (Silva et al., 2012).

Ensaio de ELISA utilizando GlyC como antígeno exibiu 60% de Ac, 86% de PPV, e 54% de NPV. ELISA comercial baseado em taquizoítos, modificado pelo uso de proteína A ou G conjugada, apresentou menor PPV (67%) e maior NPV (99%) do que os nossos resultados (Schaefer et al., 2011). Máximo PPV e NPV de 80% foram identificados por Tenter et al. (1992) usando a técnica de ELISA com antígenos recombinantes de *T. gondii*. Em recém-nascidos no Estado de Goiás, Brasil, NPV semelhante ao encontrado neste estudo foi descrito no ELISA para detecção de IgA (51,2%), no MEIA para IgM (55%), no ELFA para IgM (55%) e na IFAT para IgM (53,7%) anti-*T. gondii*. As três primeiras técnicas mostraram PPV máximo (100%), enquanto na IFAT para IgM, PPV foi menor (93,3%). Com base em seus resultados, os autores recomendaram o uso de outras técnicas, não apenas as sorológicas, para o correto diagnóstico de infecção (Rodrigues et al., 2009).

O índice Kappa para o ELISA-GlyC foi 0,232 (intervalo de confiança de 95% = 0,063-0,401), sendo considerada uma correlação fraca com o teste de referência (Landis e Koch, 1977; Khan e Chien, 2001) (Tabela 1). Assim, uma discordância significativa entre IFAT e ELISA-GlyC foi encontrada. Para ELISA-LA, o índice de correlação foi maior (0,844), mostrando forte concordância com o padrão-ouro. Um teste ELISA baseado no antígeno lisado, desenvolvido para a espécie ovina, apresentou índice Kappa (0,84) idêntico ao nosso teste ELISA-LA (Werre et al., 2002). Modificando um ELISA comercial, pelo uso de proteína G conjugada, uma alta concordância foi verificada (índice Kappa de 0,91) com o teste de referência para ovinos. Com o uso da proteína quimérica A/G conjugada no mesmo ensaio comercial, a concordância entre os testes manteve-se elevada, com índice Kappa de 0,81 (Schaefer et al., 2011, 2012). Mainar-Jamie e Barberán (2007) pesquisaram imunoglobulina anti-*T. gondii* de ovelha por ELISA indireto e MAT, e observaram alta concordância, com índice Kappa de 0,93.

Detecção de anticorpos contra *T. gondii* por citometria de fluxo multiplex em seres humanos mostraram correlação muito baixa com ELFA (0,07) para a detecção de anticorpos IgM (Binnicker et al., 2010). Em suínos, citometria de fluxo baseada em beads foi comparada com dois ELISAs comerciais para toxoplasmose, com índices Kappa de 0,802 e 0,932, demonstrando alto grau de concordância entre os testes. A AUC na curva ROC para o ensaio baseado em beads foi 0,911, e para os dois testes comerciais de ELISA foi 0,865 e 0,930 (Bokken et al., 2012). Apesar da diferença entre as espécies animais, este resultado de AUC foi menor do que o encontrado em ELISA-LA (0,982), mas maior do que ELISA-GlyC

(0,698), padronizados no presente trabalho. AUC semelhante ao ELISA-LA foi descrito por ELISA indireto baseado em taquizoítos de *T. gondii* em javalis (0.975) (Opsteegh et al., 2011).

Os anticorpos monoclonais produzidos contra a glicoproteína variante de superfície (VSG) de *Trypanosoma brucei* não se ligam de forma eficiente com o antígeno solúvel em imunoblotting, mas o fazem com o VSG na superfície do parasito, sugerindo mudanças conformacionais. O oposto, isto é, os anticorpos produzidos contra a VSG solúvel mostraram uma ligação inferior com VSG GPI ancorada (Cardoso de Almeida e Turner, 1983; Cardoso de Almeida et al., 1984, Miller et al., 1984). É possível que a extração de GlyC provoque modificações na estrutura conformacional da proteína. Em ovinos, esta mudança pode ser significativa, levando a baixa avidéz de imunoglobulina produzida pela infecção toxoplásmica.

Além disso, diferentes lotes do antígeno obtido podem apresentar diferenças no conteúdo de proteínas GPI ancoradas extraído. Uma vez que há uma família altamente polimórfica de antígenos de superfície GPI ancorados relacionada a SAG-1, distribuídos em grupos de 3 a 13 genes, existe a possibilidade de que diversos genes sejam expressos em diferentes momentos por *T. gondii*, permitindo a variação em antígenos de superfície, para possibilitar o escape imunológico (Pollard et al., 2008). Assim, deve ser dada especial atenção para futuras extrações de proteínas GPI ancoradas. Podem existir eventuais diferenças no perfil de proteína, dependendo da fonte de proliferação de parasitos (*in vivo* ou *in vitro*) e do tempo de infecção dos animais. Uma vez que o parasito está sob constante pressão imunológica, as alterações nas proporções de antígenos de superfície podem ocorrer, determinando que a imunoglobulina produzida num dado momento da infecção não corresponda às proteínas do extrato obtido, gerando resultados sorológicos falso-negativos.

## **Conclusões**

O uso do ELISA baseado em lisado antigênico é de elevado valor diagnóstico em ovinos. No entanto, o ensaio de ELISA baseado em GlyC apresentou alta especificidade, mas baixa sensibilidade, e precisa ser melhorado neste ponto.

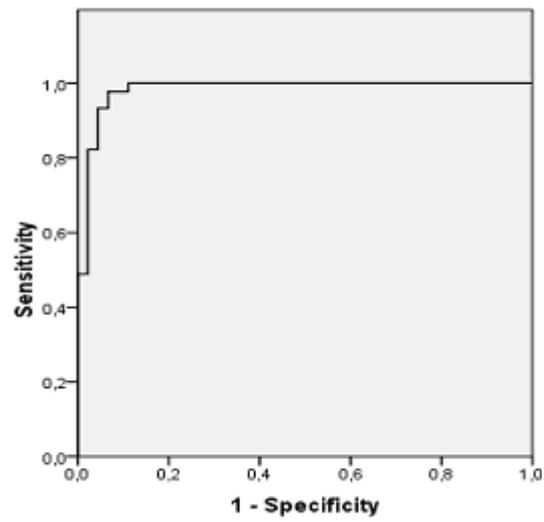
**TABELA 1.** Parâmetros do ensaio imunoenzimático baseado em lisado antigênico e glicoconjugados de taquizoítos de *T. gondii*, em amostras de soros previamente testadas no ensaio de referência (imunofluorescência indireta). As fórmulas usadas para os cálculos são listadas na sessão de Materiais e Métodos.

<b>Parâmetros</b>	<b>ELISA-LA Valor</b>	<b>ELISA-GlyC Valor</b>
Sensibilidade (%)	100	30
Especificidade (%)	96	94
Índice Kappa	0.844	0.232
Acurácia (%)	92	60
PPV (%)	91	86
NPV (%)	93	54
<b>Reprodutibilidade</b>		
Positivo (%)	100	100
Negativo (%)	66.7	66.7
<b>Repetibilidade</b>		
Positivo (%)	100	95
Negativo (%)	100	100

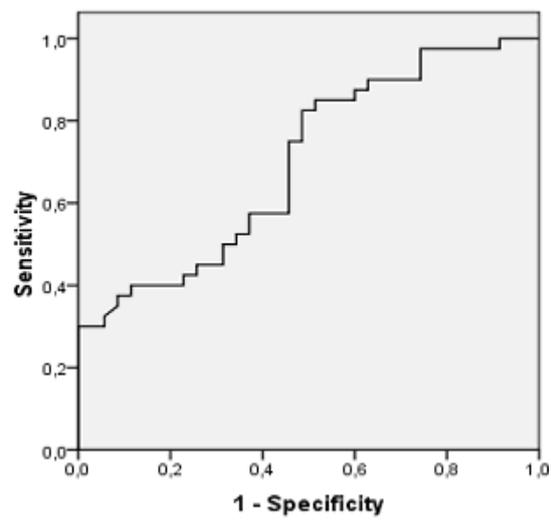
**TABELA 2.** Tabela de contingência dois-por-dois com os resultados de ELISA-LA e ELISA-GlyC, e do teste de referência (imunofluorescência indireta).

		<b>TESTE REFERÊNCIA</b>		
		<b>POSITIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>ELISA-LA</b>	<b>POSITIVO</b>	45	2	47
	<b>NEGATIVO</b>	0	43	43
	<b>TOTAL</b>	45	45	90
<b>ELISA-GlyC</b>	<b>POSITIVO</b>	12	2	14
	<b>NEGATIVO</b>	28	33	61
	<b>TOTAL</b>	40	35	75

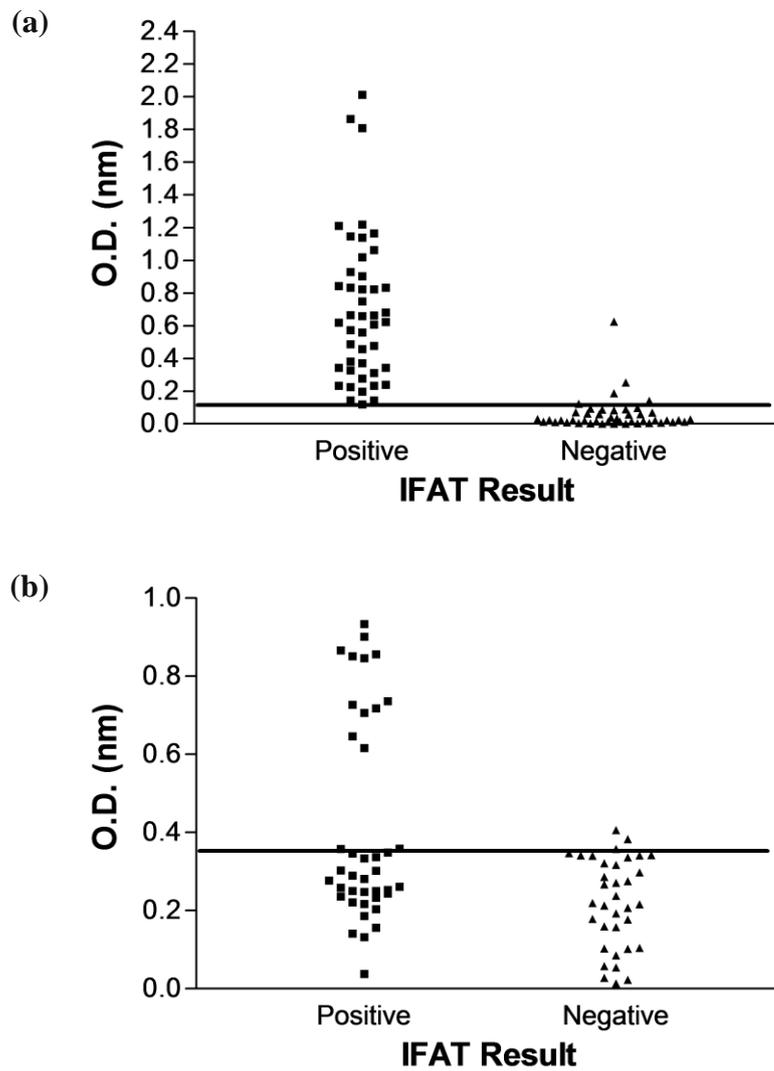
(a)



(b)



**FIGURA 1.** Diagrama da curva ROC dos ensaios de imunodiagnósticos para *T. gondii*, obtido pelo SPSS v. 12.0: (a) ELISA-LA e, (b) ELISA-GlyC.



**FIGURA 2.** Resultados individuais das amostras séricas de ovinos previamente testadas pelo ensaio de imunofluorescência (teste referência), e testado por dois diferentes sistemas imunoenzimáticos, para identificação de IgG específica anti-*T. gondii* (a) ELISA-LA e (b) ELISA-GlyC. A linha contínua representa o cut off de cada teste.

# Infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida do Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e zootécnicos

Patrícia Meira-Santos<sup>a,b,e</sup>, Dan Loureiro<sup>a</sup>, Maria Tereza Guedes<sup>a</sup>, Bruno Lopes Bastos<sup>a</sup>, Antônio Lemos Maia<sup>c</sup>, Alessandro Sá Guimarães<sup>d</sup>, José Tadeu Raynal<sup>a</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>, Maria de Fátima Dias Costa<sup>c</sup>, Ricardo Wagner Portela<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

<sup>b</sup>Curso de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Campus Cariri, Rua Divino Salvador, 284, Rosário, Barbalha, Ceará, Brasil, 63180-000

<sup>c</sup>Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia – ADAB, Av. Adhemar de Barros 967, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil, 40170-100.

<sup>d</sup>EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Gado Leiteiro. Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco - Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 36038-330.

<sup>e</sup>Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

---

## RESUMO

O presente estudo objetivou determinar o status sorológico de ovinos de alto valor genético e comercial do Estado da Bahia para a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e correlacionar o referido status com as práticas de manejo relatadas pelos fazendeiros. As amostras de soro foram testadas por ELISA indireto com objetivo de identificar a presença de anticorpos específicos contra *T. gondii*. Os proprietários responderam um questionário acerca do sistema de criação, e os dados obtidos foram usados para posterior correlação com os resultados da sorologia. Foi encontrada uma soroprevalência real de 97%. Não foram identificadas diferenças significativas da soropositividade entre as diferentes raças e sexo, mas um aumento de significância estatística na soropositividade foi verificado com relação à idade ( $p = 0,047$ ). A existência de correlação entre as práticas de manejo e o status sorológico dos animais foi analisada, e a falta de irrigação de pastagem e de suplementação alimentar balanceada influenciaram positivamente na soropositividade dos animais ( $p = 0,001$  e  $p = 0,000$ , respectivamente). A seleção dos animais por parâmetros zootécnicos e a segregação de animais doentes ou gestantes demonstraram significativa correlação com menor soropositividade ( $p = 0,000$ ). Animais de alto valor genético do Estado da Bahia apresentam elevada prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e vários procedimentos de criação podem ser adotados pelos produtores da ovinocultura com objetivo de reduzir a infecção por este protozoário.

---

Palavras-Chave: Toxoplasmose; *Toxoplasma gondii*; Estado da Bahia; ovinos.

---

## Introdução

O *Toxoplasma gondii* é um importante parasito do filo Apicomplexa que causa perdas reprodutivas em muitas espécies de animais em todo o mundo. O parasito intracelular foi descrito pela primeira vez por Nicole e Manceaux (1908) e Splendore (1908). O ciclo assexual pode ocorrer em humanos e várias espécies de animais de sangue quente, incluindo pequenos ruminantes (Dubey e Beattie, 1988; Waltner-Toews et al., 1991; Esteban-Redondo e Innes, 1998; Esteban-Redondo et al., 1999; Duncanson et al., 2001; Masala et al., 2007). A infecção geralmente ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida de suínos, caprinos ou ovinos (Dubey, 1980, 1986a, 1986b; Dubey e Towle, 1986).

Os primeiros relatos de toxoplasmose em ovinos foram publicados por Hartley et al. (1954) e Hartley e Marshall (1957). A infecção nesses animais causa sérias complicações quando a primoinfecção ocorre no início da gestação. Abortamentos devido à toxoplasmose foram relatados em vários países, assim como a detecção do parasito em amostras de abortos (Plant et al., 1974; Dubey et al., 1990; Steuber et al., 1995; Duncanson et al., 2001; Masala et al., 2003, 2007; Pereira-Bueno et al., 2004; Innes et al., 2007). Em fêmeas gestantes e não gestantes, os sinais clínicos são praticamente inexistentes. No 10º dia após a infecção pode ocorrer febre, com produção detectável de interferon gama (IFN $\gamma$ ) em linfonodos, sendo a infecção considerada controlada quando IFN $\gamma$  não é mais detectado (Dubey e Sharma, 1980; Buxton et al., 1994; Innes et al., 1995). Esses animais não mais apresentam alterações clínicas perceptíveis, se tornando assintomáticos, mas representando uma fonte de infecção para os hospedeiros definitivos e humanos.

O rebanho ovino brasileiro está em franca expansão. Em 2010, a população de ovinos no país era próxima de 17.4 milhões de cabeças, o que demonstra o crescimento de 3,4% e 21,8% quando comparado ao ano anterior e a 1998, respectivamente. O nordeste brasileiro possui a maior população de ovinos do país (56,7%), e a Bahia é o estado mais representativo, com quase 3.1 milhões de animais, 18% do rebanho nacional de ovinos (IBGE, 2010; IBGE Séries Estatísticas, 2012).

A ovinocultura no Estado da Bahia é caracterizada por diferentes tipos de unidades produtivas, que variam de criações familiares a rebanhos rurais organizados em modelos industriais (Araújo Filho, 2006). Muitos rebanhos de ovinos desta região são criados em sistema extensivo, com adoção relativamente baixa de práticas de manejo em saúde, o que contribui para a baixa produtividade presente na ovinocultura (CONAB e Abastecimento, 2006).

As melhores medidas para controlar a infecção por *Toxoplasma* são o diagnóstico precoce e as medidas profiláticas efetivas. Ensaio imunoabsorvente associado à enzima (ELISA) é usado para diagnosticar a infecção parasitária devido a sua alta especificidade (Malik et al., 1990; Waltner-Toews et al., 1991; Esteban-Redondo e Innes, 1998; Esteban-Redondo et al., 1999; Clementino et al., 2007; Shaapan et al., 2008). O presente estudo objetivou determinar o status sorológico de ovinos de alto valor comercial e genético do Estado da Bahia, e estabelecer correlações com as práticas de manejo relatadas pelos criadores.

## **Materiais e Métodos**

### *Amostragem e coleta de dados*

As amostras de soro foram colhidas de animais após inspeção clínica e consentimento dos produtores. Seiscentas e noventa amostras de sangue foram coletadas por meio de tubos de vácuo, agulhas e suportes adequados. Os animais pertenciam a 54 produtores de 37 diferentes municípios do Estado da Bahia (de um total de 417 explorações de ovinos), pertencentes a seis das sete regiões do Estado (Fig. 1). Todos os animais eram registrados na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Os tubos foram etiquetados com o número de registro de cada animal e com a identificação do criador. Todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 *xg* durante 10 minutos e os soros foram distribuídos em alíquotas de 1 mL e, em seguida, mantidos a -20° C até utilização.

Com o apoio da Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos da Bahia (ACCOBA) e da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), os animais foram identificados de acordo com a sua raça, sexo, idade e região de origem no Estado da Bahia. Além disso, um questionário foi respondido por todos os produtores, a fim de determinar as condições de manejo dos animais, seus programas de nutrição, saúde e medidas profiláticas.

