



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IVO ALEXANDRE LEME DA CUNHA

**RESPOSTA IMUNE DE SUÍNOS IMUNIZADOS PELA VIA
NASAL COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS DO *Toxoplasma
gondii*.**

IVO ALEXANDRE LEME DA CUNHA

**RESPOSTA IMUNE DE SUÍNOS IMUNIZADOS PELA VIA
NASAL COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS DO *Toxoplasma
gondii*.**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina
2011

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C972r Cunha, Ivo Alexandre Leme da.

Resposta imune de suínos imunizados pela via nasal com proteínas de
roptrias do *Toxoplasma gondii* / Ivo Alexandre Leme da Cunha. –
Londrina, 2011.
57 f. : il.

Orientador: João Luis Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Suíno – Toxoplasmose – Teses. 2. Toxoplasmose – Vacina – Teses.
3. *Toxoplasma gondii* – Teses. 4. Resposta imune – Teses. 5. Imunologia
veterinária – Teses. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. III. Título.

CDU 610.636.4

IVO ALEXANDRE LEME DA CUNHA

**RESPOSTA IMUNE DE SUÍNOS IMUNIZADOS PELA VIA NASAL
COM PROTEÍNAS DE ROPTRIAS DO *Toxoplasma gondii*.**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Luis Garcia
UEL – Londrina-PR

Prof. Dra Roberta Lemos Freire
UEL – Londrina-PR

Prof. Dra. Regina Mitsuka Breganó
UEL – Londrina-PR

Londrina, 22 de Março de 2011.

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina (UEL) como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento a pesquisa a baixo relacionados:

- 1. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ MCT.**
- 2. UEL – Universidade Estadual de Londrina.**

*À minha esposa **Kátia** e
á **Kamila, Gabriel e João Pedro** pela presença e
apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** acima de tudo.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. João Luis Garcia** pelo compromisso com o meu crescimento acadêmico e pessoal, orientação de extremo valor.

Agradeço às Professoras **Dra. Roberta Lemos Freire** e **Dra. Regina Mitsuka Breganó** por fazer parte da banca examinadora, contribuição fundamental.

Agradeço ao Professor **Dr. Italmar Teodorico Navarro** por apoiar e estar presente em todas as etapas na minha vida acadêmica, presença indispensável.

Agradeço à minha mãe **Maria Jordina Timóteo da Cunha**, ao meu pai **Antônio de Pádua Leme da Cunha** (in memoriam) e aos meus irmãos **Fernado Rogério Leme da Cunha**, **Cláudio Marcelo Leme da Cunha** e **Hugo Henrique Leme da Cunha** pelo incentivo desde o início.

Agradeço ao Prof. Dr. **Caio Abércio da Silva** toda sua equipe, pelo apoio dado ao projeto através da Fazenda Escola.

Agradeço aos pós graduandos e colegas de trabalho **Dauton Luiz Zulpo**, **Daniel Luiz de Barros**, **Alessandra Taroda** e **Michelle Igarashi** pelo compromisso assumido no projeto e pela amizade de valor sem igual.

Agradeço às Médicas Veterinárias **Valeska Bender Haydu** e pelas suas contribuições junto ao Biotério Central da UEL.

Agradeço aos Médicos Veterinários Residentes **Fernando Hamada**, **Jonatas Campos de Almeida**, **Lígia Mara Sandeski** e **Sérgio Tosi Cardim** pelo interesse, disposição e boa vontade junto às atividades.

Agradeço às servidoras **Elizabeth Regina Marangoni** e **Beatriz Nino** pelo apoio em todos os momentos.

Agradeço aos Estagiários **Hannah Lia Ettiene dos Santos**, **Felippe Danyel Cardoso Martins**, **Milaine Cristiane Custodio**, **Valdair Elemar Camargo Junior**, **Ana Sue**, **Joeleni dos Santos**, **Iara Inacio Pereira**, **Vanessa Figueredo Pereira**, **Ana Carolina Miura**, **Elio Alves Moreira Junior** pelas atividades realizadas e, sem eles, possivelmente não haveria condições para realizar os trabalhos.

Agradeço à todos os pós graduandos dos laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia.

Agradeço à todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão do projeto.

CUNHA, I. A. L. **Resposta imune de suínos imunizados pela via nasal com proteínas de roptrias do *Toxoplasma gondii***. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que pode acometer uma ampla variedade de hospedeiros inclusive o homem. Os herbívoros domésticos são as principais fontes de infecção para os seres humanos e a carne suína é considerada uma das mais importantes via de transmissão nesta doença. Nas últimas décadas houve um grande aumento no número de tecnologias e pesquisas para a produção de imunógenos. No entanto, apenas uma vacina comercial (Toxovax, lançada em 1992), para uso em ovinos, encontra-se disponível no Reino Unido. Esta vacina apresenta uma série de inconvenientes como risco de contaminação, baixo tempo de conservação, apresentação de sinais clínicos pelo animal e não pode ser usada durante a gestação. O desenvolvimento de vacinas não infectantes tais como vacinas de subunidades, vacina de DNA, assim como vacinas com proteínas recombinantes do *T. gondii*, devem ser estimulados. O presente estudo tem como objetivos avaliar a imunidade humoral e celular em suínos imunizados pela via nasal com proteínas de roptrias do *T. gondii* associadas ao imunostimulante Quil-A. As roptrias foram obtidas a partir do rompimento mecânico de taquizoítas da cepa LIV-5 e posteriormente separados por gradiente isopínico de sacarose. Foram utilizados 13 suínos mestiços, divididos em três grupos, G1 (n=6) receberam proteínas de roptrias (200 µg) associadas ao Quil-A (50 µg), G2 (n=4) e G3 (n=3) receberam Quil-A (50 µg) e PBS, respectivamente. Todos os tratamentos foram administrados pela via nasal nos dias 0, 21 e 42. No dia 49 dois animais do G1 foram eutanasiados e realizada coleta de sangue e linfonodos mesentéricos para avaliação da imunidade celular, através do teste de proliferação de linfócitos e os demais animais desse estudo foram desafiados com 10^3 oocistos infectantes da cepa VEG. Sinais clínicos e temperatura foram analisados antes e depois do desafio. A imunidade humoral (IgG e IgM) foi avaliada nos dias 0, 21, 42, 49, 64, 79 utilizando o Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). A presença de cistos nos cérebros dos suínos foi avaliada pela técnica de bioensaio em camundongos. O único sinal clínico observado nos suínos foi febre do 6° ao 8° dia após o desafio. Cinco de seis animais do G1 produziram anticorpos acima do ponto de corte, sete dias após três doses do imunógeno (dia 49), onde três suínos produziram níveis de anticorpos tanto para IgG quanto para IgM e os outros dois responderam somente para IgM. Houve maior proliferação celular específica contra proteínas de roptrias nos linfócitos coletados dos linfonodos mesentéricos, comparados aos do sangue. Proteção parcial contra formação de cistos teciduais foi observada no G1, quando comparado com o G3. Os fatores de proteção foram de 41,6% e 6,5%, no G1 e G2, respectivamente. Como conclusão, os animais foram estimulados parcialmente na resposta imune humoral, porém, apresentaram estímulo para a resposta imune celular tanto local como sistêmica.

Palavras-chave: Proteínas. Roptrias. Toxoplasmose. Vacina. Proteção. Via nasal.

CUNHA, I. A. L. **Humoral and cellular immune responses in pigs immunized by intranasal route with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii***. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that infects a wide range of hosts including human beings. Herbivores are the main domestic infection sources for humans, and pork is considered the most important route of transmission. Recent decades have witnessed a great increasing in the number of technologies and immunological research to produce new vaccines. However, only one commercial vaccine (Toxovax, launched in 1992) for use in sheep is available in the UK. However, it is infective for humans, expensive, and has a short shelf-life. The development of non-infective vaccines such as subunit vaccines, DNA vaccine, as well as vaccination with recombinant proteins of *T. gondii*, should be encouraged. This study aims to evaluate the humoral and cellular immunity in pigs immunized intranasally with *T. gondii* rhoptry protein plus Quil-A. The rhoptries were obtained from the mechanical disruption of *T. gondii* tachyzoites of LIV-5 strain and subsequently separated by sucrose gradient. We used 13 crossbred pigs, divided into three groups, G1 (n = 6) received rhoptry proteins (200 µg) associated with Quil-A (50 µg), G2 (n = 4), and G3 (n = 3) which received Quil -A (50 µg) and PBS, respectively. All treatments were administered by nasal route on days 0, 21 and 42. On day 49, two animals from G1 were euthanized. Blood and mesenteric lymph nodes (LNM) were collected for evaluation of cellular immunity, through the test of lymphocyte proliferation and the other animals this study were challenged with 10³ infective oocysts of the VEG strain. Clinical signs and temperature were analyzed before and after challenge. The humoral response (IgG and IgM) was evaluated on days 0, 21, 42, 49, 64, 79 using indirect immunoenzymatic test (ELISA). The presence of cysts in the brains of pigs was analyzed by bioassay in mice. The only clinical sign was fever observed in pigs from the 6th to 8th day after challenge. Five out of six animals from G1 had antibodies above cut-off at challenge day. Three from these five animals had both IgM and IgG responses, however, two animals showed just IgM response. There was a greater proliferation against *T. gondii* rhoptry proteins in lymphocytes collected from LNM compared to the blood cells. Partial protection against tissue cysts formation was observed in G1 compared to G3. The protection factors were 41.6% and 6.5% in G1 and G2, respectively. In conclusion, the animals were stimulated in part in humoral immune response, however, gave encouragement to the cellular immune response both locally and systemically.