De acordo com a ARCO, existem 145.438 mil ovinos da raça definida registrados no Estado. O "n" amostral foi o dobro do mínimo proposto (Callegari-Jacques, 2003), fixado em um máximo de 5% de erro de amostragem e intervalo de confiança de 95%. Todas os ovinos eram das raças Santa Inês e Dorper, as duas mais comuns no Estado da Bahia. A raça Santa Inês é originária da região nordeste do Brasil, resultante de um cruzamento de Somalis deslanados, Morada Nova, Bergamácia, e crioulo (Paiva et al., 2005). A raça Dorper se originou na África do Sul, como resultado do cruzamento entre o Dorset Horn e Cravo Persian (conhecida no Brasil como Somalis), e foi introduzida com sucesso no Brasil em 1998 (Madruca et al., 2006).

### *Análises Sorológicas*

Um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) foi usado para identificar a presença de IgG específica contra *T. gondii*, caracterizado por 96% de especificidade e 100% de sensibilidade. Lisado antigênico de taquizoítos da cepa RH *T. gondii* foi diluído (2 µg/mL) em tampão de carbonato (pH 9,6) e adicionado aos poços de placas de microtitulação de alta ligação (100 µL/poço) (Nunc). As placas foram incubadas a 4°C durante 16 horas em câmara úmida. As placas foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS)

contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As amostras e os controles foram diluídos 1:400 em PBS contendo 1% de leite desnatado (PBS-M) e distribuídos em poços duplicados. Após a incubação de 1 hora a 37°C, a placa foi lavada como descrito anteriormente. Uma solução de anti-IgG de ovelha conjugada com peroxidase (diluída 1:20.000 em PBS-M, Laboratórios Bethyl Inc., EUA) foi dispensada (100 µL/poço) e incubada durante 1 hora nas mesmas condições anteriormente mencionadas. As placas foram novamente lavadas como descrito. Cem microlitros do substrato cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB Radim) foi distribuído por cada poço. As placas foram lidas nos comprimentos de onda 450 e 620 nm (ELISA Multiskan MCC/340, Titertek).

Os controles positivo e negativo consistiam da união de 10 amostras séricas de ovinos positivos ou negativos, conforme definido pela imunofluorescência indireta (IFA). O valor de absorvância média dos controles e soros-teste foi calculado.

#### *Análises estatísticas*

Os resultados dos testes sorológicos, bem como as respostas dos produtores ao questionário, foram analisados usando o software SPSS v.12.0. O teste do "Chi" quadrado de Pearson foi empregado, com nível de significância  $p < 0,05$ , para avaliar se houve associação dos procedimentos de assistência com a presença de anticorpos específicos contra o *T. gondii*. A taxa de prevalência verdadeira foi obtida seguindo metodologia previamente relatada (Noordhuizen et al., 1997).

### **Resultados**

A soropositividade para *T. gondii*, obtida por ELISA indireto, mostraram prevalência aparente de 93,1%. A prevalência real, calculada de acordo com o método proposto por Noordhuizen et al. (1997), foi de 97% (Fig. 2). A pequena diferença estatística entre a prevalência aparente e a prevalência real é devido ao fato de que o teste de ELISA utilizado neste estudo é de alta sensibilidade e especificidade.

Nossa pesquisa não encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa entre o status sorológico dos animais estudados e os parâmetros de raça ou sexo ( $p > 0,05$ ). Vários procedimentos de manejo dos animais foram avaliados. Nenhuma associação significativa foi encontrada com relação ao tipo de alimentação, fonte de alimentação e de água, e acesso de cão ou gato à água ou comida ( $p > 0,05$ ). O tipo e forma de exploração, idade de abate,

inspeção técnica, programas de vacinação, ou adequado manejo pós-natal também não exerceram influência significativa ( $p > 0,05$ ).

Os seguintes procedimentos mostraram correlação estatística positiva com soropositividade ao *T. gondii*: ausência de sistema de irrigação ( $p = 0,000$ ), falta de suplementação alimentar equilibrada ( $p = 0,000$ ), e inexistência de separação rebanho ( $p = 0,031$ ) (Fig. 3). Foram observadas correlações negativas significativas com a soropositividade para *Toxoplasma* quando os proprietários estavam filiados às associações rurais ( $p = 0,000$ ), os animais foram selecionados zootecnicamente antes da compra ( $p = 0,000$ ), e quando os reprodutores eram de uso exclusivo da propriedade rural ( $p = 0,007$ ) (Fig. 3). Apenas as práticas que apresentaram correlação estatisticamente significativa com níveis de soroprevalência anti-*T. gondii* são aqui mostradas. Soropositividade significativamente maior relacionada com a idade ( $p = 0,047$ ) foi também identificada (Fig. 4).

## **Discussão**

O presente estudo foi realizado com um determinado estrato de animais. Eles são de alto valor genético e comercial e recebem investimentos consideráveis dos proprietários com o objetivo de manter a sua saúde e produtividade. Estes animais viajam constantemente para participar de eventos e exposições, aumentando o risco de infecções e a propagação de doenças, o que pode ter contribuído para a alta soropositividade encontrada. Associado com o fato de que muitas doenças têm período de incubação prolongado e fase subclínica, a probabilidade de propagação de tais infecções aumenta significativamente.

Os ovinos utilizados no presente estudo não apresentaram sinais clínicos de qualquer doença infecciosa. A positividade para *T. gondii* encontrada neste trabalho foi extremamente elevada (97%). Considerando o grupo de ovinos analisado, a positividade mostra que, mesmo com o investimento de alto nível, a transmissão de *T. gondii* manteve-se em níveis alarmantes em todas as propriedades analisadas.

A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* é extremamente variável na literatura. Isto pode ser explicado pelos diferentes processos de criação e mesmo diferentes testes sorológicos utilizados, com especificidade e sensibilidade variáveis. Na província de Kars, Turquia, a prevalência em ovinos naturalmente infectados foi de 95,7% pelo ELISA (Mor e Arslan, 2007). No Egito, o mesmo teste de imunodiagnóstico foi usado em pequenos ruminantes e 98,4% das amostras de ovinos foram positivas para anticorpos anti-*Toxoplasma* (Ghoneim et

al., 2010). Um estudo soropidemiológico com diferentes espécies de animais realizado na região de Lublin, Polônia, encontrou 90% de ovinos positivos para o parasito, embora apenas 10 amostras foram analisadas (Sroka et al., 2001).

Altas prevalências de toxoplasmose ovina também foram encontradas em outras regiões, como Itália Central (78%), Nova Iorque (73,8%), Ahvaz (72,6%), França (65,6%), Ontário (57,6%), Escócia (56%), Grécia (48,6%), Cairo (41,7%) e Bangladesh (40%) (Dubey e Welcome, 1988; Waltner-Toews et al., 1991; Dumètre et al., 2006; Gaffuri et al., 2006; Hamidinejat et al., 2008; Shaapan et al., 2008; Katzer et al., 2011; Shahiduzzaman et al., 2011; Tzanidakis et al., 2012). Frequências mais baixas de infecção estavam presentes no Irã (Urmia com 21,1%, e Khoozestan com 13,8%), Países Baixos (26,4%), Nigéria (19,5%), Arábia Saudita (3,3%) e África do Sul (5,6%) (Hoghooghi-Rad e Afraa, 1993; Deconinck et al., 1996; El-Metenawy, 2000; Abu Samra et al., 2007; Hofhuis et al., 2011; Raeghi et al., 2011). No Brasil, a soroprevalência para toxoplasmose foi de 18,5%, 18,7%, 20,7%, 32,9%, 34,7%, 35,3%, 38,2%, 46,8% e 51,5% nos estados da Bahia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Alagoas, São Paulo, Pernambuco, Distrito Federal, Rondônia e Paraná, respectivamente (Pita-Gondim et al., 1999; da Silva et al., 2003; Cavalcante et al., 2004; Figliuolo et al., 2004; Romanelli et al. 2007; Pinheiro Jr. et al., 2009; Soares et al., 2009; Ueno et al., 2009; Moraes et al., 2011).

Nenhuma influência de raça, sexo, vacinação, idade de abate, ou acompanhamento técnico foi encontrada neste estudo. Em Alagoas, 432 ovinos (Santa Inês, Dorper e mestiços) foram avaliados por IFA para a presença de anticorpos específicos contra *T. gondii*, e não foi encontrada diferença estatística entre as diferentes idades (Pinheiro Jr et al., 2009). Um grande estudo no norte da Grécia foi realizado com 1.121, 989 e 1.149 ovinos, caprinos e rebanhos mistos, respectivamente, e o sexo dos animais não teve correlação com a soroprevalência (Tzanidakis et al., 2012).

A idade, por sua vez, foi positivamente correlacionada ( $p = 0,047$ ) (Fig. 4) com a soropositividade para *Toxoplasma* nos ovinos estudados neste trabalho. Estudos mostrando aumento soroprevalência relacionada com a idade indicam que existe uma importante contaminação ambiental com oocistos, e que a maioria das infecções em ovinos são adquiridas em momento pós-natal (Waldeland, 1977; Dubey e Kirkbride, 1989; Lunden et al., 1994; Owen, 1996; Figliuolo et al., 2004; Dubey, 2009; Pinheiro Jr et al., 2009; Halos et al., 2010; Katzer et al., 2011).

Vários procedimentos de manejo dos animais foram analisados neste estudo. Manejo adequado e cuidados pós-natal não têm nenhuma influência sobre a infecção pelo *Toxoplasma*. No entanto, uma significativa menor soropositividade foi encontrada em rebanhos onde fêmeas grávidas ou animais doentes foram separados do rebanho ( $p = 0,000$ ) (Fig. 3). No caso de animais de alto valor, como apresentado neste estudo, espera-se que a tecnificação seja comparativamente maior do que em outras unidades de produção. A separação dos animais doentes e das fêmeas grávidas facilita o manuseio e a assistência às necessidades individuais de cada animal.

A frequência de anticorpos contra *T. gondii* é maior no manejo extensivo, provavelmente devido à maior probabilidade de ingestão de oocistos do parasito eliminados por felinos domésticos ou selvagens (Waltner-Toews et al., 1991; Lopes et al., 2010). Os oocistos são liberados de cinco a quatorze dias após a infecção primária e podem permanecer infectantes por até 18 meses, dependendo das condições de temperatura e umidade (Dubey e Beattie, 1988). A probabilidade de ser soropositivo é maior sob condições intensivas e semi-intensivas de acordo com outros autores (Pinheiro Jr et al., 2009; Tzanidakis et al., 2012).

Água e alimentos contaminados são considerados relevantes vias de infecção. A associação de alta prevalência com água corrente no pasto, pastagem rasteira e suplementação alimentar com forragens já foi relatada (Waltner-Toews et al., 1991; Pinheiro Jr et al., 2009). Nosso estudo não encontrou nenhuma importância na fonte de água (poço, represa, lago, bacia hidrográfica profunda, cisterna ou poço artesiano) ou alimentação (recipientes na unidade, recipientes fora das instalações, beber na nascente da represa ou outros) ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve maior positividade nas fazendas sem irrigação de pastagem ( $p = 0,001$ ), o que pode estar relacionado com a correlação significativa também apresentada com a suplementação exclusiva com sal ( $p = 0,000$ ) e à falta de instalações para estoque de alimentos ( $p = 0,000$ ) (Fig. 3). Supõe-se que as pastagens não irrigadas são comuns em sistemas extensivos, com menor qualidade nutricional, o que obriga os animais a caminhar longas distâncias em busca de comida, aumentando o risco de exposição a agentes infecciosos.

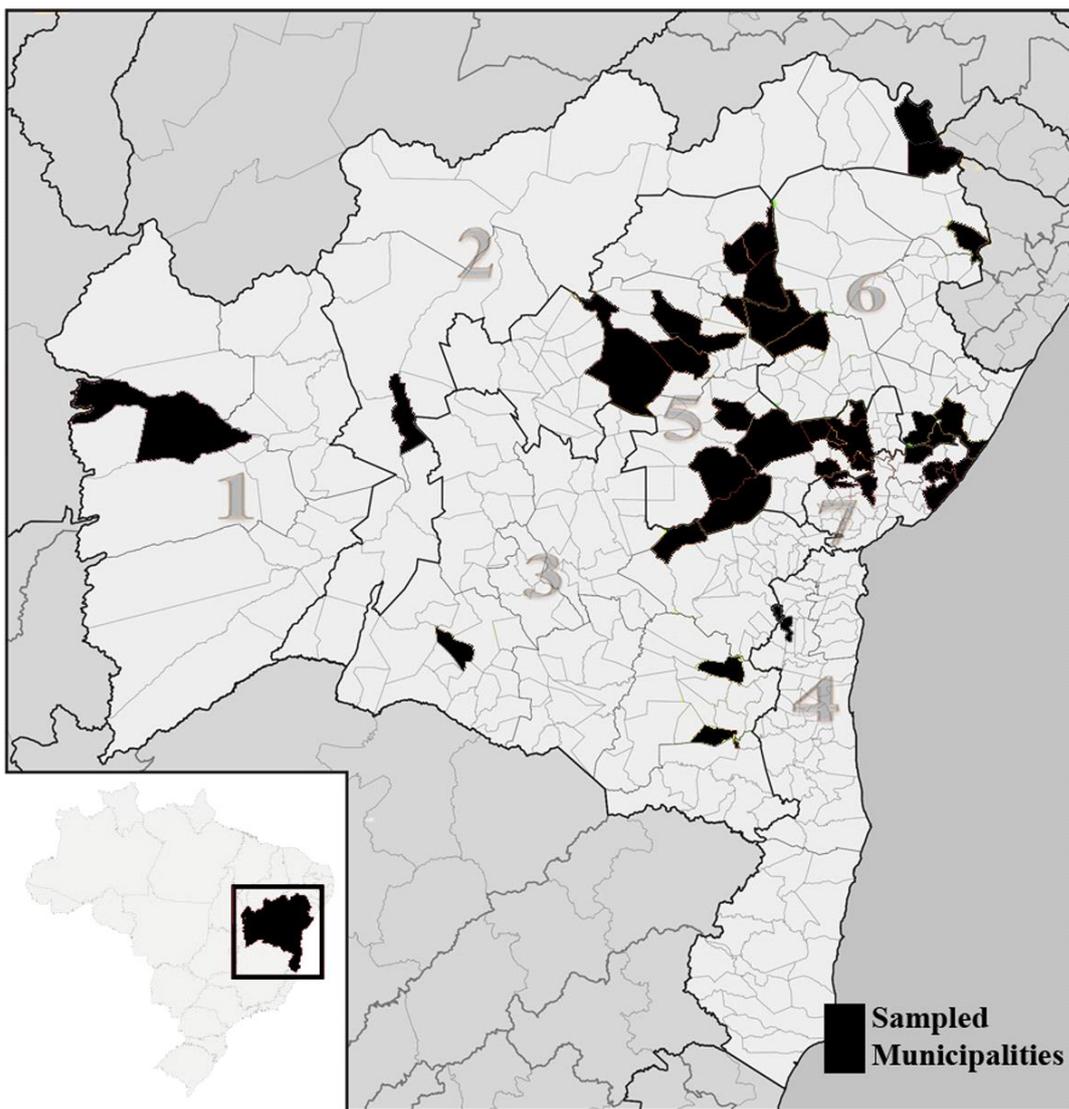
A associação entre a presença de gatos nas ovinoculturas e a exposição de ovinos ao *T. gondii* foi descrita em estudos anteriores (Skjerve et al., 1998). A presença de gatas não castradas influencia positivamente a prevalência do *T. gondii* (Waltner-Toews et al., 1991). Pinheiro Jr. et al. (2009) encontraram aumento de 1,7 vez na probabilidade de transmissão da toxoplasmose em fazendas que relataram a presença de gatos. No presente estudo, a presença de cães ou gatos perto da propriedade não foi estatisticamente associada à infecção pelo *T.*

*gondii* ( $p > 0,05$ ), e esta mesma situação foi observada por outros autores (Figliuolo et al., 2004; Moraes et al., 2011; Tzanidakis et al., 2012).

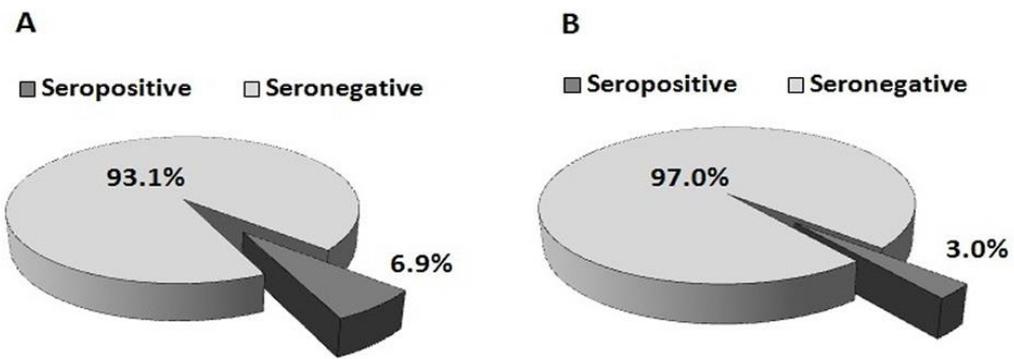
Correlação negativa entre a participação em associações rurais e soropositividade para *T. gondii* foi observada no presente estudo ( $p = 0,000$ ) (Fig. 3). Estes resultados mostram que o acesso à informação e orientação sobre técnicas de gestão, normalmente prestados por estas associações, pode ajudar na redução da infecção pelo parasito no rebanho. Do mesmo modo, a seleção de animais por padrões zootécnicos antes da compra e a presença contínua dos criadores na fazenda diminuiu o risco de infecção com o parasito ( $p = 0,000$  e  $p = 0,007$ , respectivamente) (Fig. 3). Uma vez que a seleção de animais é baseada em características fenotípicas e história reprodutiva, ovelhas com a história do aborto (e possivelmente infectadas com *T. gondii*) podem ser eliminadas, reduzindo a transmissão horizontal no rebanho.