Keywords: Proteins. Rhoptries. Toxoplasmosis. Vaccinations. Protection. Nasal route.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Mean rectal temperatures of the G1, G2 and G3 pigs. At days 0, 21 and 42, the G1 was vaccinated with *T. gondii* rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A and G3 received only saline. On the day 49 all animals were challenged (black arrow) with 10^3 oocysts of the *T. gondii* VEG strain. On day 94, animals were Killed 42
- Figura 2** – IgG antibody response measure by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in pigs of the G1, G2 and G3. The G1 was vaccinated with *T. gondii* rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A, and G3 received only saline. The treatments were performed by nasal route at days 0, 21 and 42 (black arrows). At day 49 all groups received a challenge route of the 10^3 oocysts of the *T. gondii* VEG strain (dashed arrow) and at day 94 all animals were slaughtered. Dashed line indicates positive cutt-off 43
- Figura 3** – IgM antibody response measure by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in pigs of the G1, G2 and G3. The G1 was vaccinated with *T. gondii* rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A, and G3 received only saline. The treatments were performed by nasal route at days 0, 21 and 42 (black arrows). At day 49 all groups received a challenge route of the 10^3 oocysts of the *T. gondii* VEG strain (dashed arrow) and at day 94 all animals were slaughtered. Dashed line indicates positive cutt-off 44
- Figura 4** – Proliferation assays of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and lymphocytes from mesenteric lymph nodes (LNM) of G1 (vaccinated with $200\mu\text{g}$ of *T. gondii* rhoptries proteins). The lymphocyte stimulation was performed using 5, 10 and $15\mu\text{g}$ of *T. gondii* rhoptries and the positive control stimulated with 1% of Phitohemaglutinin (PHA-M).The continuous line indicates the cutoff point..... 45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Frequência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em suínos no Brasil	20
Quadro 2 – Estudos de avaliação da resposta imune contra toxoplasmose realizados em suínos	21

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Experimental design indicating the division of groups, number of animals and the main steps developed in the experiment 46
- Tabela 2** – Anti-*Toxoplasma gondii* antibody responses from animals immunized by nasal route with crude *T. gondii* rhoptry proteins (G1) after third dose (day 49)..... 46
- Tabela 3** – Outcome of *Toxoplasma gondii* tissue cysts, by mouse bioassays, in brains of pigs that were challenged with oocysts of VEG strain after receiving *T. gondii* rhoptry protein, Quil-A and saline by nasal route..... 47

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA – VACINAS CONTRA TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS	14
1.3 RESPOSTA IMUNE	16
1.4 VACINAS	17
REFERÊNCIAS	22
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3 ARTIGO – HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN PIGS IMMUNIZED BY INTRANASAL ROUTE WITH CRUDE RHOPTRY PROTEINS OF THE <i>Toxoplasma gondii</i> PLUS QUIL-A	33
CONCLUSÃO	51

1 REVISÃO DE LITERATURA: VACINAS CONTRA TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS

1.1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, espécie pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccídia, Família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (MONTROYA; LIESENFELD 2004). É um parasita intracelular obrigatório (JACOBS; LUNDE, 1957) que tem ampla prevalência em seres humanos e em animais em todo o mundo (DUBEY, 2009). Aproximadamente um terço da população mundial humana está cronicamente infectado pela *T. gondii* (JACOBS; LUNDE, 1957).

Foi primeiramente descrito por Splendore (1908) que isolou o parasita em um coelho de laboratório em São Paulo e posteriormente Nicolle e Manceaux (1908) no Instituto Pasteur de Túnis na Tunísia descreveram em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) da África do Sul. Ambos os grupos relacionaram a nova descoberta com *Leishmania* e, somente em 1909, Nicolle e Manceaux reclassificaram o novo parasita como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

O *T. gondii* é estruturalmente formado por uma membrana externa, anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, microtúbulos, retículo endoplasmático, complexo de golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e um núcleo com parede bem definida (DUBEY, 1994; METSIS; PETERSEN, 1995). Possui três estágios de infecção: taquizoítos, bradizoítos (cistos em tecidos) e esporozoítos (oocistos) (DUBEY, 1994). O parasita é intracelular obrigatório e possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de células nucleadas, tecidos e hospedeiros (CARRUTHERS, 2002). Devido às suas características biológicas, tem sido utilizado como importante modelo para estudos biológicos do filo Apicomplexa (ROOS et al., 1999).

Apesar de ter sido identificado no começo do século XX, apenas no início da década de 70 é que foram descritos os hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970; MILLER et al., 1972).

Os gatos domésticos e felídeos selvagens são os únicos hospedeiros definitivos do parasita, sendo os únicos a eliminarem oocistos pelas fezes (FRENKEL et al., 1970). No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a fase de esquizogonia, levando à formação

dos oocistos. Os gatos podem eliminar oocistos após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos (DENKERS, 1993). Os oocistos são eliminados através das fezes sob a forma não esporulada (não infectante) e a esporulação ocorre no meio ambiente entre 1 a 5 dias dependendo das condições de temperatura e umidade (DUBEY et al., 1998).

Entre os hospedeiros intermediários, estão os carnívoros terrestres, incluindo o homem e os animais domésticos, as aves e os mamíferos marinhos (MILLER et al., 1972; CARRUTHERS, 2002). Hospedeiros intermediários podem adquirir o *T. gondii* pela ingestão de tecidos de animais infectados com cistos, alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, ou por transmissão transplacentária (DUBEY, 1994).

Normalmente, *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos (FISHER et al., 1998), porém, estes estão relacionados à espécie, idade do hospedeiro, prenhes, “status” imunológico, condição nutricional, quantidade de inoculo do parasita, estágio infectivo do parasita, e infecções concomitantes (DUBEY, 1994; DUBEY; BAKER; DAVIS, 1994; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY et al., 2008). É capaz de causar uma doença congênita severa em fetos, encefalites em indivíduos imunossuprimidos e alterações oculares em animais e humanos (DUBEY, 1994; KUMOLOSI et al., 1996; FISHER et al., 1998; JACOBS et al., 1998; SILVEIRA et al., 2003).

A disseminação da infecção no ser humano é favorecida pela alta prevalência da infecção nos animais domésticos. Entre os animais destinados à alimentação humana, suínos, ovinos, e caprinos são mais propensos a infecção que eqüinos e bovinos. (NAVARRO et al., 1992; DUBEY, 1994). O risco de adquirir a infecção pelo consumo de carnes cruas ou mal cozidas, fato comum em várias regiões do Brasil, é relatado por VIDOTTO et al. (1990), NAVARRO et al., (1992) e DIAS et al. (2005).

A toxoplasmose em humanos ocorre com frequência sob a forma de infecção crônica e assintomática e é encontrada em todos os continentes, inclusive no continente Antártico. De uma forma geral, a prevalência é maior na América Latina quando comparada com a América do Norte e Leste da Ásia (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009) e a prevalência encontrada em gestantes varia de 4% na Coreia a 92% no Brasil (RYU et al., 1996; FIGUEIRO-FILHO et al., 2005). O Brasil apresenta índices que se encontram entre os mais elevados do mundo, com prevalências variando entre 37% e 91% (DETANICO; BASSO, 2006; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2005; MANDAI; LOPES; MITSUKA-BREGANÓ, 2007; LAGO et al., 2009). Nos Estados Unidos e Reino Unido a prevalência estimada é de 16 a 40%, na América Central e do Sul e na Europa, a prevalência é de aproximadamente 50 a 80% (TENDER; HECKEROTH; WEISS, 2000; JONES et al., 2001).

A toxoplasmose ocular pós-natal pode ocorrer concomitantemente com a infecção sistêmica ou após um determinado intervalo de tempo, já observada alguns anos após a infecção (STEHLING; ORÉFICE, 1996) e pode comprometer de forma irreversível a visão (SILVEIRA et al., 2000). Foi tradicionalmente considerada uma doença de manifestação congênita (GLASNER et al, 1992;. GILBERT; STANFORD, 1999), no entanto, alguns estudos (HOLLAND, 2003; STANFORD; TAN; GILBERT, 2006) mostram que a maioria dos casos são devido à doença adquirida, o que significa que toda a população pode potencialmente desenvolvê-la e não somente indivíduos com toxoplasmose congênita (TC). Aproximadamente 2/3 dos pacientes que apresentam toxoplasmose ocular adquiriram a infecção após o nascimento em vez da forma congênita (GILBERT; STANFORD, 1999). Quantidades significativas de casos de doença adquirida foram relatadas por Gilbert; Stanford (1999); Silveira; Belfort; Burnier (1987); Glasner et al. (1992); Belfort Jr et al. (1999) onde foram analisadas aproximadamente 150 famílias com irmãos não gêmeos com lesões oculares e também, mães com sorologia negativa e filhos com lesões oculares.

Apesar da baixa incidência da TC seu impacto econômico é elevado e está relacionado à gravidade da infecção, complicações associadas, tratamento e custos sociais. (ROBERTS et al., 1990, 1994). A infecção materna no início da gestação, pode causar aborto ou más-formações fetais e as crianças podem apresentar hidrocefalia, coriorretinite, calcificação cerebral e retardo mental (DUNN et al., 1999), conhecida como a Tétrade de Sabin (SABIN, 1942) ou podem nascer normais e desenvolver sequelas durante a infância ou na fase adulta. Mitsuka-Breganó; Lopes; Navarro (2009) propuseram medidas relacionadas ao diagnóstico, tratamento e condutas das gestantes com objetivo de evitar a TC.

1.2 TOXOPLASMOSE EM SUÍNOS

A toxoplasmose em suínos foi descrita pela primeira vez nos EUA por Farrel et al. (1952). No Brasil, o primeiro relato dessa parasitose em suínos foi feito por Silva (1959) que descreveu um caso no estado de Minas Gerais baseado no diagnóstico histológico. Posteriormente, Amaral et al. (1969), em São Paulo, e Schenk; Lima; Viana (1976), em Minas Gerais, isolaram o parasita do diafragma e do cérebro de suínos, clinicamente sadios, abatidos para consumo humano.

Cistos teciduais em suínos podem persistir por mais de dois anos, por isso, a carne suína é considerada uma das principais vias de transmissão para os seres humanos (DUBEY et al., 1991a; DUBEY, 1994; DUBEY et al., 1998). Segundo Dubey e Jones (2008), uma taxa de infecção de 1% equivaleria a um milhão de suínos infectados destinados ao consumo humano nos EUA. Um suíno de 50 kg comercializado seria responsável por mais de 300 porções de carne e estima-se que um animal possa ser consumido por 200-400 pessoas, pois muitos subprodutos são produzidos com carne suína (FEHLHABER et al., 2002).

Em um estudo realizado nos EUA, uma diminuição significativa do risco de infecção pelo *T. gondii* foi encontrada em membros do grupo religioso Adventistas do Sétimo Dia. Segundo os autores, um possível fator de proteção estava relacionado à alimentação dos membros dessa comunidade que, por razões religiosas, mantinham uma dieta ovo-lacto-vegetariana que não contém nenhuma carne, frutos do mar ou aves (ROGHMANN et al., 1999).

Em um inquérito nacional de base populacional realizado nos EUA em 1983-1984, a soroprevalência foi de 23% em suínos destinados ao abate e 42% em fêmeas matrizes (DUBEY et al. 1991a). Quando os animais de algumas dessas áreas foram testados em 1992, a soroprevalência de *T. gondii* caiu para 20,8% em animais de cria e 3,1% em animais de terminação (DUBEY et al., 1995). Houve um constante declínio na prevalência de *T. gondii* em suínos em quatro inquéritos realizados nos EUA em 1990 (10,05%), 1996 (20%), 1998 (3,2-15%) e 2009 (2,65%) (ZIMMERMAN et al., 1990; PATTON et al., 1996; PATTON et al., 1998; HILL et al., 2010).

Na década de 90 a soroprevalências em suínos, em alguns países europeus, também diminuiu em razão do manejo intensivo (DUBEY, 2009). Na Áustria, a soroprevalência de 14% em 1982 diminuiu para 0,9% em 1992 (EDELHOFER, 1994) e posteriormente, anticorpos contra *T. gondii* foram detectados pela técnica de ELISA em 42 dos 807 (5,2%) amostras de suco de carne de suínos na Suécia (LUNDE'N et al., 2002).