## **Conclusões**

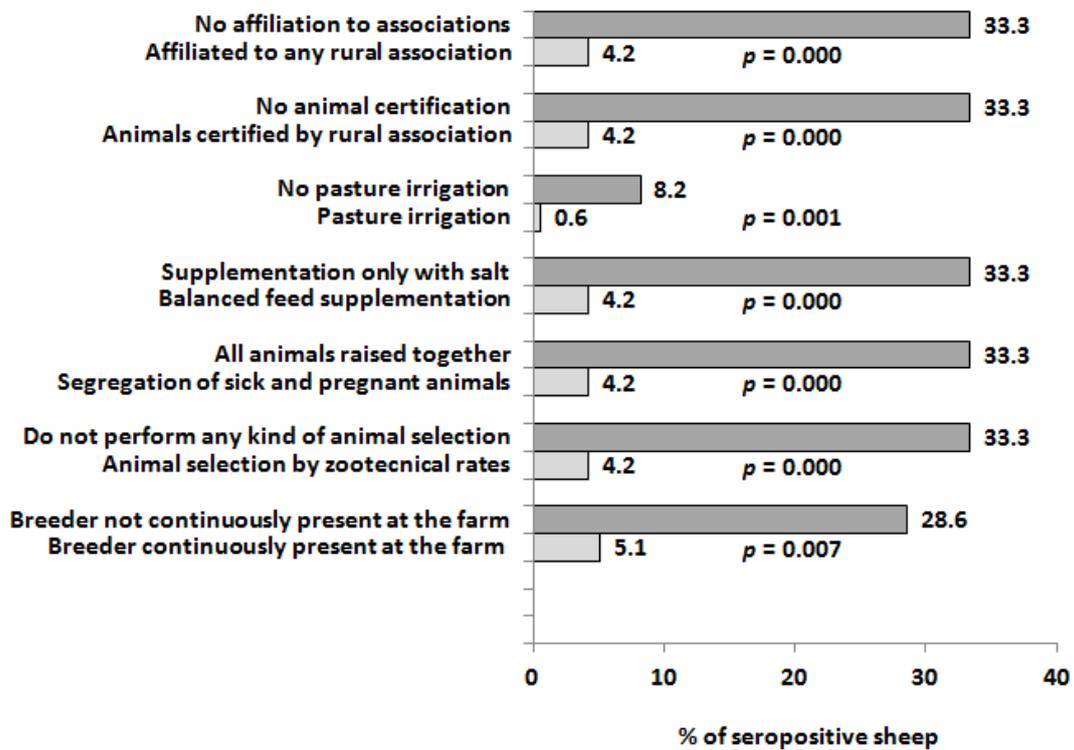
Foi possível concluir que os animais com alto valor genético da Bahia apresentam alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e que nenhuma correlação da infecção com o protozoário e raça, sexo, origem ou o abastecimento de água foi encontrada. O aumento da soroprevalência relacionada à idade indica uma importante contaminação ambiental com oocistos do parasito. Cuidados especiais na maternidade, o isolamento de animais doentes, o fornecimento de alimentos e pasto adequados podem ajudar a diminuir a infecção por *T. gondii*.



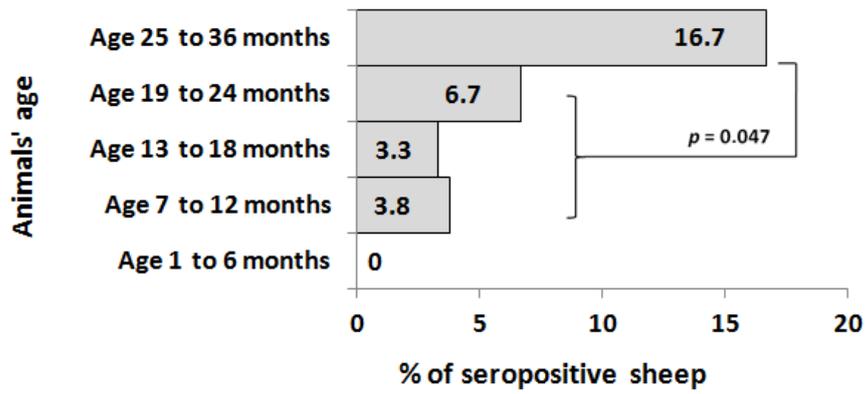
**Fig. 1.** Mapa do Estado da Bahia e suas sub-regiões, conforme proposto pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008). Sub-regiões: 1 – Extremo Oeste 2 – Vale do São Francisco, 3 – Central Sul 4 - Sul, 5 – Central Norte, 6 – Nordeste da Bahia e 7 - metropolitana de Salvador. Em negrito, os 37 municípios avaliados neste estudo.



**Fig. 2.** Soroprevalência (A) aparente e (B) real da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida do Estado da Bahia, Brasil.



**Fig. 3.** Níveis de soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida no Estado da Bahia, e sua relação com o manejo. As análises estatísticas comparando o estado de soropositividade e as ações de manejo foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado de Pearson, com nível de significância de  $p < 0,05$ .



**Fig. 4.** Níveis de soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em ovinos de raça definida do Estado da Bahia e influência da idade. As análises estatísticas comparando o status sorológico e idade foram realizadas por meio do teste do chi-quadrado de Pearson, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

# Cinética da resposta imunológica aguda em ovinos após infecção experimental ou imunização com glicoconjugados derivados de *T. gondii*

Patrícia Meira-Santos<sup>a,b</sup>, Maria Tereza Guedes<sup>a</sup>, Dan Loureiro<sup>a</sup>, Ludmilla Sena<sup>a</sup>, Geraldo Pedral Sampaio<sup>a</sup>, Bruno Lopes Bastos<sup>a</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>, Maria de Fátima Dias Costa<sup>c</sup>, Ricardo Wagner Portela<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

<sup>b</sup> Curso de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Campus Cariri, Rua Divino Salvador, 284, Rosário, Barbalha, Ceará, Brasil, 63180-000

<sup>c</sup> Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

---

## RESUMO

---

A toxoplasmose é uma importante infecção parasitária, principalmente em ovinos, que constituem relevante fonte de infecção humana. Para avaliar a cinética da resposta imunológica aguda, ovinos foram injetados com uma solução salina, infectados com taquizoítos ou imunizados com glicoconjugados (GlyC) derivados de *T. gondii*. Os ovinos infectados desenvolveram anticorpo IgM específico contra antígeno lisado (LA) e GlyC a partir do 4º dia, e IgG anti-GlyC desde o 12º dia pós-infecção (p.i.). A administração de dose única de GlyC induziu a produção de IgM anti-LA a partir do 4º dia, e IgG anti-LA e anti-GlyC partir do dia 12º p.i. A imunização induziu um aumento significativo de células CD8+ no sangue periférico no dia 60 p.i., com uma redução de células MHC de classe II + circulantes, no mesmo momento. Os resultados demonstram a cinética da resposta imune após a infecção aguda, e apontam GlyC como importantes moléculas de reconhecimento parasitário em ovinos na fase aguda da doença.

---

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Glicoconjugados; Ovinos; Resposta Humoral; Resposta Celular.

---

## Introdução

O filo Apicomplexa compreende parasitos intracelulares obrigatórios altamente adaptados que podem invadir e crescer dentro das células hospedeiras (Queiroz, 1998). Um membro deste filo é o *Toxoplasma gondii*, que tem importância médica e veterinária devido a abortamentos, natimortos ou doença congênita gerada no hospedeiro. *T. gondii* é uma das principais causas de abortamento em ovinos e caprinos, principalmente na Nova Zelândia, França, Reino Unido e Noruega (Hartley e Marshall, 1957; Dubey e Welcome, 1988; Dubey et al., 1990; Steuber et al., 1995; Lind e Buxton, 2000; Dumètre et al., 2006). No Brasil, as infecções em ovinos são descritas em todas as cinco regiões, com prevalência variando de

18,5% a 51,5% (da Silva et al., 2003; Cavalcante et al., 2004; Figliuolo et al., 2004; Romanelli et al., 2007; Pinheiro Jr. et al., 2009; Soares et al., 2009; Ueno et al., 2009; Moraes et al., 2011). No estado da Bahia, 18,5% dos ovinos pertencentes a 10 propriedades foram identificados como positivos para o protozoário por aglutinação de látex (Pita Gondim et al., 1999).

Vários estudos na literatura apontam o *T. gondii* como um importante agente etiológico de abortamentos em ovinos (Freyre et al., 1999; Masala et al., 2007). Infecções nessa espécie animal podem acontecer horizontal ou verticalmente (Duncanson et al., 2001; Katzer et al., 2011). Após a infecção, os poucos sinais clínicos observados em ovinos são aumento da taxa respiratória e elevação da temperatura corpórea a partir do terceiro até o oitavo dia após a infecção. Com a cronicidade, o parasito multiplica-se lentamente e forma cistos, preferencialmente localizados no cérebro e coração (Redondo-Esteban et al., 1998, 1999). Os parasitos persistem por toda a vida do animal, contribuindo para os níveis significativos de contaminação em carne e derivados comerciais (Aspinall et al., 2002; Halos et al., 2010). Quando a infecção ocorre durante a gestação, o parasito se espalha para o feto, estando presente em grandes quantidades no fluido amniótico e alantóide 35 dias após a infecção. No feto, níveis elevados de imunoglobulina (Ig) M e IgG são detectados no fluido amniótico, e de IgG no conteúdo estomacal (Marques et al., 2012).

A partir do quarto dia de infecção, o animal apresenta pirexia e, no décimo dia, os parasitos são detectados na corrente sanguínea (Sharma e Dubey, 1980; Reid et al., 1982; Wastling et al., 1993; Esteban-Redondo et al., 1998). A indução precoce de interferon-gama ( $IFN\gamma$ ) pode ser importante para controlar a proliferação dos protozoários e induzir uma resposta imune celular Th1.  $IFN\gamma$  é importante para a inibição da multiplicação intracelular do parasito em fibroblastos e macrófagos de ovinos (Oura et al., 1993; Innes et al., 1995).

Glicosilfosfatidilinositol (GPI) é uma molécula essencial para a sobrevivência de *T. gondii* (Wichroski e Wardi, 2003) e proteínas ancoradas a GPI têm sido implicadas na ligação à célula hospedeira e na modulação da resposta imune (Dzierszynski et al., 2000; Jacquet et al., 2001; Lekutis et al., 2001; Debierre-Grockiego et al., 2003, 2007, 2010). GPI de vários protozoários são reconhecidos por receptores toll-like, induzindo a produção de fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), interleucina 12 (IL-12) e de óxido nítrico por macrófagos (Campos et al., 2001; De Veer et al., 2003; Krishnegowda et al., 2005; Medeiros et al., 2007; Debierre-Grockiego et al., 2007, 2010).

Já que as proteínas GPI ancoradas existem em grande proporção na superfície do *T. gondii* (Black e Boothroyd, 2000; Lekutis et al., 2001) e são importantes para imunomodulação, o objetivo deste trabalho foi analisar a cinética da resposta imune aguda humoral e celular em ovinos após a infecção experimental com taquizoítos ou imunização com proteínas GPI ancoradas derivadas de *T. gondii*.

## **Materiais e Métodos**

### *Animais*

Trinta ovinos, de ambos os sexos, foram selecionados clinicamente e transportados para a fazenda experimental do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO). Nova avaliação clínica foi procedida, e exame parasitológico de fezes e sorologia para detecção de anticorpos específicos contra *T. gondii* por ELISA foram realizados para assegurar a higidez dos animais e ausência de contato prévio com o parasito.

Quatorze animais foram excluídos da experimentação devido à presença de anticorpo IgG contra o parasito (infecção prévia). Nos dezesseis animais restantes, foi realizado o tratamento com anti-helmínticos e exame clínico antes do início do experimento. Ao longo da experimentação, os animais foram mantidos na referida fazenda, em sistema de criação semi-intensivo, com fornecimento diário de sal e forragem, e água *ad libitum*.

Este trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, Campus Cariri.

### *Desenho Experimental*

Os 16 animais que permaneceram no estudo tinham entre quatro e 18 meses. Nas fêmeas, foi realizado exame ultrassonográfico para descartar existência de gestação. Foram formados três grupos: G1: grupo controle salina (n = 4), G2: grupo imunizado (n = 5), G3: grupo infectado (n = 7). G1 recebeu solução salina estéril (1,0 mL/animal). G2 foi injetado com 250 µg de glicoconjugados (GlyC) em 1,5 mg de saponina (1,0 mL/animal). G3 foi infectado com 10<sup>4</sup> taquizoítos (1,0 mL/animal). Todas as administrações foram realizadas por via subcutânea, na região dorsal do pescoço (Li et al., 2010; Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010, 2011).

As amostras de sangue para avaliação da resposta imune humoral foram coletadas da veia jugular, utilizando tubos vacutainer sem anti-coagulante, nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 pós-infecção (p.i.). Nos dias experimentais 0, 7, 15, 30 e 60 p.i. as amostras de sangue, obtidas em tubos vacutainer contendo EDTA, foram utilizadas para avaliar a resposta imune celular. Todas as etapas foram realizadas por médicos veterinários, garantindo acompanhamento clínico e procedimentos adequados.

### *Parasitos*

Taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH (gentilmente cedido pelo Prof Luis Fernando Pita Gondim, Universidade Federal da Bahia), foram mantidos *in vivo* e *in vitro*. Camundongos fêmeas (Swiss) foram inoculados com  $10^6$  taquizoítos em solução salina, por via intraperitoneal. Após cinco a seis dias, os camundongos foram sacrificados e os parasitos foram colhidos no fluido peritoneal com solução salina.

Para a cultura celular, células epiteliais renais VERO foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI (Sigma Aldrich) com 5% de antibióticos (5 mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina, 10 mg/mL de neomicina, Gibco) e 10% de soro equino (Gibco). Resumidamente, as células VERO foram cultivadas até a formação de uma monocamada com 90% de confluência. Em seguida, os taquizoítos obtidos *in vivo* foram adicionados à cultura, após a troca de meio de cultura. A recuperação dos parasitos foi realizada após três dias, por três lavagens com solução fisiológica estéril, e centrifugação a 2500 rpm durante dez minutos. O sedimento contendo os parasitos foi mantido a -20 ° C até sua utilização.

Um sedimento contendo  $10^{10}$  taquizoítos foi sonificado cinco vezes durante 30 segundos, em gelo, com intervalo idêntico, para se obter o lisado antigênico de *T. gondii* (LA). O kit Micro BCN Protein Assay (Thermo Scientific) foi utilizado para a determinação da concentração protéica.

### *Extração dos glicoconjugados*

O procedimento para purificar os glicoconjugados derivados dos taquizoítos de *T. gondii* foi realizado como descrito por Giraldo et al. (2002). Resumidamente, o sedimento contendo os taquizoítos foi submetido à ação de clorofórmio-metanol-água (5:10:4) durante 1 hora à temperatura ambiente. Nesta solução, foi realizada a sonicação dos parasitos com cinco ciclos

de 30 segundos de duração, com intervalo idêntico. O lisado parasitário foi centrifugado a 5000 *xg* durante 15 minutos a 10°C. O procedimento acima descrito foi aplicado duas vezes mais no sedimento resultante. Os sedimentos foram submetidos à partição com 9% de butanol em água, seguido de centrifugação como descrito acima, por três vezes. Os sobrenadantes resultantes foram reunidos e rotaevaporados 4°C e 45°C, 85,5 kPa (Laborthechnik), e denominado F3. Esta fração contém GlyC do parasito, e as concentrações de proteínas foram determinadas como descrito por LA. F3 foi armazenado à -20°C até o momento do uso.

### *IgM ELISA*

Os anticorpos IgM anti-LA e anti-GlyC foram avaliados usando um ensaio imunoabsorvente associado à enzima (ELISA) indireto. O antígeno (10 µg/mL para o LA e 6 µg/mL para GlyC) foi diluído em tampão de carbonato (pH 9,6) e foi adicionado aos poços de placas de microtitulação de alta afinidade (100 µL/poço) (Nunc). As placas foram incubadas a 4°C durante 16 horas em câmara úmida. As placas foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e incubadas durante 2 horas a 37°C com uma solução a 5% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS. Após três lavagens, as amostras e padrões foram diluídos 1:50 ou 1:100 (LA e GlyC, respectivamente) em PBS contendo 1% de albumina sérica de bovino (PBS-BSA), e colocados nos poços em duplicata. Após a incubação de 1 hora a 37°C, os poços foram lavados como descrito anteriormente. Uma solução de anticorpo anti-IgM de ovino conjugado com peroxidase (Laboratórios Bethyl Inc.), diluída 1:10.000 em PBS-BSA, foi adicionada a 100 µL/poço e incubado durante 1 hora nas mesmas condições acima referidas. As placas foram novamente lavadas tal como descrito anteriormente. Cem microlitros de substrato contendo 4 mg/mL de o-fenilenediamina (OPD, Sigma), 0,04% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 100 mM de ácido cítrico, pH 5,0, foram colcados em cada poço. O tempo permitido para o desenvolvimento de cor foi de 10 minutos para LA e 15 minutos para GlyC, no escuro. A reação foi parada por adição de 100 µL de 1,5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e as placas foram lidas a 492 e 655 nm (ELISA Multiskan MCC/340, Titertek).

Os controles positivos e negativos consistiram de pools de 4 amostras positivas e 10 amostras negativas para a presença de IgM específica. Controles e soros de ovinos foram testados em duplicata e o valor médio da absorbância foi calculado.

## *IgG ELISA*

O ensaio de ELISA foi utilizado para detecção de anticorpos IgG específicos anti-LA e anti-GlyC. O antígeno (2 µg/mL para LA e 10 µg/mL para GlyC) foi diluído em tampão de carbonato (pH 9,6) e adicionado aos poços de placas de microtitulação de elevada afinidade (100 µL / pool) (Nunc). O protocolo foi realizado semelhantemente ao IgM-ELISA. No entanto, o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos foi realizado com 5% de caseína, e os soros e anticorpos conjugados foram diluídos em 1% de caseína em PBS (PBS-M).

No ELISA usando LA, as diluições de soros (testes e controles) e anticorpos conjugados foram 1:400 e 1:20.000, respectivamente. Este ensaio mostrou sensibilidade (Se) de 100%, especificidade (Sp) de 96%, acurácia (Ac) de 92%, valor preditivo positivo (PPV) de 91% e valor preditivo negativo (NPV) de 93%.

Para o ELISA-GlyC, amostras e padrões foram diluídos a 1:200 e o anticorpo conjugado foi diluído 1:10000. Os parâmetros do teste foram de 30% de Se, 94% Sp, 60% de Ac, 86% de PPV e 54% de NPV.

Os controles positivos e negativos consistiram de pools de 10 soros de ovinos positivos e negativos para anticorpos IgG específicos, determinado pela reação de imunofluorescência indireta (IFAT). Os controles e soros de ovinos foram testados em duplicata e o valor médio de absorbância foi calculado.