No Brasil, na região norte do estado do Paraná, também se observou uma diminuição na soroprevalência para a toxoplasmose em 2003 (15,35%) e 2005 (4%) (TSUITSUI et al., 2003; CARLETTI et al., 2005), quando comparado aos resultados de Vidotto et al. (1990) (37,84%) e Garcia et al. (1999) (24%).

Em diversos estudos sorológicos para toxoplasmose em suínos de diferentes categorias realizados no Brasil (Quadro 1) a prevalência tem variado de 4% a 37,84% (CARLETTI et al., 2005; FIALHO e ARAUJO, 2003; GARCIA et al., 1999; SUARÉZ-

ARANDA et al., 2000; TSUTSUI, et al., 2003; VIDOTTO et al., 1990) com extremos variando de 0% (BRANDÃO et al., 2006) a 90,4% (GUIMARÃES et al., 1992).

Esse declínio pode estar relacionado às modernas técnicas de criação intensiva de suínos (HOVE et al., 2005; DUBEY, 2009). No entanto existe uma tendência recente de criação de suínos orgânicos ou extensivos que pode levar ao aumento da soroprevalência nesses animais (MEERBURG et al., 2004, 2006; VAN DER GIESSEN et al. 2007; KIJLSTRA et al. 2004a, 2004b, 2008).

Na província de Yunnan, no sudoeste da China, anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 16,97% (141/831) das amostras, sendo os suínos para abate com a maior taxa (22,28%), seguido de fêmeas reprodutoras (16,59%), utilizando o teste de hemaglutinação indireta (HI) (ZOU et al., 2009).

1.3 RESPOSTA IMUNE

Nishi (2004) investigou a expressão de genes associados à resposta imune em suínos inoculados pela via oral com oocistos da cepa VEG. Como em seres humanos e murinos, os suínos apresentaram uma resposta inicial relacionada a mecanismos inatos e de inflamação aguda, com expressão de interleucina (IL)-1, IL-6, interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α .

Após a fase aguda, ocorre inibição da proliferação intracelular do parasita e o desaparecimento de taquizoítas viáveis, associada à presença de altos títulos de anticorpos específicos. Nessa fase crônica, os parasitas permanecem como bradizoítas em cistos teciduais no organismo do hospedeiro (FRENKEL, 1990; WASTUNG et al., 1995).

Isoladamente a resposta imune humoral não é suficiente para promover imunidade no hospedeiro, provavelmente, devido à localização intracelular do parasita. Vários autores têm demonstrado a importância da resposta imune celular no combate à infecção (BUXTON et al., 1989; FRENKEL, 1990; KHAN et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992; DENKERS et al., 1993).

A principal porta de entrada do *T. gondii* é a via oral, portanto a imunidade local de mucosa, via linfócitos (principalmente linfócitos intra-epiteliais que apresentam atividade CD8⁺) e IgA são de fundamental importância na proteção contra o parasita (BOURGUIN et al., 1993; VELGE-ROUSSEL; MARCELO; LEPAGE, 2000).

1.4 VACINAS

A vacinação dos animais domésticos pode ser uma das estratégias para o controle do *T. gondii* e tem dois objetivos, reduzir as perdas econômicas provocada pelos danos reprodutivos e reduzir o número de cistos teciduais. Assim, pode-se diminuir o risco da infecção ao homem pela ingestão de cistos em carnes cruas ou mal cozidas (DUBEY, 1996).

Embora a vacinação seja uma medida importante no controle da toxoplasmose, atualmente, apenas uma vacina (TOXOVAX[®]) é comercializada para uso em ovinos, mas apresenta alguns inconvenientes, como risco de contaminação do operador, tem alto custo, além de levar o animal a apresentar sinais clínicos e não pode ser administrada próximo às estações de monta ou durante a gestação (BUXTON et al., 1993).

Uma vacina que promova imunidade protetora adequada contra o *T. gondii* deve conter proteínas que são expressas nos três estágios infectantes do parasita (esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto) e deve ser administrada pela via correta. Assim o uso proteínas que são expressas em comum nesses três estágios e a escolha do local adequado para a imunização, são de fundamental importância para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (SPEER et al., 1995; GARCIA et al., 2004).

O uso de vacinas pela via nasal associadas a adjuvantes apropriados podem induzir uma resposta imune tanto local como sistêmica (VELGE-ROUSSEL et al., 2000) e requer menos antígenos que a via oral, devido à menor atividade proteolítica. Considerando que a porta de entrada natural do *T. gondii* é a superfície da mucosa do intestino, Bonenfant et al. (2001) ressalta a importância do desenvolvimento de uma vacina que estimule a proteção de mucosa.

Esta via tem sido utilizada com sucesso para diminuir a formação de cistos teciduais em camundongos. Igarashi et al. (2008) encontrou redução na formação de cistos teciduais utilizando as proteínas recombinantes ROP2, GRA1 e GRA7 e toxina colérica como adjuvantes. A imunização de mucosa também foi estudada em camundongos através de vacinas administradas pela via nasal com proteínas SAG 1 e toxina colérica (DEBARD et al., 1996; VELGE-ROUSSEL et al., 2000) ou endotoxinas (BONENFANT et al., 2001) como adjuvantes, onde foram observadas imunidade local e sistêmica e redução do número de cistos teciduais quando comparados ao grupo controle. Garcia et al. (2007) e Zulpo (2010) encontraram diminuição da eliminação de oocistos por gatos, após administração de proteínas de roptrias pela via nasal.

Em suínos os principais estudos sobre avaliação da resposta imune se iniciaram na década de 90 (Quadro 2).

Dubey et al. (1991b) inoculou suínos com 10^3 taquizoítos da cepa RH pela via subcutânea e verificou febre (39,4 a 40,1°C) do 3° ao 8° dia e após inocular 10^5 taquizoítas com a mesma cepa e pela mesma via, Dubey et al. (1994b) verificaram a persistência nos tecidos por até 14 dias e imunidade protetora iniciada sete dias após a vacinação, permanecendo durante sete meses.

Dubey et al. (1991b) vacinaram suínos com 10^6 taquizoítos da cepa RH e desafiou-os com 10^4 e 10^5 oocistos esporulados de um pool de 10 cepas (P10) (Me-49, GT-1, PT-2, Aldrin e outras seis cepas isoladas em suínos) e encontrou menor infecção nos animais vacinados, utilizando a técnica de bioensaio em camundongos, comparados ao grupo controle. A porcentagem de camundongos positivos para *T. gondii* inoculados com tecidos digeridos de animais não vacinados foi maior (60%) quando comparados com camundongos inoculados com tecidos dos animais vacinados (31,6% - tecidos digeridos; 18,3% - tecidos não digeridos). Em outro trabalho, Dubey et al. (1994) não isolaram *T. gondii* nos quatro suínos vacinados com 10^5 taquizoítas da cepa RH e desafiados com 10^3 oocistos de P10, enquanto que nos animais não vacinados, isolaram o parasita no cérebro de três suínos, e também na língua e no coração de dois e de um animal, respectivamente.

Da mesma forma, Pinckney et al. (1994) estudaram a segurança e a eficácia na prevenção de formação de cistos teciduais através da imunização com a cepa Ts-4 em suínos jovens, nenhum dos animais dos grupos que receberam a vacina com Ts-4 desenvolveram sinais clínicos ou morreram, nem se conseguiu recuperar essa cepa dos tecidos dos animais inoculados, porém, após desafio com outra cepa cistogênica a Ts-4 não preveniu contra a formação de cistos teciduais, o que demonstra a necessidade de mais estudos para avaliar a capacidade desta cepa em prevenir a formação de cistos em suínos.

Suínos alimentados com oocistos de *T. gondii* irradiados com 0,4 kGy de céσιο desenvolveram imunidade protetora. Após desafio com oocistos letais, permaneceram clinicamente normais, mas desenvolveram cistos teciduais, concluindo que a reinfecção não foi impedida (DUBEY et al., 1998).

Freire et al. (2003) imunizaram suínos com uma vacina utilizando-se de antígenos de superfície do *T. gondii* incorporados ao Complexo Imuno Estimulante (ISCOM) e, após o desafio verificaram que a vacina foi capaz de estimular uma forte resposta imune humoral.

Kringel et al., (2004) vacinaram suínos com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* com oligodeoxynucleotídeos (ODN) sintéticos específicos de suínos e imunostimulador (CpG) (dias 0 e 26) e desafiaram com 10^4 oocistos infectantes da cepa VEG (dia 49). Após as imunizações, títulos IgG anti-*T. gondii*, analisados pela técnica do MAT até 10 vezes maior nos grupos vacinados comparado com o controle antes do desafio. Após o desafio, os autores observaram proteção clínica significativa nos animais vacinados, onde não encontram alteração na temperatura dos animais vacinados comparados ao controle. Os autores relatam também, que 52% dos animais vacinados não desenvolveram cistos teciduais.

Garcia et al. (2005) utilizaram proteínas brutas de roptrias do *T. gondii* incorporadas ao ISCOM administradas pela via sub-cutânea em suínos e, após desafio, verificaram proteção parcial contra formação de cistos no grupo vacinado, quando comparado ao grupo controle positivo, mas não observou proteção contra manifestação clínica. Relata ainda, que a imunização sistêmica não foi eficaz em estimular uma proteção de mucosa intestinal.

Jongert et al. (2008) estudaram uma vacina contendo “pool” de plasmídeos expressando as proteínas GRA1 e GRA7 administrada duas vezes (dias 0 e 21) pela via intradérmica em suínos e desafiaram (dia 49) com 2×10^3 cistos de *T. gondii* da cepa IPB-G pela via intraperitoneal. Após as imunizações os autores verificaram alta resposta de IgG e resposta imune celular específica contra as proteínas GRA1 e GRA7 estudadas. Após o desafio foram detectados altos títulos de IgG contra as proteínas GRA1 e GRA7 comparada ao grupo controle. Os autores relataram a possibilidade deste tipo de vacina proteger contra a formação de cistos teciduais.

Região/Estado	% Positivos	Categoria ¹	Teste ²	Referência	
Centro Oeste					
Goiás	27,7	m	HAI	Matos et al. (1999)	
Mato Grosso	12,8	m	RIFI	Murano et al. (2010)	
Nordeste					
Bahia	14,8; 31,9	g; rus	ELISA	Bezerra et al. (2009)	
Paraíba	36,2	-	RIFI	Gennari et al. (2009)	
Pernambuco	4,7	g	RIFI	Caporali et al. (2005)	
Norte					
Rondônia	33,5; 37,5	g; g	MAT; RIFI	Cavalcante et al. (2006)	
Sudeste					
Minas Gerais	29,9	-	RIFI	Schenk et al. (1976)	
	90,4	si	RIFI	Guimarães et al. (1992)	
Rio de Janeiro	0	g	-	Brandão et al. (2006)	
	0	a	MAT	Pezerico et al. (2007)	
	65,8	g	RIFI	Bonna et al. (2006)	
	São Paulo	10	-	SF	Sogorb et al. (1972)
		22,8	a	HAI	Amaral et al. (1975)
		25,7; 19,1	a; g	RIFI	Correa et al. (1978)
		32,8	a	RIFI	Ishizuka et al. (1978)
		24,6	g	HAI	Santos et al. (1978)
		47	g	RIFI	Vasconcelos et al. (1979)
		57,9; 42,1	a; a	RIFI; HA	D'Angelino et al. (1986)
		9,6; 21	a; a	ELISA; HA	Suaréz-Aranda et al. (2000)
		0,8; 1,32	g; g	RIFI; MAT	Caporali et al. (2005)
		17	a	MAT	Dos Santos et al. (2005)
		8,5	a	RIFI	Lima et al. (2007)
		20,2	g	MAT	Oliveira et al. (2007)
		0	a	MAT	Pezerico et al. (2007)
6,5; 35		g; a	MAT	Fornazari et al. (2009)	
Sul					
Paraná	37,8	g	RIFI	Vidotto et al. (1990)	
	24	g	RIFI	Garcia et al. (1999)	
	1,2; 3,8; 10,4	ch; ma; m	RIFI	Tsutsui et al. (2003)	
	2,8; 20,7	tr; m	RIFI	Carletti et al. (2005)	
	8,5	a	RIFI	Moura et al. (2007)	
	1,8; 23,1	a; g	MAT	Da Silva et al. (2008)	
	23,3; 33,7	tr; ad	RIFI	Millar et al. (2008)	
	Rio Grande do Sul	18	a	HAI	Grünspan et al. (1995)
14; 16,7		a; a	RIFI; ELISA	Araújo et al. (1998)	
33,7; 20		a; a	RIFI; HAI	Fialho et al. (2003)	
Santa Catarina	1,2	g	HAI	Wentz et al. (1988)	
	45,6; 86,1	g	MAT	Silva et al. (2000)	

Quadro 1 - Frequência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos no Brasil. ¹ a: abatedouro; ad: adulto; g: granja; m: matriz; rus: rústico; ch: cachação; ma: marrã; si: semi-intensivo; tr: terminação; ² HAI: Sabin-Feldman; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; HA: hemaglutinação indireta; MAT: aglutinação direta; ELISA: ensaio imunoenzimático

Imunógenos	Desafio	Testes	Principais Resultados	Referências
10 ⁶ RH ^T ; im	10 ⁴ , 10 ⁵ (10 cepas) ^{ooc} ;	MAT; bio	Proteção contra sinais clínicos; redução do número de cistos teciduais	Dubey et al. (1991b)
10 ⁵ RH ^T ; Uma dise; im	10 ³ (10 cepas) ^{ooc} ;	MAT; bio; hist; imu	Proteção contra sinais clínicos e formação de lesões; redução do número de cistos teciduais	Dubey et al. (1994)
3x10 ⁵ TS-4 ^T ; 0, 14; sc	8x10 ⁴ GT-1 ^{ooc}	MAT; bio; hist; imu	Redução do número de cistos teciduais	Pinckney et al. (1994)
10 ⁵ VEG ^{ooc} (0,3; 0,4 kGy ¹³⁷ Cs) 0, 38; vo	10 ⁵ ; 10 ⁶ VEG ^{ooc} ;	MAT; bio	Proteção contra sinais clínicos	Dubey et al. (1998)
Ag. superfície LIV-5 (ISCOM); sc.	5x10 ⁴ AS-28 ^{ooc}	RIFI	Resposta imune humoral	Freire et al. (2003)
RH ^T (CPG ODN); im	10 ⁴ VEG ^{ooc}	MAT; ELISA; bio	Proteção parcial	Kringel et al. (2004)
Roptrias (ISCOM); im.	VEG ^{ooc}	ELISA; bio	Proteção Parcial	Garcia et al. (2005)
β-Glucana;	10 ⁷ RH ^T ; im	RIFI	Sem proteção	Bugni et al. (2008)
DNA GRA1-GRA7; (0, 21); id	2x10 ³ IPB-G ^{ooc} ; ip.	ELISA; pc; bio; PCR	Resposta imune humoral e celular	Jongert et al. (2008)

Quadro 2 - Estudos de avaliação da resposta imune contra toxoplasmose realizados em suínos. ^TTaquizoítas; ^{ooc}Oocistos; bio: bioensaio; ELISA: ensaio imunoenzimático; hist: exame histopatológico; id: intradérmica; im: via intramuscular; imu: exame imunohistoquímico; ip: via intraperitoneal; MAT: teste de aglutinação rodificado; pc: ploriferação celular; PCR: reação em cadeia da polimerase; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; sc: via subcutânea; vo: via oral;

REFERÊNCIAS

- AMARAL, V.; MACRUZ, R. *Toxoplasma gondii*, isolamento de amostras a partir de diafragmas de suínos clinicamente sadios, abatidos em matadouros de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 47-54, 1969
- AMARAL, V. D. °; SANTOS, S. M.; REBOUÇAS, M. M. Estudos preliminares sobre a prevalência de anticorpos anti-*toxoplasma*, por hemaglutinação, em soros de suínos provenientes dos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, Brasil. **Biológico**, v. 41, p. 105-107, 1975
- ARAÚJO, F. A. P.; SANTOS, J. R.; SOUZA, W. J. S. Detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected pigs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the area of great Erechim, RS, Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, p. 57-65, 1998.
- BELFORT, J. R. .; SILVEIRA, C.; MUCCIOLI C. **et al.** Incidence of acquired ocular toxoplasmosis seroconversion and clinical course in a prospective study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40 (4 Suppl), p. 383, 1999.
- BEZERRA, R. A.; PARANHOS, E. B.; DEL'ARCO , A. E.; et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 78-80, 2009.
- BONENFANT, C.; DIMIER-POISSON, I.; VELGE-ROUSSEL. et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat- labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605-1612, 2001.
- BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F. B.; COSTA, T. et al. Estudo soropidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. Resultados da pesquisa. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, p. 186-189, 2006
- BOURGUIN, I.; CHARDES, T.; BOUT, D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhances protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 2082-2088, 1993.
- BRANDÃO, G. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, n. 2, p. 143-149, 2006.
- BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**. v. 13, p. 143-149, 2006.
- BUXTON, D.; UGGLA, U.; LÖVGREN, B. K. et al. Trial of a novel experimental *Toxoplasma* iscom vaccine in pregnant sheep. **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 451-457, 1989.
- BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitology Today**, v. 9, p. 335-337, 1993.

- CAPORALI, E. H. G.; SILVA, A. V.; MENDONÇA, A. O. et al. Comparação de métodos para determinação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos dos Estados de São Paulo e Pernambuco. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, p. 19-24, 2005
- CARLETTI, R. T.; FREIRE, R. L.; SHIMADA, M. D. et al. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 4, p. 563-568, out./dez, 2005
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111–122, 2002.
- CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 863-864, 2006.
- CORREA, F. M. A.; SALATA, E.; OLIVEIRA, M. R. *Toxoplasma gondii*: diagnóstico, pela prova de imunofluorescência indireta em suínos no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 45, p. 209-212, 1978.
- D'ANGELINO, J. L.; ISCHIZUKA, M. M. Toxoplasmose suína: Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. **Bol of Sanit Panam**, v. 100, p. 634-647, 1986.
- DA SILVA, A. V.; BOARETO, H.; ISBRECHT, F. B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. **Vet Zootec**, v. 15, p. 263-266, 2008
- DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, P. et al. Emergence of NK1.1+ cell as effector of INF- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I – deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1465-72, 1993.
- DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, p. 15-18, 2006.
- DIAS, R. A. F., NAVARRO, I. T., RUFFOLO, B. B., et al.. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Parana State, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 185–189, 2005.
- DOS SANTOS, C. B.; CARVALHO, A. C.; RAGOZO, A. M. et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 207-211, 2005.
- DUBEY, J. P., LEIGHTY, J. C., BEAL, V. C. et al. National seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs. **International Journal for Parasitology**, v. 77, p. 517–521, 1991a.
- DUBEY, J. P.; URBAN, J. F.; DAVIS, S. W. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 1316-1319, 1991b.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593–1598, 1994.

- DUBEY, J. P.; BAKER, D. G.; DAVIS, S. W. et al. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, p. 982-987, 1994.
- DUBEY, J. P.; WEIGEL, R. M.; SIEGEL, A. M. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **International Journal for Parasitology**, v. 81, p. 723–729. 1995.
- DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.
- DUBEY, J. P., LUNNEY, J. K., SHEN, S. K. et al. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 749-752, 1998.
- DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L. et al. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082–1093, 2005.
- DUBEY, J. P.; JONES, J. L.; *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009.
- DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counseling. **Lancet**, v. 353, p. 1829-1833, 1999
- EDELHOFER, R. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria—an evaluation of data from 1982 and 1992. **Parasitology Research**, v. 80, p. 642–644, 1994
- FARREL, R. L.; DOCTON, F. L.; CHAMBERLAIN, D. M. et al. Toxoplasmosis: 1. Toxoplasma isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, p. 181-185, 1952.
- FEHLHABER, K., HINTERSDORF, P., KRUGER, G. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs of different management systems and in minced meat. **Fleischwirtschaft**, v. 83, p. 97–99, 2002
- FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 893-897, 2003.
- FIGUEIRO-FILHO, E. A.; LOPES, A. H. A.; SENE FONTE, F. R. A. et al., 2005. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, p. 442–449. In Portuguese.
- FISHER, H. G.; STACHELHAUS, S.; SAHM, M. et al. GRA7, an excretory 29 KDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 251-262, 1998.

- FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; SILVA, R. C. et al. *Toxoplasma gondii* infection in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 333-334, 2009.
- FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. et al. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (ISCOMS). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 388-396, 2003.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.
- FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 233-240, 1990.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.
- GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T. et al. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into ISCOM. **Experimental Parasitology**, v. 108, p. 40-46, 2004.
- GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T. et al. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 209-217, 2005.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; BIAZZONO, L. et al. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 197-206, 2007.
- 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*. **Journal of Immunology**, v. 149, n.1, p. 175-180, 1992.
- GENNARI, S. M.; AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. J. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. In: 22nd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2009 Sep 6-10; Calgary, Canada. Calgary: WAAVP, 2009
- GILBERT, R. E.; STANFORD, M. R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? **British Journal of Ophthalmology**, v. 84, 224-226, 1999.
- GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUSZONMORAN, D. et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, p. 136-144, 1992.
- GRÜNSPAN, E. D.; MOREIRA, W. S.; EDELWEISS, M. I. A. et al. Imunoglobulinas antitoxoplásmicas e retinocoroidite em suínos. **Ciência Rural**, v. 25, p. 261-264, 1995.