## *Citometria de Fluxo*

A percentagem de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup>, TCR $\gamma$  $\Delta$ <sup>+</sup>, MHC de classe I<sup>+</sup> e MHC de classe II<sup>+</sup> foi avaliada por citometria de fluxo. Três animais de G1, quatro animais do G2 e cinco do G3 foram escolhidos para esta análise. O sangue foi coletado em tubos vacutainer com ácido tetraacético etilenodiamina (EDTA) nos dias 0, 7, 15, 30 e 60 após as injeções. O sangue (100 µL) foi adicionado a 1:50 de IgG1 monoclonal de camundongo (mIgG1) anti-CD4, anti-CD8, anti-CD21 e anti-TcR1 (VMRD Pullman Inc.) (50 µL/tubo), com incubação durante 15 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados durante igual período de tempo no escuro, com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC) (Rockland Immunochemicals Inc.), diluído a 1:100 (50 µL/tubo). O tampão de lise de eritrócitos foi diluído 1:10 (500 µL/tubo) e incubado durante 20 minutos no escuro. Após lavagem com PBS (1 mL/tubo), os tubos foram centrifugados 2200 xg durante

três minutos, os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em 0,9% de cloreto de sódio (500 µL).

Para avaliar as células MHC de classe I e II positivas, foi utilizado um protocolo semelhante. Dois microlitros e meio, por tubo, de anticorpo monoclonal anti-MHC classe II DQ / DR polimórfico de ovino, conjugado com R-ficoeritrina (AbD Serotec), e 2,5 µL/tubo de anticorpo monoclonal anti-MHC classe I ovina conjugado com FITC foram usados (AbD Serotec). Os passos restantes foram idênticos aos descritos acima.

A operação foi realizada no citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson, San José, EUA) utilizando o programa CellQuest (Becton-Dickinson, Canadá). A análise dos dados foi realizada por FlowJo (Árvore Estrela Inc, Califórnia, EUA).

#### *Análises Estatísticas*

Os resultados dos testes sanguíneos foram analisados usando o software SPSS v.12.0. O teste U de Mann Whitney foi empregado, com nível de significância  $p < 0,05$ , para avaliar a associação ou não entre os achados na resposta imune humoral e celular. A correlação de Spearman também foi utilizada para medir a intensidade da relação entre a produção de anticorpos, em intervalos de tempo, nos diferentes grupos.

## **Resultados**

#### *Avaliação do Glicoconjugado Parasitário*

As concentrações de 2,3 mg/mL e 1,8 mg/mL foram encontradas para LA e GlyC, respectivamente. A eficiência da extração de GlyC foi confirmada por Western-blot usando soro de ovinos infectados naturalmente por *T. gondii*. O perfil encontrado corresponde ao esperado para GlyC (dados não inseridos nesse manuscrito). Em seguida, o reconhecimento de LA e GlyC por soros ovinos foi confirmada por dot-blot utilizando pool de soros de animais positivos e negativos para os anticorpos específicos contra *T. gondii* (resultados não inseridos nesse manuscrito).

#### *Resposta Imune Humoral*

A fim de analisar a cinética da resposta imune humoral, foi coletado sangue de todos os 16 animais nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, e 60 p.i. de G1 (grupo salina), G2 (grupo imunizado) e G3 (grupo infectado). A produção de anticorpos IgM e IgG contra LA e GlyC foi avaliada por ELISA.

No quarto dia p.i., houve aumento nos níveis de IgM anti-LA em G2 e G3, quando comparado ao grupo controle. No G3, os níveis de anticorpo permaneceram elevados durante os 60 dias de acompanhamento, mas em G2 os níveis começaram a cair no 25º p.i. (Figura 1A). Um aumento do mesmo isotipo de imunoglobulina contra GlyC foi observado no grupo G3, com pico no 8º dia experimental. Uma diferença nos níveis de IgM anti-GlyC em G3 nos dias 8, 10 e 12 p.i. foi encontrada, com forte correlação (coeficiente de Spearman = 0,486,  $p = 0,000$ ) (Figura 1B).

O aumento de IgG anti-LA começou no dia 12 p.i. em G2, com diferença significativa no dia 12 ( $p = 0,032$ ), 30 ( $p = 0,032$ ) e 60 ( $p = 0,016$ ), em comparação com G1. O aumento de IgG anti-LA em G2 também mostrou significado estatístico quando comparado ao G3 no dia 25 ( $p = 0,018$ ), 30 ( $p = 0,005$ ), 40 ( $p = 0,005$ ), 50 ( $p = 0,030$ ) e 60 p.i. ( $p = 0,018$ ) (Figura 2A).

Dez dias p.i., os níveis de IgG anti-GlyC aumentaram em G2 e G3, atingindo o pico no mesmo dia para G3, e no dia 12 para G2. O aumento em G2 foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle nos dias 12 ( $p = 0,016$ ), 15 ( $p = 0,016$ ), 20 ( $p = 0,016$ ), 40 ( $p = 0,016$ ) e 50 ( $p = 0,032$ ) p.i. O nível de IgG anti-GlyC em G3, quando comparado a G1, foi estatisticamente significativo do 12º p.i. até o final do período experimental (dia 12  $p = 0,006$ , dia 15  $p = 0,006$ , dia 20  $p = 0,006$ , dia 25  $p = 0,024$ , dia 30  $p = 0,024$ , dia 40  $p = 0,006$ , dia 50  $p = 0,024$ , dia 60  $p = 0,012$ ) (Figura 2B).

### *Resposta Imune Celular*

Para avaliar o perfil celular gerado pela infecção com taquizoítos de *T. gondii* ou imunização com GlyC derivados de *T. gondii*, amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 7, 15, 30 e 60 p.i. As células circulantes CD8+ em G2 ( $12,5 \pm 2,5$ ) foram significativamente mais elevadas quando comparadas com o grupo de controle ( $6,3 \pm 0,4$ ) no dia 60 ( $p = 0,034$ ) (Figura 3B, a Tabela 1). Um aumento de células CD8+ em G3 ( $8,4 \pm 1,6$ ) foi encontrado 60 dias p.i., embora sem significância estatística (Figuras 3B, Tabela 1).

Todos os pontos em G2 e G3 apresentaram contagem de células MHC de classe II positivas mais baixas quando comparada com o grupo salina, mas apenas no último dia

analisado foi encontrada diferença estatística entre G1 ( $36,1 \pm 5,9$ ) e G2 ( $21,8 \pm 5,6$ ) ( $p = 0,034$ ) (Fig. 3D, Tabela 1).

Percentagens mais elevadas de alguns tipos de células foram observadas, a saber: CD4<sup>+</sup> e CD21<sup>+</sup> em G2 e G3 nos dias 30 e 60 p.i. (Figura 3, Tabela 1), TCR $\gamma\Delta$ <sup>+</sup> em G2 nos dias 30 e 60, e no G3 no dia 60 (dados não inseridos nesse manuscrito). No entanto, não houve significância estatística para esses dados.

## Discussão

Neste experimento, foram utilizados ovinos sem raça definida em condições semi-intensivas de criação e, portanto, sujeitos a mudanças nos níveis de nutrientes, que podem influenciar a resposta imune. Apesar destes fatos, foram encontradas algumas diferenças na cinética da resposta imunológica desenvolvida pelos ovinos após a imunização ou infecção.

Uma única imunização com GlyC derivado de taquizoítos de *T. gondii* induz resposta imune humoral e celular em ovinos. Os cinco animais injetados com 250  $\mu\text{g}$  de GlyC produziram níveis detectáveis de anticorpos IgM e IgG anti-LA e anti-GlyC (Figuras 1 e 2). No quarto dia depois da imunização, foi verificado um aumento na IgM anti-LA nos animais imunizados (G2) e infectados (G3), diferindo do grupo controle (G1) por quase todo o período experimental (Figura 1A), com diferença estatística no dia 25 entre G1 e G3.

A presença de anticorpos IgM contra antígenos de taquizoítos é sugestiva de infecção recente e é usada em testes de diagnóstico para identificar a toxoplasmose aguda. Alguns estudos presentes na literatura avaliam a presença de anticorpos IgM contra antígeno lisado ou peptídeos recombinantes multiepítopos (rMEP), em seres humanos, sem analisar a cinética devido à dificuldade de determinar o tempo de infecção (Giraldo et al., 2002; Araújo e Ferreira, 2010; Dai et al., 2012).

Até o presente momento, não há relatos na literatura utilizando GlyC como agente imunizante em animais e os resultados da infecção experimental aqui apresentada sugerem GlyC como importante alvo de anticorpos IgM em ovinos. Forte correlação entre os títulos de IgM específica para GlyC (Figura 1B) foi encontrada em G3 quando comparado a G1 na fase aguda da infecção (dias 8, 10 e 12).

Uma proteína chamada SAG1 corresponde à cerca de 5% de todos os antígenos de *T. gondii* (Burg et al., 1988). SAG1 é uma proteína GPI-ancorada, imuno- e estágio-específica,

presente em taquizoítos e ausente na fase de bradizoíto. SAG1 é um dos primeiros antígenos reconhecidos por anticorpos IgM humanos e murinos em infecções recentes, apesar de anticorpos específicos contra SAG1 também serem encontrados na infecção crônica (Decoster et al., 1988; Rachinel et al., 2004). Giraldo et al. (2000) publicaram que o principal alvo de IgM anti-*T. gondii* em humanos são resíduos de carboidratos glicosilinositolfosfolipídeos (GIPL). Estes autores desenvolveram um ELISA para detecção de IgM contra GIPL purificada com 95,5% de especificidade e 81,8% de sensibilidade. Os mesmos autores constataram que os anticorpos IgG são preferencialmente produzidos contra GlyC, sendo excelente ferramenta para a discriminação entre indivíduos infectados e não infectados por *T. gondii*.

Mineo et al. (1980) e Partanen et al. (1984) demonstraram diferenças de reconhecimento por anticorpos IgM e IgG. Na quarta semana após a infecção humana acidental, os principais polipeptídeos reconhecidos por anticorpos IgM apresentavam 35 e 25 kDa. Outras bandas reconhecidas pela IgM no imunoblot possuíam 6, 14, 30, 40 e 50 kDa. Anticorpo IgG, por sua vez, reagiu com vários polipeptídeos com peso molecular variando entre 14 e 150 kDa, e também com um peptídeo com 6 kDa, a partir da quarta semana após a infecção, mantendo-se durante todo o seguimento experimental (45 semanas). As bandas dominantes reconhecidas por IgG apresentaram peso molecular de 30 e 67 kDa.

Embora o anticorpo IgM específico seja o principal marcador sorológico para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, seus níveis podem persistir por vários meses após a infecção (Ferreira e Camargo, 2002). Em animais, existem poucos relatos de avaliação da resposta de IgM durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* em ovinos, ou após a vacinação. Após a imunização de ovinos com DNA codificando antígenos de *T. gondii*, a resposta imune humoral foi avaliada através da produção de IgG (Li et al., 2010; Hiszczyńska-Sawicka et al. 2010, 2011).

A imunização de ovinos com GlyC (G2) induziu a produção de anticorpos IgG contra o LA e GlyC derivados de taquizoítos, estatisticamente significativa a partir do 12º dia após a injeção. Anticorpos IgG anti-GlyC também foram vistos em G3, diferindo de G1 a partir do dia 12 da experimentação (Figura 2A e 2B). Resultados semelhantes, com produção significativa de anticorpos IgG contra taquizoítos, foram observados no dia 14 após a infecção oral dos ovinos com oocistos de *T. gondii* (Esteban-Redondo e Innes, 1998). Uma forte resposta de IgG1 e IgG2 foi relatada a partir da segunda semana após a imunização com plasmídeo codificando antígenos de *T. gondii* em ovinos (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010,

2011). Corroborando nossos resultados, também, os níveis de anticorpos IgG anti-antígeno 1 de matriz (MAG1) permaneceram elevados até o 56º após a injeção de ovinos com plasmídeo codificando MAG1, com ou sem adjuvante (Hiszczyńska-Sawicka et al., 2010). Contudo, Li et al. (2010) não encontraram nenhuma diferença significativa nos níveis de IgG1 e IgG2 contra taquizoítos em ovinos tratados com plasmídeo SAG1 e ROP1.

Uma alta concentração de GlyC utilizada como antígeno no ELISA pode explicar a maior produção de IgG anti-GlyC em G2 comparado a G3 (Figura 2B). Anticorpos IgG anti-GlyC são encontrados em humanos, com o aumento da produção de isotipos do perfil Th1 (IgG1 e IgG3) em comparação com outras subclasses de IgG (Portela et al., 2004). Embora as subclasses de IgG não tenham sido analisadas no presente trabalho, é possível que a maior proporção de IgG produzida pela infecção experimental e após a imunização com GlyC esteja relacionada com um perfil de resposta protetora, assim como em seres humanos.

Em pacientes imunocompetentes, existe um envolvimento dos anticorpos, mas o controle da infecção é mediado pela imunidade celular. Células T CD8+ são as células efetoras, enquanto que as células T CD4+ desempenham um papel crucial na regulação da resposta imune contra o *T. gondii* (Suzuki e Remington, 1988; Denkers e Gazzinelli, 1998; Gazzinelli et al., 1991, 1992). Após a infecção intraperitoneal de camundongos, antígenos circulantes de *T. gondii* podem ser encontrados a partir do segundo dia (Jafar pour Azami et al., 2011). No início da infecção, os componentes de *T. gondii* ativam a secreção de níveis elevados de IL-12 por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Gazzinelli et al., 1993; Gazzinelli et al., 1994; Bliss et al., 1999), com ativação das células NK, secreção de IFN $\gamma$  e diferenciação para o fenótipo protetor Th1, controlando a replicação do parasito (Suzuki et al., 1988; Gazzinelli et al., 1993; Hayashi et al., 1996; Yap e Sher, 1999). Patologia associada com a estimulação Th1 excessiva foi demonstrada em camundongos durante a infecção aguda (Liesenfeld et al., 1996).

Na fase aguda da toxoplasmose, as células T CD4+ se multiplicam de forma menos eficiente que as células T CD8+ (Luft et al., 1984; Sklenar et al., 1986). Células T CD4+ infectadas rapidamente sofrem apoptose por vários meios tais como o bloqueio da função de caspases e por anergia, tornando-se não responsivas à estimulação antigênica, o que favorece uma resposta imunológica inadequada na fase aguda da infecção (Strickland e Saylor, 1977; Luft et al., 1984; Khan et al., 1996; Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001; Payne et al., 2003). É possível que a ausência de alteração na porcentagem de células CD4+ circulantes em G3, no presente estudo, esteja relacionada a este mecanismo inibitório, o qual favorece a

persistência de protozoário, minimizando os sinais clínicos no hospedeiro e garantindo a sobrevivência de ambos.

A presente experimentação revelou, no dia 60 após a injeção de GlyC, um aumento significativo de células T CD8+ no sangue periférico, mas alteração das células MHC de classe I + não foi encontrada (Figura 3B e 3E). Estudos mostram um papel dominante na apresentação direta por células infectadas com *T. gondii* para ativar as células T CD8+ (Dzierszinski et al., 2007; Goldszmid et al., 2009). A ausência de aumento de células MHC de classe I+ circulantes no nosso procedimento de imunização e infecção experimental pode estar relacionada com esse mecanismo de ativação de linfocitária.

O haplótipo MHC é uma variável importante na resolução da toxoplasmose. Em camundongos, o alelo “d” do MHC de classe I, locus L, apresenta de forma eficiente GRA6, epítopo chave na resposta por células T (Suzuki et al., 1991; Brown et al., 1995; Blanchard et al., 2008). Já em humanos, a influência MHC é mais discreta, mas tem sido relatado aumento da susceptibilidade à infecção congênita com haplótipos DQ3 do MHC de classe II. Diferentemente de modelos murinos, genes de MHC de classe II não parecem correlacionar-se com a susceptibilidade à doença em humanos (Mack et al., 1999). Um amplo estudo com animais de raça e sem raça definida, de preferência com a análise do polimorfismo de MHC, poderia responder se essas moléculas de superfície celular também são importantes para os ovinos como para os camundongos e seres humanos.

As células dendríticas ativadas realizam apresentação cruzada do antígeno a células T CD8+ (Pimenta et al., 2008). Sessenta dias após a vacinação, menor porcentagem de células MHC classe II +, estatisticamente significativa, estava presente na circulação dos animais de G2 (Figura 3D). Lüder et al. (1998) demonstraram que, mesmo em macrófagos pré-ativados com IFN $\gamma$ , a síntese de MHC de classe II é inibida por *T. gondii* em células infectadas e células vizinhas não infectadas, independentemente da síntese de IL-10, TGF $\beta$ , óxido nítrico ou prostaglandina E2. Esta inibição tem sido observada em outros tipos de células de camundongos, ratos e humanos (Lüder et al., 2003), incluindo células dendríticas imaturas, o que pode inibir ou retardar a ativação de linfócitos (McKee et al., 2004). Os nossos resultados podem indicar GlyC como moléculas envolvidas na redução da síntese de MHC de classe II na infecção por *T. gondii*, ou apenas a migração de células MHC de classe II+ para os tecidos para realizar apresentação antigênica para células CD4+ e CD8+.

Em camundongos, o desenvolvimento de imunidade humoral protetora do perfil Th1 foi observado após a vacinação com adenovírus que codifica a proteína recombinante circunsporozoíta (CS) de *Plasmodium yoelii* sem a região de ancoragem de GPI. A distribuição intracelular da proteína CS sem GPI foi mais uniforme, com um processamento preferido por proteases citosólicas, indicando que a âncora GPI pode comprometer a resposta imunológica *in vivo* (Bruna-Romero et al., 2004). Uma síntese maior de IgG2 e secreção de IFN $\gamma$  por linfócitos T CD8+, em camundongos imunizados com CS de *P. falciparum* sem ou com GPI parcial, foi descrita por Ophorst et al. (2007). Embora não altere a expressão ou secreção de CS, a deleção parcial ou completa de GPI da proteína CS resulta em uma melhor resposta por células B e T, e altera a distribuição intracelular de CS, com impacto em seu processamento.

Com *Schistosoma mansoni*, a clivagem da âncora GPI foi realizada e os camundongos imunizados com a proteína sem âncora desenvolveram uma resposta imune mista, com aumento de anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgE específicos de 30 dias após a administração. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5 e IL-10 foram produzidos por células esplênicas 7 dias após o segundo reforço. Os camundongos vacinados apresentaram uma proteção parcial ao desafio com cercárias do parasito, associado à doença hepática reduzida (Martins et al., 2012).

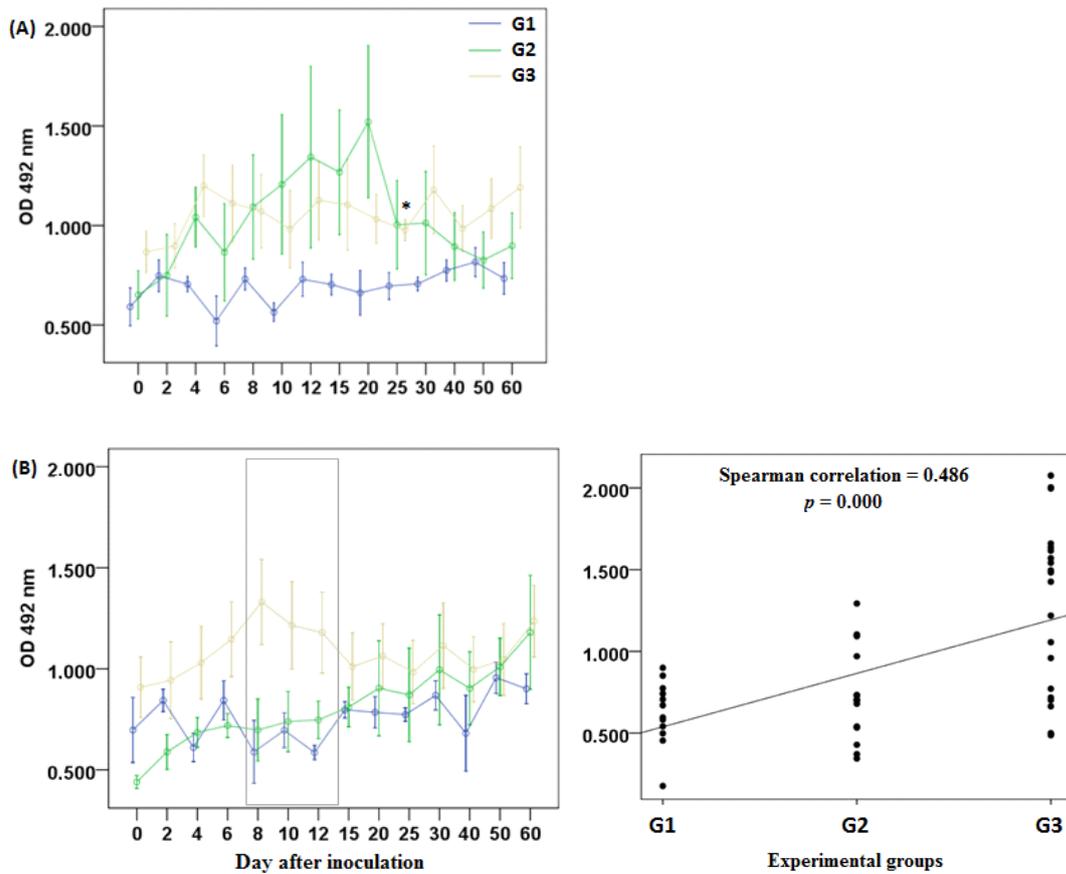
GlyC derivados de taquizoítos de *T. gondii*, em ovinos, podem apresentar as mesmas características de distribuição intracelular, transformação e indução da resposta imune protetora demonstrado por outros autores com outros protozoários (Ralton et al., 2002; Bruna-Romero et al., 2004; Ophorst et al., 2007; Martins et al., 2012). Se esta hipótese for confirmada em experimentos posteriores, GlyC podem ser potenciais candidatos a uma formulação vacinal em ovinos.

## **Conclusões**

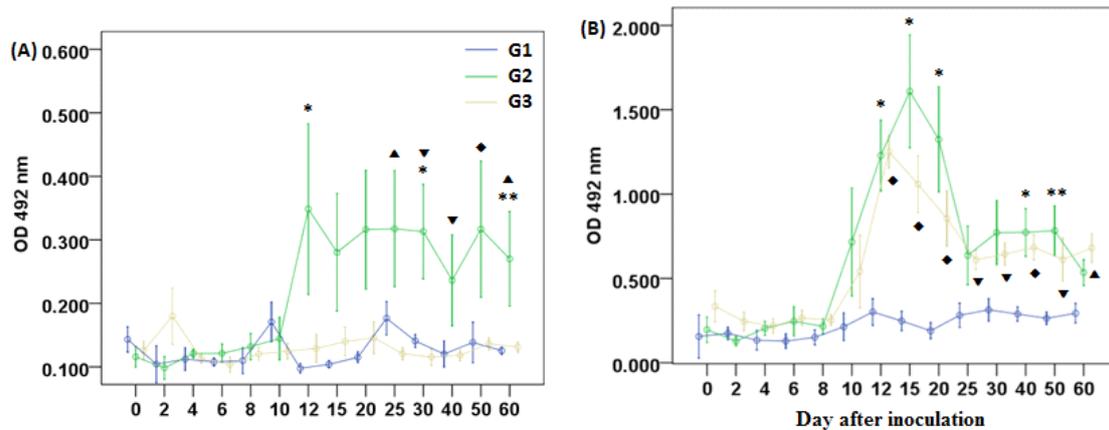
Infecção de ovinos com taquizoítos de *T. gondii* induziu resposta imune humoral específica com produção de IgM e IgG anti-GlyC na infecção aguda e crônica. Simultaneamente, a utilização de dose única de GlyC foi eficaz como um imunógeno, com elevados níveis de produção de IgG e aumento nos números de células T CD8+ no sangue periférico. GlyC derivado de *T. gondii* é imunogênico para ovinos e deve ser melhor avaliado, tanto em ensaios de diagnóstico de toxoplasmose aguda como um componente de uma futura vacina para ovinos.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão (FAPEX) e Banco do Nordeste (BNB). Os autores são profundamente gratos a Francisca Soares (LABIMUNO) pelo suporte técnico.



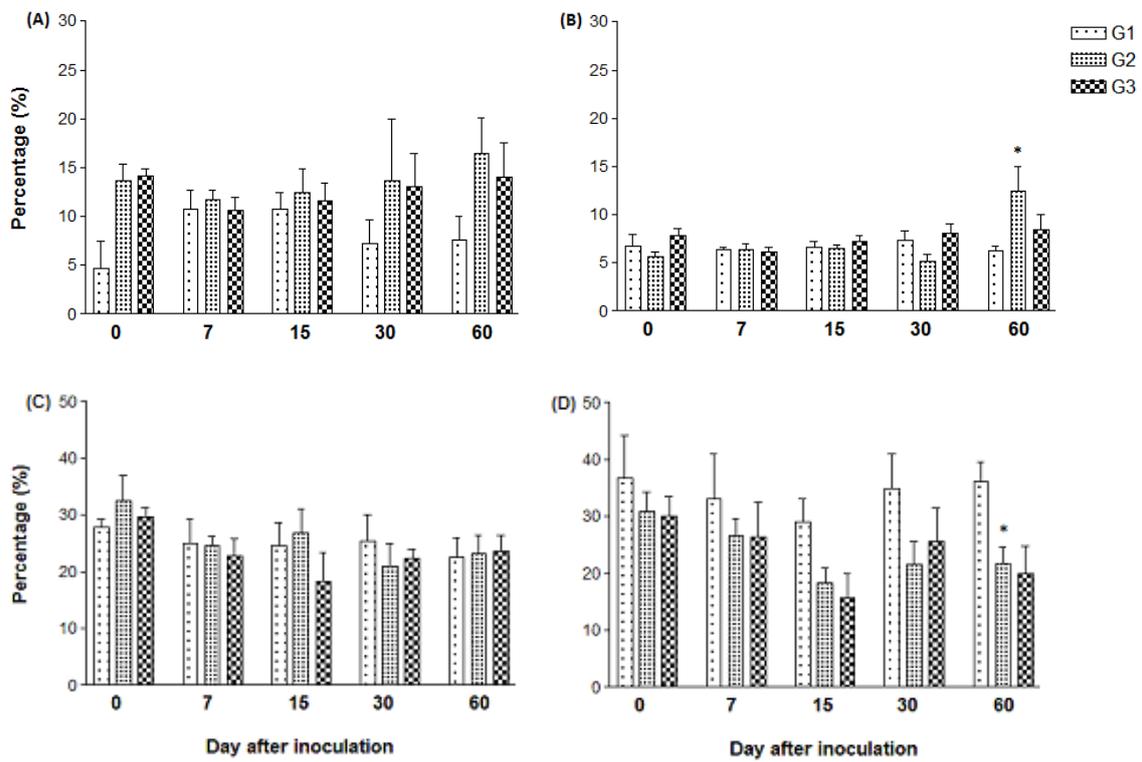
**FIGURA 1.** Níveis de IgM específicos (mediana  $\pm$  erro padrão) contra (A) lisado antigênico, (B) glicoconjugados derivados de *T. gondii*. Os ovinos foram injetados uma única vez, via subcutânea, com solução salina (G1), GlyC + saponina (G2) ou taquizoítos (G3). As diferenças com significância estatística entre os grupos estão marcadas: (A) \*G1 x G3  $p = 0.012$ .



**FIGURA 2.** Níveis de IgG específicos contra (A) lisado antigênico, (b) glicoconjugados derivados de *T. gondii*. Os animais foram injetados uma vez, por via subcutânea, com solução salina (G1), Glyc + saponina (G2) ou taquizoítos (G3). Os valores são representados por mediana  $\pm$  erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão marcadas: (A) \*G1 x G2  $p = 0.032$ , \*\*G1 x G2  $p = 0.016$ , ▲G2 x G3  $p = 0.018$ , ▼G2 x G3  $p = 0.005$ , ♦G2 x G3  $p = 0.030$ ; (B) \*G1 x G2  $p = 0.016$ , \*\*G1 x G2  $p = 0.032$ , ♦G1 x G3  $p = 0.006$ , ▼G1 x G3  $p = 0.024$ , ▲G1 x G3  $p = 0.012$ .

**TABELA 1.** Percentagem de células CD4+, CD8+, MHC de classe I+ e MHC de classe II+ do sangue de ovinos após a administração de solução salina (G1), glicoconjugados em saponina (G2) ou taquizoítos (G3). Os dados estão expressos como mediana  $\pm$  erro padrão.

<b>Marcador</b>		<b>Percentagem de células positivas (%)</b>				
		<b>Dia 0</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 15</b>	<b>Dia 30</b>	<b>Dia 60</b>
<b>CD4</b>	<b>G1</b>	4.7 $\pm$ 2.8	10.7 $\pm$ 2.0	10.7 $\pm$ 1.7	7.2 $\pm$ 2.4	7.6 $\pm$ 2.4
	<b>G2</b>	13.6 $\pm$ 1.7	11.7 $\pm$ 1.0	12.4 $\pm$ 2.5	13.7 $\pm$ 6.3	16.4 $\pm$ 3.7
	<b>G3</b>	14.1 $\pm$ 0.8	10.6 $\pm$ 1.3	11.6 $\pm$ 1.8	13.0 $\pm$ 3.5	14.0 $\pm$ 3.5
<b>CD8</b>	<b>G1</b>	6.7 $\pm$ 1.3	6.4 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 0.4
	<b>G2</b>	5.6 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.8	12.5 $\pm$ 2.5
	<b>G3</b>	7.8 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 0.6	8.1 $\pm$ 0.9	8.4 $\pm$ 1.6
<b>MHC I</b>	<b>G1</b>	27.8 $\pm$ 1.4	24.9 $\pm$ 4.3	24.6 $\pm$ 4.0	25.4 $\pm$ 4.7	22.6 $\pm$ 3.4
	<b>G2</b>	32.4 $\pm$ 4.5	24.5 $\pm$ 1.7	26.9 $\pm$ 4.2	21.0 $\pm$ 4.0	23.1 $\pm$ 3.2
	<b>G3</b>	29.6 $\pm$ 1.7	22.7 $\pm$ 3.1	18.3 $\pm$ 5.1	22.3 $\pm$ 1.6	23.5 $\pm$ 2.9
<b>MHC II</b>	<b>G1</b>	36.8 $\pm$ 7.3	33.0 $\pm$ 7.9	29.1 $\pm$ 3.9	34.8 $\pm$ 6.1	36.1 $\pm$ 3.4
	<b>G2</b>	30.8 $\pm$ 3.5	26.7 $\pm$ 3.0	18.3 $\pm$ 2.7	21.5 $\pm$ 4.0	21.8 $\pm$ 2.8
	<b>G3</b>	30.0 $\pm$ 3.5	26.4 $\pm$ 6.0	15.6 $\pm$ 4.3	25.5 $\pm$ 6.0	20.0 $\pm$ 4.8



**FIGURA 3.** Percentagem de células (A) CD4+, (B) CD8+, (C) MHC de classe I+ e (D) MHC de classe II+ no sangue periférico dos ovinos injetados com solução salina (G1), GlyC + saponina (G2) ou taquizoítos (G3) de *T. gondii*. Os resultados estão representados por mediana  $\pm$  erro padrão. \* $p = 0.034$ .

## CONCLUSÕES FINAIS

- Glicoconjugados de *T. gondii* induzem resposta imunológica quando inoculados em ovinos, com produção de IgG e IgM específica.
- Ensaio de ELISA utilizando glicoconjugados de *T. gondii* apresenta alta especificidade, mas deve ainda ser aprimorado com relação a sua sensibilidade.
- Animais na fase aguda da toxoplasmose apresentam alta reatividade de IgG e IgM específicas a glicoconjugados de *T. gondii*, podendo ser esses uma ferramenta importante para o diagnóstico nessa fase.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, H., IMMING, I., GOMEZ, C. DA C., STEINBERG, W. Research note: effect of increasing dietary concentrate levels on microbial biotin metabolism in the artificial rumen simulation system (RUSITEC). **Arch. Tierernähr.** 55: 371-376, 2001.
- ABU SAMRA, N., McCRINDLE, C.M.E., PENZHORN, B.L., CENCI-GOGA, B. Seroprevalence of toxolasmosis in sheep in South Africa. **J. S. Afr. Vet. Assoc.** 78: 116–120, 2007.
- AJZENBERG, D., BANULS, A.L., SU, C., DUMETRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDÉN, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.** 34(10): 1185-1196, 2004.
- ALMEIDA, I.C., CAMARGO, M.M., PROCOPIO, D.O., SILVA, L.S., MEHLERT, A., TRAVASSOS, L.R., GAZZINELLI, R.T., FERGUSON, M.A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.**, 19(7): 1476-1485, 2000.
- APPELBERG R., CASTRO A. G., PEDROSA J., MINOPRIO P. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. **Immunology** 82:361–364, 1994.
- ARAÚJO FILHO, J.A. Aspectos Zooecológicos e Agropecuários do Caprino e do Ovino nas Regiões Semi-áridas. Sobral: **Embrapa Caprinos Documento** 61: 4–28, 2006.
- ARAUJO, F.G., REMINGTON, J.S. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.** 5: 647–651, 1974.
- ARAÚJO, P.R.B., FERREIRA, A.W. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 52: 63-68, 2010.
- ASPINALL, T.V., MARLEE, D., HYDE, J.E., SIMS, P.F.G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? **Int. J. Parasitol.** 32: 1193–1199, 2002.
- BERTOZZI, L.C., SUZUKI, L.A., ROSSI, C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 41, 175-177, 1999.
- BINNICKER, M.J., JESPERSEN, D.J., HARRING, J.A. Multiplex detection of IgM and IgG class antibodies to *Toxoplasma gondii*, rubella virus, and cytomegalovirus using a novel multiplex flow immunoassay. **Clin. Vaccine Immunol.** 17(11): 1734-1738, 2010.
- BLACK, M.W., BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64, 607–623, 2000.
- BLANCHARD, N., GONZALEZ, F., SCHAEFFER, M., JONCKER, N.T., CHENG, T., SHASTRI, A.J., ROBEY, E.A., SHASTRI, N. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. **Nat. Immunol.** 9: 937–944, 2008.
- BLEWETT, D.A., BRYSON, C.E., MILLER, J.K. Studies of antibody titres in experimentally induced ovine toxoplasmosis. **Res. Vet. Sci.** 34, 163-166, 1983.

- BLEWETT, D.A., TREES, A.J. The epidemiology of ovine toxoplasmosis with especial respect to control. **Br. Vet. J.** 143, 128–135, 1987.
- BLEWETT, D.A., WATSON, W.A. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. II. Possible sources of infection in outbreaks of clinical disease. **Br. Vet. J.** 139, 546–55, 1983.
- BLISS, S.K., ZHANG, Y., DENKERS, E.Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN- $\gamma$ -independent IL-12. **J. Immunol.** 163: 2081–2088, 1999.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu. Rev. Immunol.** 15: 749, 1997.
- BOGDAN, C., NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. **Ann. NY Acad. Sci.** 685: 713–739, 1993.
- BOKKEN, G.C., BERGWERFF, A.A., VAN KNAPEN, F. A novel bead-based assay to detect specific antibody responses against *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* simultaneously in sera of experimentally infected swine. **BMC Vet. Res.** 8:36, 2012.
- BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. **Int. J. Parasitol.** 39: 935–946, 2009.
- BORGES, I, SILVA, A.G.M., ORZIL, R. Caprinovinocultura: Organização da Cadeia Produtiva. In: 3º Encontro de Caprino-Ovinocultores de Corte da Bahia, 27 a 29 de maio, Salvador, BA, Brasil. *Anais*, 16-39, 2003.
- BROWN, C.R., HUNTER, C.A., ESTES, R.G., BECKMANN, E., FORMAN, J., DAVID, C., REMINGTON, J.S., McLEOD, R. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. **Immunology** 85:419–428, 1995.
- BRUNA-ROMERO, O., ROCHA, C.D., TSUJI, M., GAZZINELLI, R.T. Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium* lacking the GPI-anchoring motif. **Vaccine** 22: 3575–3584, 2004.
- BURG, J.L., PERELMAN, D., KASPER, L.H., WARE, P.L., BOOTHROYD, J.C., Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 141, 3584–3591, 1988.
- BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Vet. Res.** 29: 289-310, 1998.
- BUXTON, D., BLEWETT, D.A., TREES, A.J., MCCOLGAN, C., FINLAYSON, J. Further studies in the use of monensin in the control of experimental ovine toxoplasmosis. **J. Comp. Pathol.** 98: 225–236, 1988.
- BUXTON, D., FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. **J. Comp. Pathol.** 96: 319-333, 1986.
- BUXTON, D., INNES, E.A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology** 110: 11–16, 1995.
- BUXTON, D., MALEY, S.W., WRIGHT, S.E., RODGER, S., BARTLEY, P., INNES, E.A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: new aspects of an old story. **Vet. Parasitol.** 149: 25–28, 2007.