GUIMARÃES, A. M.; RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 69-71, 1992.

GUIMARÃES, A. M.; RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 69-71, 1992.

HILL, D. E.; HALEY, C.; WAGNER, B. et al. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in the U.S. swine herd using sera collected during the National Animal Health Monitoring Survey (Swine 2006). **Zoonosis Public Health**, v. 57, p. 53-59, fev. 2010.

HOLLAND, G. N. LX Edward Jackson memorial lecture – ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part 1: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, p. 973–988, 2003

HOVE, T.; LIND, P.; MUKARATIRWA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs reared under different management systems in Zimbabwe. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 231–237, 2005

IGARASHI, M.; KANO, F.; TAMEKUNI, K. et al. *Toxoplasma gondii* evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cysts formation in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 386-392, 2008.

ISHIZUKA, M. M. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta em suínos de matadouro do município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v. 15, p. 151-154, 1978.

JACOBS, D.; DUBREMETZ, J. F.; LOYENS, A. et al. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 237-249, 1998.

JACOBS, L.; LUNDE, F. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs and man. **Public Health Reports**, v. 72, n. 10, p. 872-882, 1957.

JONES, J. L.; KRUSZON-MORAN, D; WILSON, M. et al. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, n. 4, p. 357-365, 2001.

JONGERT, V.; MELKEBEEK, S.; DE CRAEYE, J. et al. An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. **Vaccine**, v. 26, p. 1025—1031, 2008.

KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 10, p. 3501-506, 1991.

- KIJLSTRA, A.; EISSEN, O. A.; CORNELISSEN, J. et al. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 3165–3169, 2004a.
- KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B. G.; MUL, M. F. et al. Animal-friendly production systems may cause re-emergence of *Toxoplasma gondii*. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, p. 119–132, 2004b.
- KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J. et al. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183–190, 2008.
- KRINGEL, H.; DUBEY, J. P.; BESHAI, E. CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 55–66, 2004.
- KUMOLOSASI, E.; BONHOMME, A.; BEROCHIA, A. et al. Kinetics study of the localization and quantitation of target antigens of immunoglobulin antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. **Parasitology Research**, v. 82, n. 5, p. 402-409, 1996.
- LAGO, E. G.; DE CARVALHO, R. L.; JUNGBLUT, R.; DA SILVA, V. B.; FIORI, R. M. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. **Scientia Medica**, v. 19, p. 27-34, 2009.
- LIESENFELD, O.; NGUYEN, T. A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1491-1493, 2001.
- LIMA, J. N.; FELÍCIO, P. S.; FRANCO, P. M. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) em suínos abatidos em matadouros no estado de São Paulo, SP, Brasil. **Biológico**, v. 67, p. 25-51, 2007.
- LUNDE, N. A.; LIND, P.; ENGVALL, E. O. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, p. 362–365, 2002.
- MANDAI, O. N.; LOPES, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R. Prevalência de anticorpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Londrina - Paraná, no período de 2003 e 2004. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 247-249, 2007.
- MATOS, M. P. C.; SOBESTIANSKY, J.; GAMBARINI, M. L. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia. **Hora Veterinária**, v. 19, n. 109, p. 9-11, 1995.
- MEERBURG, B. G.; BONDE, M.; BROM, F. W. A. et al. Towards sustainable management of rodents in organic animal husbandry. **Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 52, p. 195–205, 2004.
- MEERBURG, B. G.; VAN RIEL, J. W.; CORNELISSEN, J. B. et al. Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 6, p. 266–274, 2006.

- METSIS, A.; PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 472-479, 1995.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T et al. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região sudoeste do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 15-18, 2008.
- MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.
- MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES; F. M. R.; NAVARRO, I. T. **Toxoplasmose gestacional e congênita: manual de vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: EDUEL, 2009. no prelo. ISBN: 978-85-7216-519-8.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminar**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
- MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D. L. et al. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 54-56, 2007.
- MURARO, L. S.; CARAMORI-JÚNIOR, J. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum and Diamantino, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 254-255, 2010.
- NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N. et al. *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. **Semina**, Londrina, v. 13, p. 15-18, 1992.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de *Leishmania du gondi*. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 147, p. 736-766, 1908.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau *du gondi*. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 148, p. 369-372, 1909.
- NISHI, S. M. **Efeito da infecção pelo *Toxoplasma gondii* na expressão de genes associados à resposta imune em tecidos de suínos**. 2004. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OLIVEIRA, K. R.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. et al. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos criados sob condições rústicas na microrregião de Registro – SP, pelo método de aglutinação direta (MAD). **Vet Zootec**, v. 14, p. 169-175, 2007.
- PAPPAS, G. N.; ROUSSOS, M. E.; FALAGAS. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1385–1394, 2009.
- PATTON, S., ZIMMERMAN, J., ROBERTS, T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in hogs in the National Animal Health Monitoring System (NAHMS). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, p. 121S. 1996.

PATTON, S., DIDERRICH, V., FAULKNER, C., et al. *Toxoplasma gondii* in swine operations in the United States: seroprevalence in sows and market-weight pigs in the national animal health monitoring system, 1995 and an assessment of management factors. **National Pork Board Report**, 1998. Disponível em:

<<http://www.pork.org/PorkScience/Documents/ToxoplasmagondiiinSwine.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2010.

PEZERICO, G. P.; PEZERICO, S. B.; SILVA, R. C. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos em três abatedouros dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 74, p. 267-270, 2007.

PINCKNEY, R. D.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. et al. Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 438-448, 1994.

ROBERTS, T., FRENKEL, J. K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United-States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 249–256, 1990.

ROBERTS, T., MURRELL, K. D., MARKS, S. Economic-losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitology Today**, v. 10, p. 419–423, 1994.

ROGHMANN, M. C.; FAULKNER, C. T.; LEFKOWITZ, A. et al. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 790–792, 1999.

ROOS, D. S.; CRAWFORD, M. J.; DONALD, R. G. et al. Transport and trafficking: *Toxoplasma* as a model for *Plasmodium*. **Novartis Foundation Symposium**, v. 226, p. 176-198, 1999.

RYU, J. S.; MIN, D. Y.; AHN, M. H. et al. *Toxoplasma* antibody titers by ELISA and indirect látex agglutination test in pregnant women. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 34, p. 233–238, 1996.

SANTOS, S. M.; AMARAL, V.; REBOUÇAS, M. M. Prevalência de anticorpos antitoxoplasma, por hemaglutinação indireta, em soros de suínos provenientes de diferentes municípios do estado de São Paulo. **Biológico**, v. 44, p. 149-53, 1978.

SCHENK, M. A. M.; LIMA, J. D.; VIANA, F. C. Frequência da toxoplasmose em suínos abatidos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 28, p. 261-266, 1976.

SABIN, A. B. Toxoplasmosis: recently recognized disease. **Advances in Pediatrics**, v. 1, p. 1-54, 1942.

SILVA, I. M. L. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural Estadual de Minas Gerais**, v. 12, p. 425-428, 1959.

SILVA, R. A. M. S.; BONASSI, C.; DALLA COSTA, A. O. et al. Serosurvey on pig toxoplasmosis in animals kept in different management systems in Santa Catarina and Rio Grande do Sul States, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 147, 2000.

- SILVEIRA, C.; BELFORT, JR. R.; BURNIER, JR. M. Toxoplasmose ocular. Identificação de cistos de *Toxoplasma gondii* na retina de irmãos não gêmeos com diagnóstico de toxoplasmose ocular recidivante: primeiro caso mundial. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 50, p. 215-218, 1987.
- SILVEIRA, C. Toxoplasmose: levantamento bibliográfico de 1997 a 2000. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 64, p. 263-270, 2001.
- SILVEIRA, C., FERREIRA, R., MUCCIOLI, C. et al. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, p. 370–371, 2003.
- SOGORB, F.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C. et al. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 314-20, 1972
- SPEER, C. A.; TILLEY, M.; TEMPLE, M. E. et al. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 75, p. 75-86, 1995.
- SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigli: incontrato nell'lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uommo. **Rev. Soc. Sci. São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.
- STANFORD, M. R., TAN, H. K., GILBERT, R. E. Toxoplasmic retinochoroiditis presenting in childhood: clinical findings in a UK survey. **British Journal of Ophthalmology**. v. 90, p. 1464–1467, 2006
- STEHLING, A. R.; ORÉFICE, F. Toxoplasmose ocular adquirida (relato de seis casos com aspectos clínicos diferentes). **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 55, p. 455-465, 1996.
- SUARÉZ-ARANDA, F; GALISTEO JR, A. J.; HIRAMOTO, R. M. et al. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v. 91, p. 23-32, 2000.
- TENDER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- TSUTSUI, V. S.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L. et al. Soroepidemiologia e fatores associados a transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, p. 27-34, 2003.
- VAN DER GIESSEN, J., FONVILLE, M., BOUWKNEGT, M. et al. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 371–374, 2007.
- VASCONCELOS, O. T.; COSTA, A. J.; ÁVILA, F. A. Aspectos epi-demiológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos. **Científica**, v. 7, p. 83-87, 1979.
- VELGE-ROUSSEL, F.; MARCELO, P.; LEPAGE, A. C. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infeccion and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 969-972, 2000.

VIDOTTO, O., NAVARRO, I. T., GIRALDI, I. T. et al. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina - PR. **Semina**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1990.

WASTUNG, J. M.; HARKINS, D.; MALEY, S. et al. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, p. 53-62, 1995.

WENTZ, I.; SOBESTIANSKY, J.; CHAPLIN, E. Prevalência de anticorpos para toxoplasmose em soros de suínos de pedigree em Santa Catarina. Concórdia. **EMBRAPA Suínos e Aves**, 1988.

ZIMMERMAN, J. J., DREESEN, D. W., OWEN, W. J. et al. Prevalence of toxoplasmosis in swine from Iowa. **American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 266–270, 1990

ZOU, F. C.; SUN, X. T.; XIE, Y. J. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs in Southwestern China. **Parasitology International**, v. 58, p. 306–307, 2009.

ZULPO, D. L. **Proteção contra a eliminação de oocistos em felinos imunizados com proteínas de roptrias do *Toxoplasma gondii***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune humoral e celular em suínos imunizados com proteínas nativas de roptrias do *Toxoplasma gondii* pela via intranasal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar roptrias do *T. gondii*;

Avaliar a resposta humoral e celular;

Avaliar a proteção clínica nos animais após desafio com cepa virulenta;

Avaliar a proteção contra a produção de cistos cerebrais após desafio com cepa cistogênica.

3 ARTIGO

HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN PIGS IMMUNIZED BY INTRANASAL ROUTE WITH CRUDE RHOPTRY PROTEINS OF THE *Toxoplasma gondii* PLUS QUIL-A

3.1 ABSTRACT

In the present study we evaluated the humoral and cellular immune responses from pigs immunized by intranasal route with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. The experiment design used 15 mixed breed pigs divided into three groups, G1 (vaccinated-challenged, n=6) received rhoptry proteins (200µg/ dose), G2 (adjuvant-challenged, n=4) received PBS plus Quil-A, and G3 (unvaccinated-challenged, n=3) was considered control group. The treatments were performed at days 0, 21, and 42 by intranasal route. On day 49, two animals from G1 were euthanized for evaluation of cellular immunity and the other animals this study were challenged with 10^3 infective oocysts of the VEG strain. Five out of six animals from G1 had antibodies above cut-off at challenge day. Three from these five animals had both IgM and IgG responses, however, two animals showed just IgM response. There was a greater proliferation against *T. gondii* rhoptry proteins in lymphocytes collected from LNM compared to the blood cells. Partial protection against tissue cysts formation was observed in G1 compared to G3. The protection factors were 41.6% and 6.5% in G1 and G2, respectively. In conclusion, the animals were stimulated in part in humoral immune response, however, gave encouragement to the cellular immune response both locally and systemically.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Rhoptry. Pigs.

3.2 INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite which can infect humans and warm blooded animals. Humans can become infected by ingesting raw or undercooked meat containing cysts (GARCIA et al., 1999). The longevity of tissue cyst in pork can last more than two years (DUBEY et al., 1998) and pork is one of the most important sources of *T. gondii* infections for humans (DUBEY et al., 1991). Thus, indicates that developing a vaccine against *T. gondii* in pigs would be desirable to reduce tissue cysts formation.

Live vaccines (RH, T263, and S48) have shown protection against toxoplasmosis (FRENKEL et al., 1991; DUBEY et al., 1991), but these carry the risk of reverting virulence (SUPPLY et al., 1999). A useful *T. gondii* vaccine for human beings and animals needs to be safe (non-infectious), have a reasonable shelf life, and be able to be used in pregnant females without infecting fetuses.

Studies using live RH strain showed some protection against tissue cyst formation in pigs (PINCKNEY et al., 1994; GARCIA et al., 2005), but these results were not enough to indicate that this strain could be used as a live vaccine in pigs in view of the fact that there are differences of pathogenicity among RH strain to pigs. It is not persistent in pig tissues 64 days after infection (dai) (DUBEY et al., 1991). The RH strain, genotype I, is the most studied and used *T. gondii* strain throughout the laboratories. This strain was isolated from a child with toxoplasmic encephalitis in 1939 (SABIN et al., 1941) and since then has been maintained in mice and cell culture.

Freire et al. (2003) in a study using *T. gondii* surface antigens and lipids incorporated in immunostimulatory complexes (ISCOMs) by subcutaneous route to vaccinate pigs, did not isolate, by mouse bioassay, tissue cysts from vaccinated animals (FREIRE et al., 2003). Garcia et al. (2005) used rhoptry proteins incorporated in ISCOM to prevent tissue cyst formation in pigs challenged with sporulated oocysts of the VEG strain. The results indicated that rhoptry vaccine conferred partial protection against tissue cysts formation.

Additionally, pigs were immunized intradermally with a cocktail DNA vaccine encoding GRA1 and GRA7 (JONGERT et al., 2008) and animals developed a strong humoral and Type 1 cellular immune response. Unfortunately, the results about tissue cysts burden evaluation were inconsistent, however, this study was important because it elicited an immune response in pigs through DNA vaccine.

Smith et al. (1998) showed that oral administration of free Quil-A together with ovalbumin (OVA) reproduced the most of local and systemic immune responses obtained with ISCOM and OVA. The saponin adjuvant Quil-A is obtained from the bark of a tree *Quillaja saponaria*. Quil-A is a widely used veterinary adjuvant, inexpensive, simple to formulate and generally safe (COX and COULTER, 1997). Garcia et al. (2007) used crude *T. gondii* rhoptry proteins plus Quil-A by the intranasal route to evaluate the control of the oocyst shed in domestic cats. Two out of three cats did not shed oocysts after immunizing with three doses of the vaccine, and vaccinated cats had an estimated protection of 65%.

The most common infection route of *T. gondii* is the oral ingestion. Therefore, stimulation of mucosal immune response will be desirable in controlling oral

toxoplasmosis (CHARDÈS and BOUT, 1993). The intranasal route was previously evaluated as an immunization route in pigs, however, just for virus and bacterial immune responses (YOKOMIZO et al., 2002; ZHANG et al., 2007; KANG et al., 2008; NEUMANN et al., 2009), and it was not studied in protozoa parasites. Yokomizo et al (2002) showed that intranasal immunization is more efficient for inducing local and systemic immunity than oral immunization in pigs.

In the present study we evaluated humoral and cellular immune responses in pigs immunized by intranasal route with crude rhoptry proteins of *T. gondii* plus Quil-A.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 *Toxoplasma Gondii* Strain

LIV-5 and VEG *T. gondii* strains were used in the experiment. LIV-5 strain was used to obtain rhoptries (GARCIA et al., 2004) and sporulated oocysts from VEG strain were used for the pigs challenge. Before used oocysts infectivity was evaluated by mice infection.

3.3.2 Animals

The maintenance and care of experimental animals complied with the Animal Ethic Committee from Universidade Estadual de Londrina (CEEA 17/09). Thirteen mixed breed pigs between 6.5-7.5 weeks of age, including females and castrated males, were randomly allocated in separate stables (2 for 2). The animals were left to acclimatize for 6 days before we began the experiment. They received food and water ad libitum. All pigs were serum negative (titre < 64) in the *T. gondii* indirect immunofluorescence assay (IFA).

3.3.3 Rhoptries Purification

Tachyzoites of RH strain were obtained from peritoneal fluid of infected Swiss mice. The material was passed three times through a 26 gauge needle to purification and washed twice with 10mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.5). The pellet was resuspended and washed twice in homogenization medium (HM: 250mM sucrose; 1mM EDTA; 5mM triethanolamine-HCl; pH 7.5), after washed, tachyzoites were prepared at a

concentration of 10^9 tachyzoites/ mL. Cell suspension was disrupted in a French pressure cell at 50 Kg/cm^3 . Unbroken cells were sedimented by a 10 min centrifugation at $750 \times g$. Supernatant was centrifuged at $12000 \times g$ for 10 min to sediment the crude organellar. Final pellet was fractionated by isopycnic sucrose density gradient centrifugation to rhoptries isolation following Garcia et al. (2004).

Briefly, the final pellet was resuspended in 4 ml of HM, added 2 ml in each tubes containing 3 ml sucrose gradient (1.0; 1.4; 1.6 and 1.8 M) and centrifuged during 5 hours at $87.480 \times g$. The fractions were diluted in 10 ml HM and centrifuged at $120.000 \times g$ for 1h. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid technique (BCA Protein Assay Reagent, Pierce).

3.3.4 Vaccination and Challenge

The pigs were divided into 3 groups, group 1 (G1) n=6, group 2 (G2) n=4 and group 3 (G3) n=3 (Table 1). The G1 received 200 μg of rhoptry proteins plus Quil-A (50 μg) by nasal route (NA) at days 0, 21, and 42 of the experiment (GARCIA et al., 2007). The G2 and G3 received just Quil-A (50 μg) and PBS by nasal route, respectively. At challenge day (day 49) two animals from G1 were euthanatized for lymphocytes proliferation assay, and the other animals from G1 (n=4), G2 (n=4) and G3 (n=3) were challenged with $\sim 10^3$ oocysts of VEG strain by oral route (DUBEY et al. 1998b).

3.3.5 Sampling and Measurements

Clinical signs and body temperatures were recovered before and after challenge. Serum samples were obtained at days -6, 0, 21, 42, 49, 64, 79 and at slaughter (day 94) and stored at -20°C . At death, brain samples were collected to investigate *T. gondii* tissue cysts by mouse bioassay.

3.3.6 Evaluation of Immune Responses

The presence of antibodies against *T. gondii* in serum samples of pigs (before of experiment to select the animals) and bioassayed mice were measured by indirect immunofluorescence assay test (IFAT) (CAMARGO, 1973) considering as positive pigs with titre ≥ 64 and mice with titre ≥ 16 (GARCIA et al., 2005).

The kinetic of IgM and IgG antibodies was evaluated by Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) as described by Garcia et al. (2005). Flat-bottom 96 well polystyrene microtitration plates (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark) were coated with 0.1 ml of the rhoptry antigens (5 µg/ well) diluted in 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) and incubated overnight at + 6°C. The plates were washed 3 times with PBS-tween 20 (50mM tris, pH 7.4, containing 150mM sodium chloride and 0.05% tween 20) and non-specific immune sites blocked by incubation for 1 hr at 37 °C with carbonate buffer - 8% nonfat dry milk. The control sera and test sera were diluted 1:200 in PBS-tween 20-5% nonfat dry milk and added to the microtitre plates in duplicate, 0.1 ml in each well, and incubated for 1.5 hr at 37 °C. The positive and negative control sera were included in each plate.

After washing, peroxidase-labeled anti-pig IgG and IgM antibody (diluted 1:2500 in PBS-tween 20-5% nonfat dry milk) was added 0.1 ml in each well and incubated for 1 hr at 37 °C. After washing, the peroxidase activity was revealed by adding 0.1 ml of ortho-phenylenediamine solution (40 mg ortho-phenylenediamine/ 100 ml of 0.1M phosphate citrate buffer, pH 6.0, and 40 µl of H₂O₂), and the reaction was stopped by adding 0.05 ml of 1N HCL, and the optical density (OD) was read at 490 nm in an ELISA microplate reader. The absorbance values were averaged by the following formula: $OD_{mean} = [(absorbance\ value\ of\ the\ sample) - (absorbance\ value\ of\ the\ negative\ control\ serum) / (absorbance\ value\ of\ the\ positive\ control\ serum) - (absorbance\ value\ of\ the\ negative\ control\ serum)]$. A serum was considered to be positive when $OD\ testes\ serum > [OD\ mean\ (from\ negative\ sera\ n=15) + 2\ SD\ (standard\ deviation\ from\ negative\ serum)]$.

3.3.7 Lymphocyte Proliferation

The proliferation assays of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and lymphocytes from mesenteric lymph nodes (MLN) were performed as previously described (SOLANO-AGUIAR et al., 2000). Two pigs from group G1 were randomly selected and euthanized seven days after the third dose of vaccine at day 49. Whole blood was obtained by venipuncture in EDTA vacutainers and mixed 1:2 with phosphate-buffered saline (PBS), and MLN were collected from ileum and jejunum into 50-ml conical tubes and kept in collection media (CM) at 4°C. Cells from MLN were release by sharp scissors into a petri dish containing RPMI 1640 medium (GIBCO), and then the cell suspension were filtered. PBMC

were isolated by density gradient centrifugation by using lymphocyte separation media (LSM).