- BUXTON, D., THOMSON, K.M., MALEY, S. Treatment of ovine toxoplasmosis with a combination of sulphamezathine and pyrimethamine. **Vet. Rec.** 132: 409–411, 1993.
- BUXTON, D., THOMSON, K.M., MALEY, S., WASTLING, J.M., INNES, E.A., PANTON, W.R.M., NICOLL, S. Primary and secondary responses of the ovine lymph node to *Toxoplasma gondii*: cell output in efferent lymph and parasite detection. **J. Comp. Pathol.** 111: 231–241, 1994.
- BUXTON, D., THOMSON, K. M., MALEY, S., WRIGHT, S. AND BOS, H. J. Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. **Vet. Rec.** 133: 310–312, 1993.
- CABALLERO-ORTEGA, H., QUIROZ-ROMERO, H., OLAZARÁN-JENKINS, S., CORREA, D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. **Parasitology** 135: 897-902, 2008.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: ArtMed, 2003. 264p.
- CAMPOS, M.A., ALMEIDA, I.C., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., VALENTE, E.P., PROCOPIO, D.O., TRAVASSOS, L.R., SMITH, J. A., GOLENBOCK, D.T., GAZZINELLI, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.** 167: 416–423, 2001.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M.L., TURNER, M.J. The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. **Nature** 302(5906): 349-352, 1983.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M.L., ALLAN, L.M., TURNER, M.J. Purification and properties of the membrane form of variant surface glycoproteins (VSGs) from *Trypanosoma brucei*. **J. Protozool.** 31(1): 43-60, 1984.
- CAVALCANTE, G.T., AGUIAR, D.M., CHIEBAO, D.P., MEIRELES, L.R., ANDRADE, H.F., CAMARGO, L.M.A., LABRUNA, M.B., RUIZ, V.L.A., GENNARI, S.M., 2004. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em humanos e animais domésticos da zona Monte Negro, Rondônia. Thirteenth Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ouro Preto, Minas Gerais, vol. 13 (Suplemento), Brasil, 20-24 de setembro de 2006, Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 217.
- CAVALCANTI, G., SILVA, R.C. Aspectos da caprino-ovinocultura na região nordeste: tecnologia, produção e comercialização. Recife: SUDENE/DPS/ AAB, p.36, 1988.
- CHAO, C.C., GEKKER, G., HU, S., PETERSON, P.K. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. **J. Immunol.** 152:1246–1252, 1994.
- CHO, D.Y., NAM, W. A Case of Ocular Toxoplasmosis Imaged with Spectral Domain Optical Coherence Tomography. **Korean J. Ophthalmol.** 26: 58-60, 2012.
- CHONG, C.K., JEONG, W., KIM, H.Y., AN, D.J., JEOUNG, H.Y., RYU, J.E., KO, A.R., KIM, Y.J., HONG, S.J., YANG, Z., NAM, H.W. Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for toxoplasmosis of cats using recombinant SAG1 antigen. **Korean J. Parasitol.** 49(3): 207-212, 2011.
- CLEMENTINO, M.M., SOUZA, M.F., ANDRADE NETO, V.F. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. **Vet. Parasitol.** 146: 199–203, 2007.

COELHO, R. A. de S. Qualidade e negócio da pele caprina/ovina. In: ENCONTRO DO AGRONEGÓCIO DA CAPRINO-OVINOCULTURA: I PÓLO JUAZEIRO-PETROLINA, 1999, Petrolina, PE. Anais... Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido : Embrapa Caprinos, 1999. p. 108-129.

COHEN, S.N. Toxoplasmosis in patients receiving immunosuppressive therapy. **JAMA** 211: 657-660, 1970.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) 2006. Caprinocultura na Bahia. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acessado em: 12/10/2012.

Da SILVA, A.V., CUNHA, E.L.P., MEIRELES, L.R., GOTTSCHALK, S., MOTA, R.A., LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria 33, 115–119, 2003.

DAI, J., JIANG, M., WANG, Y., QU, L., GONG, R., SI, J. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Vaccine Immunol.** 19: 338-342, 2012.

DÄUBENER, W., REMSCHEID, C., NOCKEMANN, S., PILZ, K., SEGHROUCHNI, S., MACKENZIE, C., HADDING, U. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Eur. J. Immunol.** 26: 487–492, 1996.

De MOURA HUTCHISON,, L., BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., WADA, M. Y., JONES, J. L., TUBOI, S. H., CARMO, E. H., RAMALHO, W. M., CAMARGO, N. J., TREVISAN, R., GRACIA, R. M. T., DA SILVA, A. J., MOURA, I., DUBEY, J. P., GARRETT, D. O. Waterborne outbreak of toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emer. Infect. Dis.** 12: 326-329, 2006.

De VEER, M.J., CURTIS, J.M., BALDWIN, T.M., DIDONATO, J.A., SEXTON, A., MCCONVILLE, M.J., HANDMAN, E., SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. **Eur. J. Immunol.** 33: 2822–2831, 2003.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., AZZOUZ, N., SCHMIDT, J., DUBREMETZ, J.F., GEYER, H., GEYER, R., WEINGART, R., SCHMIDT, R.R., SCHWARZ, R.T. Roles of Glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii* – Induction of tumor necrosis factor-production in macrophages. **J. Biol. Chem.** 278: 32987-32993, 2003.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., CAMPOS, M.A., AZZOUZ, N., SCHMIDT, J., BIEKER, U., RESENDE, M.G., MANSUR, D.S., WEINGART, R., SCHMIDT, R.R., GOLENBOCK, D.T., GAZZINELLI, R.T., SCHWARZ, R.T. Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 179: 1129-1137, 2007a.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., RABI, K., SCHMIDT, J., GEYER, H., GEYER, R., SCHWARZ, R.T. Fatty acids isolated from *Toxoplasma gondii* reduce glycosylphosphatidylinositol-induced tumor necrosis factor alpha production through inhibition of the NF $\kappa$ B signaling pathway. **Infec. Immun.** 75(6): 2886-2893, 2007b.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., MOLITOR, N., SCHWARZ, R.T., LÜDER, C.G.K. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols up-regulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine Macrophages **Innate Immunity** 15: 25-32, 2009.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F., NIEHUS, S., CODDEVILLE, B., ELASS, E., POIRIER, F., WEINGART, R., SCHMIDT, R.R., MAZURIER, J.I., GUÉRARDEL, Y., SCHWARZ, R.T.

- Binding of *Toxoplasma gondii* Glycosylphosphatidylinositols to Galectin-3 Is Required for Their Recognition by Macrophages. **J. Biological Chemistry** 285: 32744-32750, 2010.
- DECONINCK, P., PANGUI, L.J., AKAKPO, J., GARROUSTE, A., OUATTARA, L., ROGER, F., TIBAYRENC, R., DORCHIES, P. Prévalence de la toxoplasmose chez les petits ruminants en Afrique tropicale: résultats d'une enquête séro-épidémiologique sur 1042 animaux. **Rev. Med. Vet.-Toulouse** 147, 377-378, 1996.
- DECOSTER, A., DARCY, F., CAPRON, A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. **Clin. Exp. Immunol.** 73: 376-82, 1988b.
- DECOSTER, A., DARCY, F., CAPRON, A., CAPRON, A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. **Lancet** 2, 1104-1107, 1988a.
- DENKERS, E.Y., GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 569-588, 1998.
- DESMONTS, G., COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. **N. Engl. J. Med.** 290: 1110-1116, 1974b.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis and other tissue cyst-forming coccidian of a man and animals. In: Kreier J. (Ed.), Parasitic Protozoa, vol. 3, Academic Press, New York. 1977.
- DUBEY, J.P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 177: 1203-1207, 1980.
- DUBEY, J.P. Experimental toxoplasmosis in sheep fed with *Toxoplasma gondii* cysts, Int. Goat Sheep Res. 2, 93-104, 1984.
- DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Vet. Parasitol.** 18: 181-223, 1986a.
- DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in cattle. **Vet. Parasitol.** 22: 177-202, 1986b.
- DUBEY, J.P. 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: 215-219, 2001.
- DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.** 39: 877-882, 2009.
- DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Boca Raton: FL, pp.1-220, 1988.
- DUBEY, J.P., CHOONDHARY, S., KWOK, O.C., FERREIRA, L.R., OLIVEIRA, S., VERMA, S.K., MARKS, D.R., PEDERSEN, K., MICKLEY, R.M., RANDALL, A.R., ARNONE, D., SU, C. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from mute swan (*Cygnus olor*) from the USA. **Vet. Parasitol.** In press, 2013.
- DUBEY, J.P., EMONT, J.P., DESMONTS, G., ANDERSON, W.R. Serodiagnosis of postnatally and prenatally induced toxoplasmosis in sheep. **Am. J. Vet. Res** 48: 1239-1243, 1987.
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., BLACKSTON, C.R., LEHMANN, T., GENNARI, S. M., RAGOZO, A.M.A., NISHI, S.M., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., HILL, D.E., THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **Int. J. Parasitol.**, 32:99-105, 2002.

- DUBEY, J.P., KIRKBRIDE, C.A. Enzootic toxoplasmosis in sheep in North-Central United States. **J. Parasitol.** 75: 673-676, 1989.
- DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., ASHFORD, D.A., THULLIEZ, P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. **J. Parasitol.** 82: 438-443. 1996.
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.** 56: 447-456, 1970a.
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **J. Exp. Med.** 132: 636-662, 1970b.
- DUBEY, J.P., MILLER, S., POWELL, E.C., ANDERSON, W.R. Epizootologic investigations in sheep farm with *T. gondii*-induced abortion. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 188: 155, 1986.
- DUBEY, J.P., SHARMA, S.P. Parasitaemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J. Parasitol.** 66: 111-114, 1980.
- DUBEY, J.P., SONN, R.J., HEDSTROM, O., SNYDER, S.P., LASSEN, E.D. Serologic and histologic diagnosis of toxoplasmic abortions in sheep in Oregon. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 196: 291-294, 1990.
- DUBEY, J.P., SUNDAR, N., HILL, D., VELMURUGAN, G.V., BANDINI, L.A., KWOK, O.C.H., MAJUMDAR, D., SU, C. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. **Int. J. Parasitol.** 38: 999-1006, 2008.
- DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., WEIGEL, R.M., ANDREW, D.C., LIND, P., POWELL, E.C. Sensitivity and specificity of various serological tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. **Am. J. Vet. Res.** 56: 1030-1036, 1995.
- DUBEY, J.P., TOWLE, A. 1986. *Toxoplasmosis* in sheep a review and annotated bibliography. Miscellaneous Publications No.10 of the Commonwealth Institute of Parasitology.
- DUBEY, J.P., WELCOME, F.L. *Toxoplasma gondii* induced abortion in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 193: 697-700, 1988.
- DUMÈTRE, A., AJZENBERG, D., ROZETTE, L., MERCIER, A., DARDE, M.L., *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. **Vet. Parasitol.** 142: 376-379, 2006.
- DUNCANSON, P., TERRY, R.S., SMITH, J.E., HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. **Int. J. Parasitol.** 31, 1699-1703, 2001.
- DZIERSZINSKI, F., MORTUAIRE, M., CESBRON-DELAUW, M.F., TOMAVO, S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. **Mol. Microbiol.** 37: 574-582, 2000.
- DZIERSZINSKI, F., PEPPER, M., STUMHOFER, J.S., LAROSA, D.F., WILSON, E.H., TURKA, L.A., HALONEN, S.K., HUNTER, C.A., ROOS, D.S. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. **Infect. Immun.** 75: 5200-5209, 2007.

- EDWARDS, J.F., DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. **Vet. Parasitol.** 192(1-3):129-36, 2013.
- EL BEHAIRY, A.M., CHOUDHARY, S., FERREIRA, L.R., KWOK, O.C., HILALI, M., SU, C. DUBEY, J.P. Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt. **Vet. Parasitol.** 193(1-3):25-9, 2013.
- EL-GHAYSH, A.A., MANSOUR, M.M. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Egyptian sheep-herd using modern serological techniques. **J. Egypt. Assoc. Immunol.** 1: 117-121, 1994.
- EL-METENAWY, T.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies among domesticated ruminants at Al-Qassim Region, Saudi Arabia. **Deut. Tierarztl. Woch.** 107: 32–33, 2000.
- Embrapa Caprinos, sistemas de produção 1, ISSN 1809-1822, versão eletrônica, 2005 <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Caprinos/OvinosdeCorte/Caprinos/OvinosCorteNEBrasil/index.htm>
- ENTRICAN, G., WHEELHOUSE, N.M. Immunity in the female sheep reproductive tract. **Vet. Res.** 37: 295–309, 2006.
- ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E.A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. **Int. J. Parasitol.** 28: 1459-1466, 1998.
- ESTEBAN-REDONDO, I., MALEY, S.W., THOMSON, K., NICOLL, S., WRIGHT, S., BUXTON, D., INNES, E.A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Vet. Parasitol.** 86: 155-171, 1999.
- FAULL, W.B., CLARKSON, M.J., WINTER, A.C. Toxoplasmosis in a flock of sheep: some investigations into its source and control. **Vet Rec** 119:491-493, 1986.
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitol. Res.** 73: 483–491, 1987.
- FERGUSON, M.A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J. Cell Sci.** 112: 2799-2809, 1999.
- FERREIRA, A.W., CAMARGO, M.E. Toxoplasmosis and the laboratory: diagnosis and a constant striving for improvement. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 44: 119-120, 2002.
- FIGLIUOLO, L.P.C., KASAI, N., RAGOZO, A.M.A., DE PAULA, V.S.O., DIAS, R.A., SOUZA, S.L.P., GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.** 123, 161-166, 2004.
- FRENKEL, J.K. *Toxoplasma* in and around us. **BioScience** 23: 343–352, 1973.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCÓN, J., CASTELLS, D., CORREA, O., CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. **Vet. Parasitol.** 81: 85-88, 1999.
- FUX, B; RODRIGUES, C.V., PORTELA, R.W., SILVA, N.M., SU, C., SIBLEY, D., VITOR, R.W., GAZZINELLI, R.T. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** 71: 6392-6401, 2003.

GAFFURI, A., GIACOMETTI, M., TRANQUILLO, V. M., MAGNINO, S., CORDIOLI, P., LANFRANCHI, P. Serosurvey of Roe Deer, Chamois and Domestic Sheep in the Central Italian Alps. **J. Wildlife Dis.** 42: 685–690, 2006.

GALLINO, A., MAGGIORINI, M., KIOWSKI, W., MARTIN, X., WUNDERLI, W., SCHNEIDER, J., TURINA, M., FOLLATH, F. Toxoplasmosis in heart transplant recipients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 15: 389-393, 1996.

GAZZINELLI, R.T., AMICHAY, D., SCHARTON-KERSTEN, T.M., GRUNWALD, E., FARBER, J.M., SHER, A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 219: 155-163, 1996a.

GAZZINELLI, R.T., ELTOUM, I., WYNN, T.A., SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J. Immunol.** 151:3672–3681, 1993.

GAZZINELLI, R.T., HAKIM, F.T., HIENY, S., SHEARER, G.M., SHER, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J. Immunol.** 146:286–292, 1991.

GAZZINELLI, R.T., HIENY, S., WYNN, T.A., WOLF, S., SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90:6115–6119, 1993.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y., HIENY, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G., SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 153:2533–2543, 1994.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J. Immunol.** 157: 798-805, 1996b.

GAZZINELLI, R., XU, Y., HIENY, S., CHEEVER, A., SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 149:175–180, 1992.

GHONEIM, N.H., SHALABY, S.I., HASSANAIN, N.A., ZEEDAN, G.S.G., SOLIMAN, Y.A., ABDALHAMED, A.M. Comparative Study Between Serological and Molecular Methods for Diagnosis of Toxoplasmosis in Women and Small Ruminants in Egypt. **Foodborne Pathog. Dis.** 7: 17-22, 2010.

GIRALDO M, CANNIZZARO H, FERGUSON MA, ALMEIDA IC, GAZZINELLI RT. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 1453-1460, 2000.

GIRALDO, M., PORTELA, R.W.D., SNEGE, M., LESER, P.G., CAMARGO, M.E., MINEO, J.R., GAZZINELLI, R.T. Immunoglobulin M (IgM)-Glycoinositolphospholipid enzyme-linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **J. Clin. Microbiol.** 40: 1400-1405, 2002.

- GOEBEL, S., GROSS, U., LUDER, C.G. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression. **J. Cell. Sci.** 114:3495–3505, 2001.
- GOLDSZMID, R.S., COPPENS, I., LEV, A., CASPAR, P., MELLMAN, I., SHER, A. Host ER–parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. **J. Exp. Med** 206: 399–410, 2009.
- HALONEN, S.K., CHIU, F., WEISS, L.M. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infect. Immun.** 66:4989–4993, 1998
- HALOS, L., THÉBAULT, A., AUBERT, D., THOMAS, M., PERRET, C., GEERS, R., ALLIOT, A., ESCOTTE-BINET, S., AJZENBERG, D., DARDÉ, M-L, DURAND, B., BOIREAU, P., VILLENA, I. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. **Int. J. Parasitol.** 40, 193–200, 2010.
- HAMIDINEJAT, H., GORANINEJAD, S., GHORBANPOOR, M., NABAVI, L., AKBARNEJAD, F. Role of *Toxoplasma gondii* in abortion of ewes in Ahvaz (South-West Iran). **B. Vet. I. Pulawy** 52: 369–371, 2008.
- HARKINS, D., CLEMENTS, D.N., MALEY, S., MARKS, J., WRIGHT, S., ESTEBAN, I., INNES, E.A., BUXTON, D. Western blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. **J. Comp. Pathol.** 119:45-55, 1998.
- HARTLEY, W.J., JEBSON, J.L., MCFARLANE, D. New Zealand type II abortion in ewes. **Aust. Vet. J.** 30: 216-218, 1954.
- HARTLEY, W.J., MARSHALL, S.C. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. **New Zeal. Vet. J.** 5: 119-124, 1957.
- HAYASHI, S., CHAN, C.C., GAZZINELLI, R., ROBERGE, F.G. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. **J. Immunol.** 156:1476–1481, 1996.
- HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K., AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature** 408: 740–745, 2000.
- HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E., AKHTAR, M., KAY, G.W., HOLEC-GĄSIOR, L., BICKERSTAFFE, R., KUR, J., STANKIEWICZ, M. The immune responses of sheep after DNA immunization with *Toxoplasma gondii* MAG1 antigen—with and without co-expression of ovine interleukin 6. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 136: 324–329, 2010.
- HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E., OLEŃDZK, G., HOLEC-GĄSIOR, L., LI, H., XUA, J.B., SEDCOLEA, R., KURC, J., BICKERSTAFFEA, R., STANKIEWICZA, M. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. **Vet. Parasitol.** 177: 281–289, 2011.
- HOFHUIS, A., VAN PELT, W., VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P., NIJHUIS, C.D.M., MOLLEMA, L., VAN DER KLIS, F.R.M., HAVELAAR, A.H., KORTBEEK, L.M. Decreased prevalence and age-specific risk factors for *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. **Epidemiol. Infect.** 139: 530 538, 2011.
- HOGHOOGHI-RAD, N., AFRAA, M. Prevalence of toxoplasmosis in humans and domestic animals in Ahwaz, Capital of Khoozestan Province, South-West Iran. **J. Trop. Med. Hyg.** 96: 163–168, 1993.

- HOLEC-GASIOR, L., KUR, J., HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E., DRAPALA, D., DOMINIAK-GÓRSKI, B., PEJSAK, Z. Application of recombinant antigens in serodiagnosis of swine toxoplasmosis and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pigs of Poland. **Pol. J. Vet. Sci.** 13(3): 457-464, 2010.
- HOSSEININEJAD, M., AZIZI, H.R., HOSSEINI, F., SCHARES, G. Development of an indirect ELISA test using a purified tachyzoite surface antigen SAG1 for serodiagnosis of canine *Toxoplasma gondii* infection. **Vet. Parasitol.** 164(2-4): 315-319, 2009.
- HOWE, D.K., HONORE, S., DEROUIN, F., SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1411-1414, 1997.
- HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J. Infect. Dis.** 172: 1561-1566, 1995.
- HUTCHISON, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, 206: 961–962 1965.
- HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., WORK, K., SIIM, J.C. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 65: 380–399, 1971.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (Ed.), 2010. Produção da Pecuária Municipal. IBGE, Rio de Janeiro, 38, 65pp.
- IBGE Séries Estatísticas, 2012. Available:<seriesestatisticas.ibge.gov.br> Accessed 10/12/2012.
- INNES, E.A., BARTLEY, P.M., MALEY, S.W., WRIGHT, S.E., BUXTON, D. Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. **Vaccine** 25: 5495-5503, 2007.
- INNES, E.A., PANTON, W.R.M., SANDERSON, A., THOMSON, K.M., WASTLING, J.M., MALEY, S., BUXTON, D. Induction of CD4+ and CD8+ T cell responses in efferent lymph responding to *Toxoplasma gondii* infection: analysis of phenotype and function. **Parasite Immunol.** 17: 151–160, 1995.
- INNES, E.A., PANTON, W.R., THOMSON, K.M., MALEY, S., BUXTON, D. Kinetics of interferon gamma production in vivo during infection with the S48 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. **J. Comp. Pathol.** 113:89-94, 1995.
- INNES, E.A., VERMEULEN, A.N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Parasitol.** 133:145-168, 2006.
- INNES, E.A., WASTLING, J.M. Analysis of in vivo immune responses during *Toxoplasma gondii* infection using the technique of lymphatic cannulation. **Parasitol. Today** 11: 268–271, 1995.
- ISRAELSKI, D.M., REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 2: 429-445, 1988.
- JACOBS, L., REMINGTON, J.S., MELTON, M.L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J. Parasitol.** 46:11–21, 1960a.
- JACOBS, L., REMINGTON, J.S., MELTON, M.L. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. **J. Parasitol.** 46:23–28, 1960b.

- JACQUET, A., COULON, L., DE NEVE, J., DAMINET, V., HAUMONT, M., GARCIA, L., BOLLEN, A., JURADO, M., BIEMANS, R. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Mol. Bioch. Parasitol.** 116: 35–44, 2001.
- JAFAR POUR AZAMI, S., KESHAVARZ, H., REZAIAN, M., MOHEBALI, M., SHOJAEI, S. Rapid Detection of *Toxoplasma gondii* Antigen in Experimentally Infected Mice by Dot-ELISA. **Iran J. Parasitol.** 6: 28-33, 2011.
- JALALLOU, N., BANDEPOUR, M., KHAZAN, H., HAGHIGHI, A., ABDOLLAHI, S.H., KAZEMI, B. Recombinant SAG1 antigen to detect *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G in human sera by ELISA test. **Iranian J. Parasitol.** 5(2): 1-9, 2010.
- JUNGERSEN, G., JENSEN, L., RASK, M.R., LIND, P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 25: 187–195, 2002.
- KASPER, L.H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immunol.** 57(3): 668-672.
- KATZER, F., BRÜLISAUER, F., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., BARTLEY, P.M., BURRELLS, A., GUNN, G., MALEY, S. W., COUSENS, C., INNES, E.A. Increased *Toxoplasma gondii* positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. **Vet. Res.** 42: 121, 2011.
- KHAMMARI, I., SAGHROUNI, F., BOUGMIZA, I., GHEITH, S., BEN ABDEJLIL, J., YAACOUB, A., BOUKADIDA, J., BABBA, H., BEN SAÏD, M. Evaluation of the immunoblotting for the detection of immunoglobulin G *Toxoplasma* antibodies in immunocompetent patients. **Pathol. Biol (Paris).** 60(3): 160-165, 2012.
- KHAN, A., JORDAN C., MUCCIOLI, C., VALLOCHI, A.L., RIZZO, L.V., BELFORT JR, R., VITOR, R.W.A., SILVEIRA, C., SIBLEY, L.D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 12: 942-949, 2006.
- KHAN, I.A., MATSUURA, T., KASPER, L.H. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Int. Immunol.** 8: 887–896, 1996.
- KOTULA, A.W., DUBEY, J.P., SHARAR, A.K., ANDREWS, C.D., SHEN, S.K., LINDSAY, D.S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **J. Food. Prot.** 54: 687-690, 1991.
- KRISHNEGOWDA, G., HAJJAR, A.M., ZHU, J., DOUGLASS, E. J., UEMATSU, S., AKIRA, S., WOODS, A.S., GOWDA, D.C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **J. Biol. Chem.** 280: 8606–8616, 2005.
- LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 33(1):159-174, 1977.
- LAU, Y.L., FONG, M.Y. *Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pischia pastoris*. **Exp. Parasitol.** 119: 373-378, 2008.
- LAU, Y.L., MEGANATHAN, P., SONAIMUTHU, P., THIRUVENGADAM, G., NISSAPATORN, V., CHEN, Y. Specific, sensitive and rapid diagnosis of active

toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. **J. Clin. Microbiol.** 48(10): 3698-3702, 2010.

LEHMANN, T., GRAHAM, D.H., DAHL, E.R., BAHIA-OLIVEIRA, L.M., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infec. T. Genet. Evol.** 2: 107-114, 2004.

LEKUTIS, C., FERGUSON, D.J., BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Exp. Parasitol.** 96: 89–96, 2000.

LEKUTIS, C., FERGUSON, D.J., GRIGG, M.E., CAMPS, M., BOOTHROYD, J.C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **Int. J. Parasitol.** 31: 1285–1292, 2001.

LI, G., BASAGOUDANAVAR, S.H., GOWDA, D.C. Effect of GPI anchor moiety on the immunogenicity of DNA plasmids encoding the 19-kDa C-terminal portion of *Plasmodium falciparum* MSP-1. **Parasite Immunol.** 30: 315-322, 2008.

LI, B., OLEDZKA, G., MCFARLANE, R.G., SPELLERBERG, M.B., SMITH, S.M., GELDER, F.B., KUR, J., STANKIEWICZ, M. Immunological response of sheep to injections of plasmids encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. **Parasite Immunol.** 32: 671-683, 2010.

LIESENFELD, O., KOSEK, J., REMINGTON, J.S., SUZUKI, Y. 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, 1996.

LIN, M.H., CHEN, T.C., KUO, T.T., TSENG, C.C., TSENG, C.P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **J. Clin. Microbiol.** 38: 4121-4125, 2000.

LIND, P., BUXTON, D. Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In: Ambroise-Thomas P, Peterson E, editors. Congenital toxoplasmosis. France: Springer-Verlag; 2000. p. 261–9.

LOPES, W.D.Z., COSTA, A.J., SOUZA, F.A., RODRIGUES, J.D.F., COSTA, G.H.N., SOARES, V.E., SILVA, G.S. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **An. Reprod. Sci.** 111: 312–319, 2009.

LOPES, W.D., SANTOS, T.R., DA SILVA, R. DOS S., ROSSANESE, W.M., DE SOUZA, F.A., DE FARIA RODRIGUES, J.D., DE MENDONÇA, R.P., SOARES, V.E., COSTA, A.J. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Res. Vet. Sci.** 88: 104-106, 2010.

LÜDER, C.G.K., LANG, T., BEUERLE, B., GROSS, U. Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. **Clin. Exp. Immunol.** 112:308–316, 1998.

LÜDER, C.G.K., LANG, C., GIRALDO-VELASQUEZ, M., ALGNER, M., GERDES, J., GROSS, U. *Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. **J. Neuroimmunol.** 134:12–24, 2003.

LUFT, B.J., KANSAS, G., ENGLEMAN, E.G., REMINGTON, J.S. Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. **J. Infect. Dis.** 150:761–767, 1984.

- LUNDEN, A., NASHOLM, A., UGGLA, A. Long-term study of *Toxoplasma gondii* infection in a Swedish sheep flock. **Acta Vet. Scand.** 35: 273–81, 1994.
- MACK, D.G., JOHNSON, J.J., ROBERTS, F., ROBERTS, C.W., ESTES, R.G., DAVID, C., GRUMET, F.C., MCLEOD, R. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. **Int. J. Parasitol.** 29:1351–1358, 1999.
- MADRUGA, M.S., ARAÚJO, W.O., SOUSA, W.H., CÉZAR, M.F., GALVÃO, M.D.S., CUNHA, M.D.G.G. Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. **Rev. Bras. Zootecn.** 35: 1838-1844, 2006.
- MAINAR-JAIME, R.C., BARBERÁN, M. Evaluation of the diagnostic accuracy of the modified agglutination test (MAT) and an indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep through Bayesian approaches. **Vet. Parasitol.** 148: 122–129, 2007.
- MAKSIMOV, P., ZERWECK, J., MAKSIMOV, A., HOTOP, A., GROSS, U., PLEYER, U., SPEKKER, K., DÄUBENER, W., WEDERMMAN, S., NIEDERSTRASSER, O., PETRI, E., MERTENS, M., ULRICH, R.G., CONRATHS, F.J., SCHARES, G. Peptides microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *T. Gondii* infection in humans. **Clin. Vaccine Immunol.** 19(6): 865-874, 2012.
- MALIK, M.A., DREESEN, D.W., De La CRUZ, A. Toxoplasmosis in sheep in north eastern United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 196: 263–265, 1990.
- MANGER, I.D., HEHL, A.B., BOOTHROYD, J.C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infect. Immunt.** 66(5): 2237-2244, 1998.
- MARQUES PX, O'DONOVAN, J., WILLIAMS, E.J., GUTIERREZ, J., WORRALL, S., MCELROY, M., PROCTOR, A., BRADY, C., SAMMIN, D., BASSETT, H., BUXTON, D., MALEY, S., MARKEY, B.K., NALLY, J.E. Detection of *Toxoplasma gondii* antigens reactive with antibodies from serum, amniotic, and allantoic fluids from experimentally infected pregnant ewes. **Vet. Parasitol.** 185: 91– 100, 2012.
- MARTENS, S., PARVANOVA, I., ZERRAHN, J., GRIFFITHS, G., SCHELL, G., REICHMANN, G., HOWARD, J.C. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorus vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. **PLoS Pathog** 1(3): e24, 2005.
- MARTIN, W.B., AITKEN, I.D., 2000. Diseases of Sheep, Blackwell Scientific, Oxford.
- MARTINS, V.P., PINHEIRO, C.S., FIGUEIREDO, B.C.P., ASSIS, N.R.G., MORAIS, S.B., CALIARI, M.V., AZEVEDO, V., CASTRO-BORGES, W., WILSON, R.A., OLIVEIRA, S.C. Vaccination with Enzymatically Cleaved GPI-Anchored Proteins from *Schistosoma mansoni* Induces Protection against Challenge Infection. **Clin. Dev. Immunol.** 2012:962538, 2012.
- MASALA, G., PORCU, R., DAGA, C., DENTI, S., CANU, G., PATTA, C., TOLA, S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. **J. Vet. Diagn. Invest.** 19: 96-98, 2007.
- MASALA, G., PORCU, R., MADAU, L., TANDA, A., IBBA, B., SATTA, G., TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. **Vet. Parasitol.** 117: 15-21, 2003.
- McCOLGAN, C., BUXTON, D., BLEWETT, D.A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non pregnant sheep and the effect of subsequent challenge during pregnancy. **Vet. Res.** 123: 467-470, 1988.

- McKEE, A.S., DZIERSZINSKI, F., BOES, M., ROOS, D.S., PEARCE, E.J. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 173:2632–2640, 2004.
- MEDEIROS, M.M., PEIXOTO, J.R., OLIVEIRA, A-C, CARDILO-REIS, L., KOATZ, V.L.G., KAER, L.V., PREVIATO, J.O., MENDONÇA-PREVIATO, L., NOBREGA, A., BELLIO, M. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Leuk. Biol.** 82 488-496, 2007.
- MENDONÇA JR., R. Pele de carneiro serve para fazer sapato fino. O Estado de São Paulo, Suplemento Agrícola, p.G9, 1995.
- MESQUITA, R.T., VIDAL, J.E., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. **Braz. J. Infect. Dis.** 14(4): 346-350, 2010.
- MILLER, E.N., ALLAN, L.M., TURNER, M.J. Topological analysis of antigenic determinants on a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 13(1): 67-81, 1984.
- MINEO, J.R., CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W. Enzyme linked-immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect. Immun.** 27(2): 283-297, 1980.
- MOORE, K.W., WAAL MALEFYT, R., COFFMAN, R.L., O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** 19: 683–765, 2001.
- MOR, N., ARSLAN, M.O. Kars yöresindeki koyunlarda *Toxoplasma gondii*’nin seroprevalansı. **Kafkas Univ. Vet. Fak.** 13: 165–170, 2007.
- MORAES, L.M.B., RAIMUNDO, J.M., GUIMARÃES, A., SANTOS, H.A., MACEDO, G.DE L. JR., MASSARD, C.L., MACHADO, R.C., BALDANI, C.D. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 20: 312-317, 2011.
- MORENO, T., MARTINEZ-GOMEZ, F., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S., DE SETEFILLA MARTINEZ-CRUZ, M., MARTINEZ-MORENO, A. The seroprevalence of ovine toxoplasmosis in Cordoba, Spain. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 85: 287–288, 1991.
- MORLEY, E.K., WILLIAMS, R.H., HUGHES, J.M., TERRY, R.S., DUNCANSON, P. Significant familial differences in the frequency of abortion and *Toxoplasma gondii* infection within a flock of Charollais sheep. **Parasitol.** 131: 181-185, 2005.
- MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. Two types of helper T-cell clone. Implications for immune regulation, **Immunol. Today** 8: 223-227, 1987.
- MUGRIDGE, N.B., MORRISON, D.A., HECKEROTH, A.R., JOHSON, A.M., TENTER, A.M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasit.** 29: 1545-1556, 1999.
- MUNDAY, B.L., OBENDORF, D.L., HANDLINGER, J.H., MASON, R.W. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in ovine fetuses. **Aust. Vet. J.** 64: 292-295, 1987.
- MURRAY, H.W., JUANGBHANICH, C.W., NATHAN, C.F., COHN, Z.A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. **J. Exp. Med.** 150:950–964, 1979.

- NASH, P.B., PURNER, M.B., LEON, R.P., CLARKE, P., DUKE, R.C., CURIEL, T.J. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. **J. Immunol.** 160: 1824–1830, 1998.
- NAVIA, B.A., PETITO, C.K., GOLD, J.W., CHO, E.S., JORDAN, B.D., PRICE, R.W. Cerebral Toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. **Ann. Neurol.** 19: 224-238, 1986.
- NICOLLE, C., MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisons) du gondi. **Cr. Acad. Sci.** 147, 736, 1908.
- NOORDHUIZEN, J.P.T.M., FRANKENA, K., VAN DER HOOFD, C.M., GRAAF, E.A.M. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. Wageningen Press: Wageningen, 1997. 445pp.
- OLIVEIRA-SIQUEIRA, T.C.G., AAMARANTE, A.F.T., SALATA, E., SOGAYAR, R. Serological survey for Toxoplasma infection in sheep in São Paulo State, Brazil. **Vet. Zootec.** 5: 121–125, 1993.
- OPHORST, O., RADOŠEVI, K., OUWEHAND, K., VAN BEEM, W., MINTARDJO, R., SIJTSMA, J., KASPERS, J., COMPANJEN, A., HOLTERMAN, L., GOUDSMIT, J., HAVENGA, M. Expression and immunogenicity of the *P. falciparum* circumsporozoite protein: The role of GPI signal sequence. **Vaccine** 25: 1426-1436, 2007.
- OPSTEEGH, M., SWART, A., FONVILLE, M., DEKKERS, L., VAN DER GIESSEN, J. Age-related *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch wild boar inconsistent with lifelog persistence of antibodies. **PloS One** 6(1): e16240, 2011.
- OSWALD, I.P., WYNN, T.A., SHER, A., JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor  $\alpha$  required as a costimulatory factor for interferon  $\gamma$ -induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 89: 8676-8680, 1992.
- OURA CA, INNES EA, WASTLING JM, ENTRICAN G., PANTON WR. The inhibitory effect of ovine recombinant interferon gamma on intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.** 15:535-538, 1993.
- OWEN, M.R. 1996. Molecular approaches to the epidemiology and diagnosis of ovine toxoplasmosis. PhD Thesis. University of Liverpool.
- OWEN, M.R., TREES, A.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **J. Parasitol.** 85: 382–384, 1999.
- PAIVA, S., SILVÉRIO, V., EGITO, A.A., McMANUS, C., FARIA, D.A., MARIANTE, A.S., CASTRO, S.R., ALBUQUERQUE, M.S.M., DERGAM, J.A. Genetic variability of the Brazilian hair sheep. **Pesquisa Vet. Brasil** 40: 887-893, 2005.
- PARTANEN, P., TURUNEN, H.J., PAASIVUO, R.T.A., LEINIKKI, P.O. Immunoblot Analysis of *Toxoplasma gondii* Antigens by Human Immunoglobulins G, M, and A Antibodies at Different Stages of Infection. **J. Clin. Microbiol.** 20: 133-135, 1984.
- PAYNE, R.A., JOYNSON, D.H., WILSMORE, A.J. Enzyme-linked immunosorbent assays for the measurement of specific antibodies in experimentally induced ovine toxoplasmosis. **Epidemiol. Infect.** 100:205-212, 1988.
- PAYNE, T.M., MOLESTINA, R.E., SINAI, A.P. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. **J. Cell. Sci.** 116:4345–4358, 2003.