The isolated cells were washed twice in RPMI 1640 medium. The cell suspensions from PBMC and MLN were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% bovine fetal serum, L-glutamine (2 mM; BioWhittaker), sodium pyruvate (1 mM; Sigma), and penicillin-streptomycin (1 mM; Sigma). The suspensions were then seeded at 10^6 cells per well in triplicate. Seeding was done in flat-bottomed 96-well microtiter plates (Costar) with 200 μ l of culture medium that contained 5, 10, and 15 μ g of rhoptry proteins per ml. Phytohemagglutinin - 1% (PHA-M) was then added to the culture medium and served as positive control for proliferation; while medium without additives were used as the negative controls. The plates were incubated in 5% CO₂ at 37°C for 72 h. The viability of the cells was higher than 90% as determined by trypan blue exclusion. The cellular proliferation was determined by Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes). The absorbance determination at 570 nm was realized by using a microplate reader; proliferation was expressed as stimulation indices (SI= ratio of the mean proliferation of the cells after stimulation relative to the proliferation of unstimulated control cells from the same animal).

3.3.8 Bioassay of Pig Tissues for *T. gondii*

Fifty grams of brain samples from each pig were used to evaluate the presence of *T. gondii* cysts as described previously (DUBEY, 1998). Briefly, each sample was homogenized in a blender for 30 seconds in 250 ml of saline solution (0.14M NaCl). After homogenization 250 ml of pepsin solution (50g) was added and incubated at 37 °C for 1 hr. The homogenate was filtered through 2 layers gauze and centrifuged at 1000 x g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in 20 ml PBS (pH 7.2) and 15 ml 1.2% sodium bicarbonate (pH 8.3) was added and centrifuged at 1180 x g for 10 min. The supernatant was discarded and the sediment was resuspended in 5 ml of antibiotic saline solution (1,000 U penicillin and 100 μ l of streptomycin/ ml of saline solution) and inoculated subcutaneously into 3 mice (1ml/ mouse).

The animals that either showed clinical signals (weight loss, diarrhea, abdominal distention) or died during 3 – 10 days after inoculation were checked for the presence of tachyzoites or bradyzoites. Pool of tissues (brain, liver, lung and peritoneal fluid)

from these animals was collected and used to infect other mice. Impression smears of lung from the mice that died were fixed in methanol, stained with Giemsa, and examined microscopically. Blood samples were drawn from the mice that survived 45 days post-inoculation, and the brain of each mouse was examined microscopically for *T. gondii* tissue cysts by squashing a portion of brain between a coverslip and a glass slide (DUBEY and BEATTIE, 1988). Serum from each mouse was diluted at 1:16 and 1:64 and examined for *T. gondii* antibodies, using IFA.

3.3.9 Statistical Analyses

Qui-square was used to show statistical difference in mice bioassay. Protection against tissue cysts formation in pigs was evaluated by estimating preventable fraction (PF) as previously described (SIEV, 1994) with some adjustments; $PF = p2 - p1 / p2$, where $p2 = \% \text{ of positive mice from pigs from G3}$ and $p1 = \% \text{ of positive mice from pigs from G1 or G2}$.

3.4 RESULTS

3.4.1 Clinical Signs

The only clinical signal of toxoplasmosis observed was fever ($>40.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, Fig. 1) the 6th to 8th day after challenge (dac).

3.4.2 Humoral and Cellular Immune Responses

IgG and IgM antibody results are shown in Figures 2 and 3. The average of antibody levels at challenge in immunized group (G1) was IgG OD mean= 0.336 and IgM OD mean= 0.602. Five out of six animals from G1 had antibodies above cut-off at challenge day (IgG OD mean=0.316, IgM OD mean= 0.558). Three from these five animals had both IgM and IgG responses (animals 1, 3, and 5), however, two animals showed just IgM response (Table 2). Animals from G2 and G3 remained IgG and IgM negative before challenge. All pigs from G1, G2 and G3 seroconverted after challenge. The IgM antibody levels had a down tendency after challenge day, and some animals were negatives.

The proliferation assays of lymphocytes from mesenteric lymph nodes (LNM) elicited a significant lymphocyte proliferation response in all of the antigens concentrations, however, this did not occur in the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Proliferation of lymphocytes was higher in LNM than PBMC (Fig. 4).

3.4.3 Mouse Bioassay Evaluation

The results of bioassay are summarized on Table 3. The G1, G2, and G3 showed 5/11 (45.4%), 8/11 (72.7%), and 7/9 (77.8%) mice positive in bioassay of their brains. PF was 41.6%, and 6.5% in G1 and G2, respectively.

3.5 DISCUSSION

In the present study we observed a partial humoral immune response in pigs immunized by nasal route with crude rhoptries from *T. gondii*. However, a higher intestine cellular immune response than systemic one was detected. Garcia et al. (2005) immunized pigs by intramuscular route with crude rhoptries from *T. gondii* incorporated into ISCOM, and the authors described a partial stimulation of humoral response in those animals.

Garcia et al. (2006) standardized a *T. gondii* rhoptry-ELISA to evaluate IgG from pig sera. This assay detected serum conversion starting at 14^o day after infection with peak of antibodies in day 42. Lind et al. (1997) tested a *T. gondii* tachyzoites-ELISA and observed a IgG long lasting response starting 10 to 14 days after infection, however, a diminishing of IgM curve in 21-24 days with peak in day 10. Herein, we just observed IgG and IgM anti-*T. gondii* after third dose of immunization (day 49).

A DNA vaccine expressing GRA1 and GRA7 was used to evaluate humoral and cellular immune response in pigs (JONGERT et al., 2008), and the study described high level of serum IgG antibodies, however, just one pig, before challenge, showed cellular immune response in PBMC. In this study we detected a higher cellular immune response in LMN than PBMC, what could be related to brain cyst protection observed in G1 when compared to G2, and G3.

Tissue cysts and antibodies tend to persist for prolonged periods, in most mammals, including pigs, and the demonstration of serum positivity usually correlates well

with the contaminated meat (DUBEY et al. 1995; WINGSTRAND et al., 1997; VERHELSTA et al., 2011). The *T. gondii* mouse bioassay has been used as a gold test to indicate the tissue infection level of animals vaccinated compared with unvaccinated animals (DUBEY et al., 1991, 1998b; Pinckney et al. 1994; Kringel et al. 2004; Garcia et al. 2005; JONGERT et al., 2008). In our study mouse bioassay was used to evaluate brain cyst burden 45 days after challenge and all animals from G2 and G3 were positive, however, one pig from G1 was negative. Solano-Aguilar et al. (2001) challenged pigs with 10^3 sporulated oocysts of VEG strain, and the authors reported all infected animals in both brain and tongue as positive in mouse bioassay. Kringel et al. (2004) did not detect the presence of the parasite in the heart from pigs infected with *T. gondii* oocysts. Additionally, Verhelst (2011) described the possibility of clearance of *T. gondii* cysts from pig muscles, what did not occur with brains.

Clinical signs after *T. gondii* infection in pigs depend on the breed and age of animals, stage of parasite, administration via, and the number of infective parasites (JUNGERSEN et al., 1999). Here, we did not observe clinical signals except for a rise in temperature on 6^o to 8^o day after challenge. Using the same strain (VEG) and number of oocysts to infect miniature swine Solano-Aguilar et al. (2001) observed death caused by severe fibronecrotic enteritis in 3 animals 10, 11 and 12 days after infection, and high rectal at days 4, 5, 6 e 7 pos infection. In a previous study, Garcia et al. (2005) immunized pigs by IM route with rhoptry proteins plus ISCOM, and they did not observe protection against clinic signals in the vaccinated group.

Freire et al. (2003) immunized pigs with whole *T. gondii* tachyzoites (LIV-5 strain 500mg/IM) incorporated into ISCOM, and after challenging with 5×10^4 oocysts of AS-28 strain, they did not find clinical changes in animals from vaccinated group. Kringel et al. (2004) evaluated the ability of CpG ODN in combination with live RH strain to improve the protective immunity in pigs and no significant increase in temperatures was observed in vaccinated animals after challenge with 10^4 oocysts of VEG strain.

In a previous study, Garcia et al. (2005) immunized pigs by IM route with rhoptry proteins plus ISCOM, and they did not observe protection against clinic signals in the vaccinated group, however, the group infected with RH strain before challenge was protected. The G1 showed clinic signals like G2 and G3, which suggest that antibody levels in G1 were not protective to challenge used.

Some studies (DUBEY et al., 1991, 1994; Pinckney et al., 1994; Garcia et al., 2005; Bugni et al., 2008) infected pigs with live RH strain, a relatively nonpersistent strain for pigs, but these results were not enough to indicate RH as a live vaccine for pigs in view of

the fact that there are pathogenicity differences among RH strain to pigs (PINCKNEY et al., 1994).

Information obtained so far associated with this study indicated that future studies for improve the immune response in pigs to *T. gondii* challenge should use an association of systemic and mucosal stimulus, these should be associated with different antigens expressed in all stages of parasite.

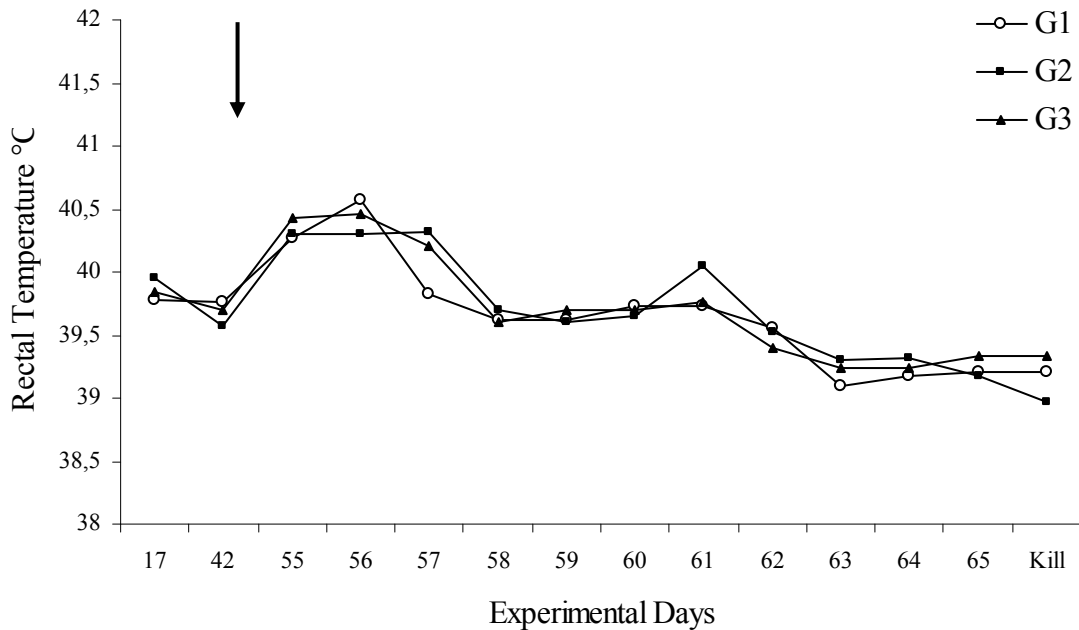


Figure 1 - Mean rectal temperatures of the G1, G2 and G3 pigs. At days 0, 21 and 42, the G1 was vaccinated with rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A and G3 received only saline. On the day 49 all animals were challenged (black arrow) with 10^3 oocysts of the *T. gondii* VEG strain. On day 94, animals were killed.

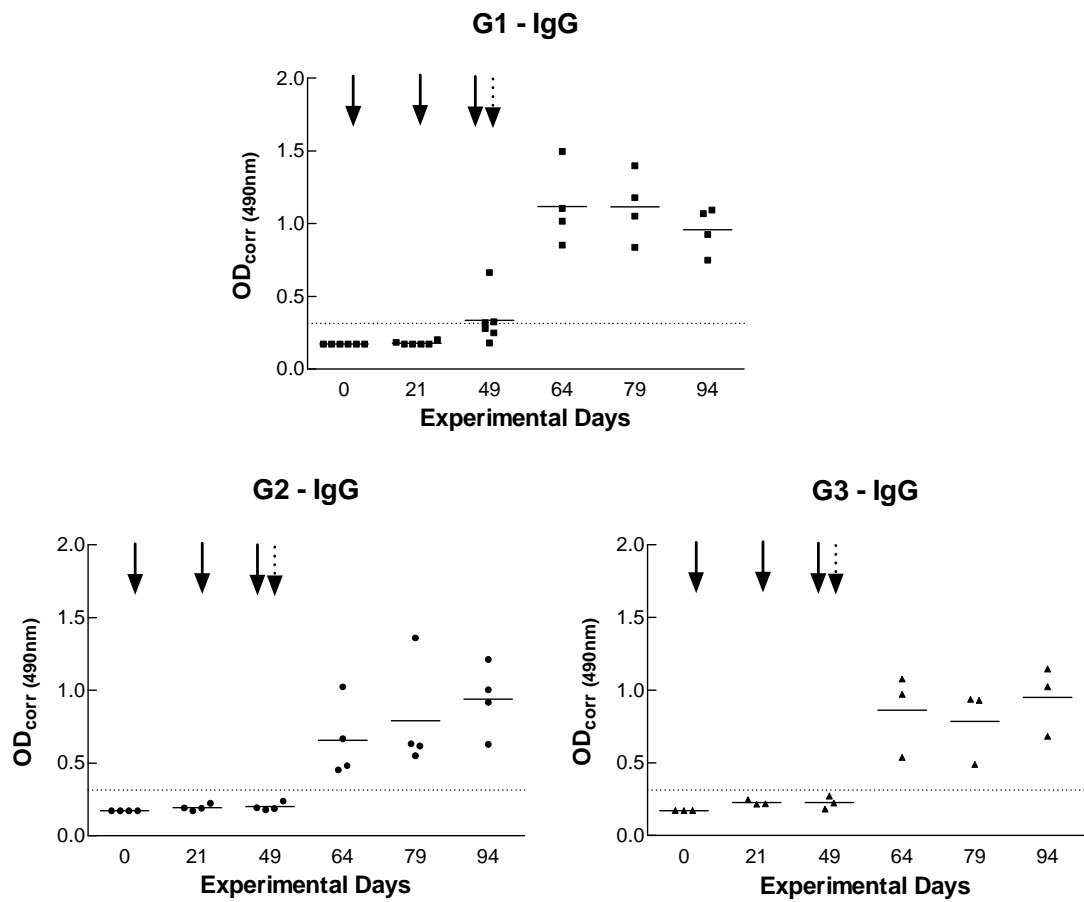


Figure 2 - IgG antibody response measure by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in pigs of the G1, G2 and G3. The G1 was vaccinated with *T. gondii* rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A, and G3 received only saline. The treatments were performed by nasal route at days 0, 21 and 42 (black arrows). At day 49 all groups received a challenge route of the 10^3 oocysts of the *T. gondii* VEG strain (dashed arrow) and at day 94 all animals were slaughtered. Dashed line indicates positive cut-off.

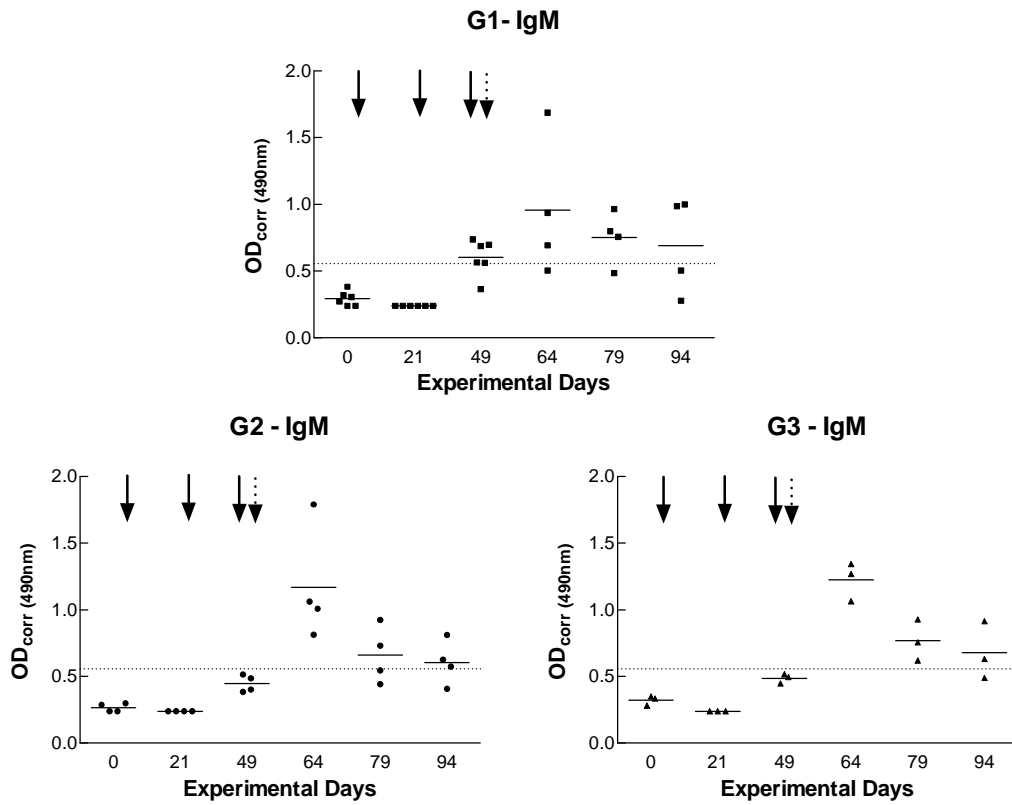


Figure 3 - IgM antibody response measure by the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in pigs of the G1, G2 and G3. The G1 was vaccinated with *T. gondii* rhoptry vaccine, G2 received PBS plus Quil-A, and G3 received only saline. The treatments were performed by nasal route at days 0, 21 and 42 (black arrows). At day 49 all groups received a challenge route of the 10^3 oocysts of the *T. gondii* VEG strain (dashed arrow) and at day 94 all animals were slaughtered. Dashed line indicates positive cut-off.

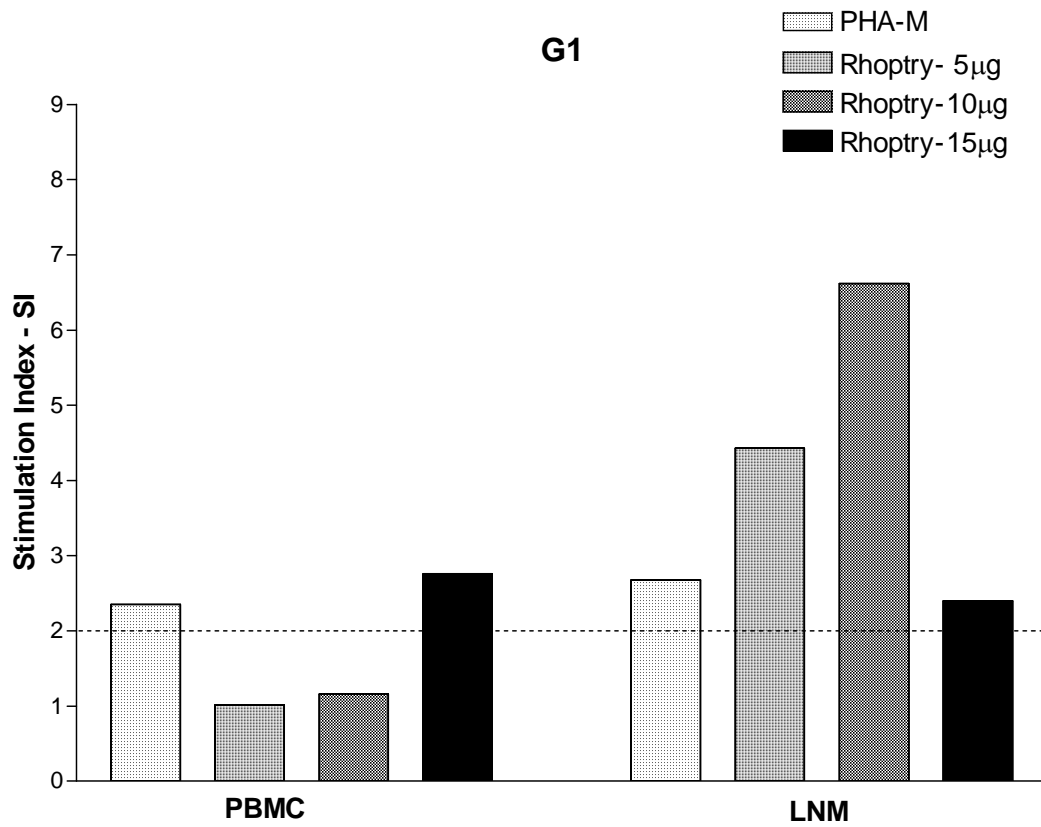


Figure 4 - Proliferation assays of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and lymphocytes from mesenteric lymph nodes (LNM) of G1 (vaccinated with 200 μ g of *T. gondii* rhoptries proteins). The lymphocyte stimulation was performed using 5, 10 and 15 μ g of *T. gondii* rhoptries and the positive control stimulated with 1% of Phytohemagglutinin (PHA-M). The continuous line indicates the cutoff point.

Pig no.	Sex ¹	Vaccination PID ²			Cellular