- PENA, H.F., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., SU, C. Population structure and mouse-*virulence of Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int. J. Parasitol.** 38(5): 561-569, 2008.
- PEPPER, M., DZIERSZINSKI, F., WILSON, E., TAIT, E., FANG, Q., YAROVINSKY, F., LAUFER, T.M., ROOS, D., HUNTER, C.A. Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. **J. Immunol.** 180:6229–6236, 2008.
- PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PÉREZ-PÉREZ, V., ÁLVAREZ-GARCÍA, G., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Vet. Parasitol.** 121: 33–43, 2004.
- PESTKA, S., KRAUSE, C.D., SARKAR, D., WALTER, M.R., SHI, Y., FISHER, P.B. Interleucina – 10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, 22: 29-70, 2004.
- PINHEIRO, R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F., HADDAD, J.P. Aspectos zoonosológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 50: 534-543, 2000.
- PINHEIRO JR, J.W., MOTA, R.A., OLIVEIRA, A.A., FARIA, E.B., GONDIM, L.F., DA SILVA, A.V., ANDERLINI, G.A. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. **Parasitol. Res.** 105: 709-715, 2009.
- PINKERTON, H., HENDERSON, R.G. Adult toxoplasmosis. A previously unrecognized disease entity simulating the typhus spotted-fever group. **J. Am. Med. Assoc.** 116:807–814, 1941.
- PINKERTON, H., WEINMAN, D. *Toxoplasma* infection in man. **Arch. Pathol.** 30: 374–392, 1940.
- PITA GONDIM, L. F., BARBOSA JR., H. V., RIBEIRO FILHO, C. H. A., SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Vet. Parasitol.** 82: 273-276, 1999.
- PLANT, J.W., RICHARDSON, N., MOYLE, G.G. *Toxoplasma* infection and abortion in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. **Aust. Vet. J.** 50: 19-21, 1974.
- POLLARD, A.M., ONATOLU, K.N., HILLER, L., HALDAR, K., KNOLL, L.J. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** 76(1): 103-110, 2008.
- PORTELA, R.W.D., BETHONY, J., COSTA, M.I., GAZZINELLI, A., VITOR, R.W.A., HERMETO, F.M., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, R.T. A Multihousehold Study Reveals a Positive Correlation between Age, Severity of Ocular Toxoplasmosis, and Levels of Glycoinositolphospholipid-Specific Immunoglobulin A. **J. Infect. Dis.** 190: 175-183, 2004.
- PRINCE, J.B., AUER, K.L., HUSKINSON, J., PARMLEY, S.F., ARAÚJO, F.G., REMINGTON, J.S. Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen p22 from *Toxoplasma gondii*. **Mol. Bioch. Parasitol.** 43: 97-106, 1990.
- QUEIROZ, G.R.G. Influência da via de infecção na resposta imune de Camundongos BALB/c infectados com a cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii*. 1998. 91 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Centro de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- RACHINEL, N., BUZONI-GATEL, D., DUTTA, C., MENNECHET, F.J., LUANGSAY, S., MINNS, L.A., GRIGG, M.E., TOMAVO, S., BOOTHROYD, J.C., KASPER, L.H. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** 173:2725–2735, 2004.
- RAEGHI, S., AKABERI, A., SEDEGHI, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Sheep, Cattle and Horses in Urmia North-West of Iran Iranian. **J. Parasitol.** 6: 90-94, 2011.
- RALTON, J.E., MULLIN, K.A., McCONVILLE, M.J. Intracellular trafficking of Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in *Leishmania Mexicana*. **Biochem. J.** 363: 365-375, 2002.
- REID, H.W., BUXTON, D., GARDINER, A.C., POW, I., FINLAYSON, J., MACLEAN, M.J. Immunosuppression in toxoplasmosis: studies in lambs and sheep infected louping-ill virus. **J. Comp. Pathol.** 92: 181-91, 1982.
- REMYINGTON, J. S., MCLEOD, R., THULLIEZ, P., DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S. & Klein, J. O. (ed.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 5. Ed. W. B. Saunders: Philadelphia, PA. 2006. 947–991p.
- RIFAAT, M.A., MORSY, T.A., SADEK, M.S., AZAB, M.E., KHALED, M.L.M., SAFAR, E.H. Incidence of toxoplasmosis among farm and slaughtered animals in costal zone of Egypt. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 9: 193-197, 1979.
- RODRIGUES, I.M.X., CASTRO, A.M., GOMES, M.B.F., AMARAL, W.N., AVELINO, M.M. Congenital toxoplasmosis: evaluation of serologic methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 104(3): 434-440, 2009.
- ROMANELLI, P.R., FREIRE, R.L., VIDOTTO, O., MARANA, E.R.M., OGAWA, L., DE PAULA, V.S.O., GARCIA, J.L., NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. **Res. Vet. Sci.** 82: 202–207, 2007.
- RUSKIN J., REMINGTON J.S. Toxoplasmosis in the compromised host. **Ann. Intern. Med.** 84: 193-199, 1976.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Am. Med. Assoc.** 116:801–807, 1941.
- SABIN, A.B., FELDMAN, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). **Science** 108:660–663, 1948.
- SAGER, H., GLOOR, M., TENTER, A., MALEY, S., HÄSSIG, M., GOTTSSTEIN, B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. **Parasitol. Research** 91: 171-174, 2003.
- SAKATA, F.B.L.S., BELLATO, V., SARTOR, A.A., MOURA, A.B., SOUZA, A.P., FARIAS J.A. *Toxoplasma gondii* antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. **Rev. Bras. Parasitol.** 21: 196-200, 2012.
- SANAD, M.M., AL-GHABBAN, A.J. Serologic survey on toxoplasmosis among slaughtered sheep and goats in Tabouk, Saudi Arabia. **J. Egypt. Soc. Parasitol.** 37(1): 329-340, 2007.
- SANTANA, A.C.de. Mudanças recentes nas relações de demanda de carne no Brasil. **Rev. Econ. Sociol. Rural** 37: 51-76, 1999.
- SASA, A. Efeitos da nutrição na atividade cíclica e reprodutiva e nas concentrações plasmáticas de melatonina em ovelhas mantidas em pastagens e submetidas ao efeito macho

durante o anestro sazonal-Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2002.

SAVIO, E., NIETO, A. Ovine toxoplasmosis: seroconversion during pregnancy and lamb birth rate in Uruguayan sheep flocks. **Vet. Parasitol.** 60: 241–247, 1995.

SCHAEFER, J.J., WHITE, H.A., SCHAAF, S.L., MOHAMMED, H.O., WADE, S.E. Modification of a commercial *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay for use in multiple animal species. **J. Vet. Diagn. Invest.** 23: 297-301, 2011.

SCHAEFER, J.J., WHITE, H.A., SCHAAF, S.L., MOHAMMED, H.O., WADE, S.E. Chimeric protein A/G conjugate for detection of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G in multiple animals species. **J. Vet. Diagn. Invest.** 24(3): 572-575, 2012.

SCHOFIELD, L., HACKETT, F. Signal transduction in the host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **J. Exp. Med.** 177(1): 145-153, 1993.

SEEFELDT, S.L., KIRKBRIDE, C.A., DUBEY, J.P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test and direct agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally aborted ovine fetuses. **J. Vet. Diagn. Invest.** 1:124-127, 1989.

SELSELEH, M., KESHAVARZ, H., MOHEBALI, M., SHOJAEI, S., SELSELEH, M., ESHRAGIAN, M.R., MANSOURI, F., MODARRESSI, M.H. Production and evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant GRA7 for the serodiagnosis of human infection. **Korean J. Parasitol.** 50(3): 233-238, 2012a.

SELSELEH, M.M., KESHAVARZ, H., MOHEBALI, M., SHOJAEI, S., MODARRESSI, M., ESHRAGIAN, M., SELSELEH, M.M. Production and evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant surface antigen 1 (rSAG1) for the serodiagnosis of acute and chronic *Toxoplasma* infection in human sera. **Iran J. Parasitol.** 7(3): 1-9, 2012b.

SHAAPAN, R.M., EL-NAWAWI, F.A., TAWFIK, M.A.A. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. **Vet. Parasitol.** 153: 359-362, 2008.

SHAHIDUZZAMAN, M., ISLAM, M.R., KHATUN, M.M., BATANOVA, T.A., KITO, K., TAKASHIMA, Y. *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in Domestic Animals and Humans in Mymensingh District, Bangladesh. **J. Vet. Med. Sci.** 73: 1375–1376, 2011.

SHEFFIELD, H.G., MELTON, M.L. *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. **Science** 167: 892–893, 1970.

SIBLEY, L.D., ADAMS, L.B., FUKUTOMI, Y., KRAHENBUHL, J.L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers antitoxoplasmal activity of IFN $\gamma$  primed macrophages. **J. Immunol.** 147:2340–2345, 1991.

SIBLEY, L.D., BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature** 359: 82-85, 1992.

SILVA, C.H., ANDRADE, G.Q., JANUÁRIO, J.N., CARNEIRO, A.C., CARNEIRO, M., VASCONCELOS-SANTOS, D.V., VITOR, R.W. Early diagnosis of congenital toxoplasmosis in newborn infants using IgG subclasses against two *Toxoplasma gondii* recombinant proteins. **Men. Inst. Oswaldo Cruz** 107(3): 342-347, 2012.

- SILVA, N.V., COSTA, R.G., FREITAS, C.R.G., GALINDO, M.C.T., SILVA, L. dos S. Alimentação de ovinos em regiões semi-áridas do Brasil. **Acta Vet. Brasilica** 4: 233-241, 2010.
- SILVA-DOS-SANTOS, P.P., BARROS, G.B., MINEO, J.R., De OLIVEIRA SILVA, D.A., MENEGAZ, M.H., SERUFO, J.C., DIETZE, R., MARTINS FILHO, O. De A., LEMOS, E.M. Flow cytometry-based algorithm to analyze the anti-fixed *Toxoplasma gondii* tachyzoites IgM and IgG reactivity and diagnose human acute toxoplasmosis. **J. Immunol. Methods** 378 (1-2): 33-43, 2012.
- SILVEIRA, C., BELFORT, R., BURNIER, M., NUSSENBLATT, R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. **Am. J. Ophthalmol.** 106:362-364, 1988.
- SKJERVE, E., WALDELAND, H., NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. **Prev. Vet. Med.** 35: 219-227, 1998.
- SKLENAR, I., JONES, T.C., ALKAN, S., ERB, P. Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets. **J. Infect. Dis.** 153:315-324, 1986.
- SOARES, H.S., AHID, S.M.M., BEZERRA, A.C.D.S., PENA, H.F.J., DIAS, R.A., GENNARI, S.M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte. **Rev. Bras. Parasitol.** 160: 211-214, 2009.
- SOARES, J.A., CARVALHO, S.F., CALDEIRA, A.P. Profile of pregnant women and children treated at a reference center for congenital toxoplasmosis in the northern state of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 45:55-59, 2012.
- SOUSA, S., THOMPSON, G., SILVA, E., FREIRE, L., LOPES, D., CORREIA, D.A., COSTA, J.M., CASTRO, A., CARVALHEIRA, J., CANADA, N. Determination of the more adequate modified agglutination test cut-off for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in sheep. **Zoonoses Public Health** 56: 252-256, 2009.
- SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev. Soc. Cien. São Paulo** 3: 109-112, 1908.
- SROKA, J. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in the Lublin Region. **Ann. Agr. Env. Med.** 8: 25-31, 2001.
- STERKERS, Y., PRATLONG, F., ALBABA, S., LOUBERSAC, J., PICOT, M.C., PRETET, V., ISSERT, E., BOULOT, P., BASTIEN, P. Novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection. **J. Clin. Microbiol.** 50(12): 3944-3951, 2012.
- STEUBER, S., NIU, A., BAUER, C., REETZ, J., ROTH, A., JANITSCHKE, K. Der Nachweis von *Toxoplasma gondii* in Abortgeweben vom Schaf mittels der Polymerase-Kettenreaktion. **Deut. Tierarztl. Woch.** 102: 91-93, 1995.
- STRICKLAND, G.T., SAYLES, P.C. Depressed antibody responses to a thymus-dependent antigen in toxoplasmosis. **Infect. Immun.** 15:184-19, 1977.
- SU, C., ZHANG, X., DUBEY, J.P. 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, 2006.

- SUKTHANA, Y., MAHITTIKORN, A., WICKERT, H., TANSUPHASWASDIKUL, S. A promising diagnostic tool for toxoplasmic encephalitis: tachyzoite/bradyzoite stage-specific RT-PCR. **Int. J. Infect. Dis.** 16(4): e279-284, 2012.
- SUZUKI, Y., JOH, K., ORELLANA, M.A., CONLEY, F.K., REMINGTON, J.S. A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Immunology** 74:732-739, 1991.
- SUZUKI, Y., ORELLANA, M.A., SCHREIBER, R.D., REMINGTON, J.S. Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science** 240:516-518, 1988.
- SUZUKI, Y., REMINGTON, J.S. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. **J. Immunol.** 140:3943-3946, 1988.
- TACHADO, S.D., GEROLD, P., SCHWARZ, R., NOVAKOVIC, S., McCONVILLE, M, SCHOFIELD, L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositol for *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94(8): 4022-4027, 1997.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M., *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int. J. Parasitol.** 30:1217-1258, 2000.
- TENTER, A.M., VIETMEYER, C., JOHNSON, A.M. Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. **Vet. Parasitol.** 43:189-201, 1992.
- TEUTSCH, S.M., JURANEK, D.D., SULZER, A., DUBEY, J.P., SIKES, R.K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **N. Engl. J. Med.** 300:695-699, 1979.
- TOMAVO, S., SCHWARZ, R.T., DUBREMETZ, J.F. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Mol. Cel. Biol.** 9: 4576-4580, 1989.
- TREES, A.J., CROZIER, S.J., BUSTON, D., BLEWETT, D.A. Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis: an assessment of the latex agglutination test and the value of IgM specific titres after experimental oocyst-induced infections. **Res. Vet. Sci.** 46:67-72, 1989.
- TZANIDAKIS, N., MAKSIMOV, P., CONRATHS, F.J., 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.** 190: 340-348, 2012.
- UDONSOM, R., BUDDHIRONGAWATR, R., SUKTHANA, Y. Is Sabin-Feldman dye test using *T. Gondii* tachyzoites from animal inoculation still the best method for detecting *Toxoplasma gondii* antibodies? **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health** 41(5): 1059-1064, 2010.
- UENO, T.E.H., GONÇALVES, V.S.P., HEINEMANN, M.B., DILLI, T.L.B., AKIMOTO, B.M., DE SOUZA, S.L.P., GENNARI, S.M., SOARES, R.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.** 41: 547-552, 2009.
- UGGLA, A., BESKEW, P., SCHWAN, O., BERGGUIST, N.R., WALLER, T. Ovine toxoplasmosis in Sweden. **Acta Vet. Scand.** 24: 113-119, 1983.
- VALLOCHI, A.L., MUCCIOLI, C., MARTINS, M.C., SILVEIRA, C., BELFORT, R., RIZZO, L.V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am. J. Ophthalmol.** 139(2): 350-351, 2005.

- VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, ano 4, n° 12, Porto Alegre, Março, 2008.
- WALDELAND, H. Toxoplasmosis in sheep. The relative importance of the infection as a cause of reproductive loss in sheep in Norway. **Acta Vet. Scand.** 17: 412-425, 1976.
- WALDELAND, H. Toxoplasmosis in sheep. Influence of various factors on the antibody contents. **Acta Vet. Scand.** 18: 237-47, 1977.
- WALTNER-TOEWS, D., MONDESIRE, R., MENZIES, P. The seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Ontario sheep flocks. **Canadian Vet. J.** 32: 734-737, 1991.
- WANDER, A.E.; VASCONCELOS, V.R.; ROGÉRIO, M.C.P. Viabilidade econômica do acabamento de cordeiros deslanados em pastagens cultivadas dos capins gramão e tanzânia. In: Congresso BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 40., 2002, Passo Fundo. Anais... Passo Fundo: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2002. 7 p. 1 CD-ROM.
- WARNEKULASURIYA, M.R., JOHNSON, J.D., HOLLIMAN, R.E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **Int. J. Food Microbiol.** 45:211-215, 1998.
- WASTLING, J.M., HARKINS, D., MALEY, S. INNES, E., PANTON, W., THOMSON, K., BUXTON, D. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. **J. Comp. Pathol.** 112:53-62 1995.
- WASTLING, J.M., HARKINS, D., BUXTON, D. Western blot analysis of the IgG response of sheep vaccinated with S48 *Toxoplasma gondii* (Toxovax). **Res. Vet. Sci.** 57: 384-386, 1994.
- WASTLING, J.M., NICOLL, S., BUXTON, D. Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. **J. Med. Microbiol.** 38: 360-365, 1993.
- WATSON, W.A., BEVERLEY, J.K.A. Epizootics of toxoplasmosis causing ovine abortion. **Vet. Record** 88: 120-124, 1971.
- WEINMAN, D., CHANDLER, A.H. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 87:211-216, 1954.
- WERRE, S.R., JACOBSON, R.H., BOWMAN, D.D., DUBEY, J.P., MOHAMMED, H.O. Evaluation of kinetics and single-read enzyme-linked immunoassays for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.** 14: 225-230, 2002.
- WICHROSKI, M.J., WARD, G.E. Biosynthesis of Glycosylphosphatidylinositol Is Essential to the Survival of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic Cell** 2: 1132-1136, 2003.
- WILDER, H.C. Toxoplasma chorioretinitis in adults. **A.M.A. Arch. Ophthalmol.** 48:127-136, 1952..
- WOLF, A., COWEN, D., PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science** 89:226-227, 1939.
- YAP, G.S., SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- $\gamma$ - and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J. Exp. Med.** 189:1083-1092, 1999.

ZIA-ALI, N., FAZAELI, A., KHORAMIZADEH, M., AJZENBERG, D., DARDE', M., KESHAVARZ-VALIAN, H. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. **Parasitol. Res.** 101: 111–115, 2007.

ZINECKER, C.F., STRIEPEN, B., GEYER, H., GEYER, R., DUBREMETZ, J.F., SCHWARZ, R.T. Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 116: 127-135, 2001.

## **ANEXOS**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CAMPUS CARIRI  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que a Pesquisadora **PATRÍCIA OLIVEIRA MEIRA SANTOS**, submeteu o **PROJETO CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA TOXOPLASMOSE** à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, e esta, manifestou sua conclusão com a **Aprovação** do referido Projeto.

Barbalha – CE, 15 de março de 2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Freire', is written over a horizontal line.

Francisco Maurício Teles Freire  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais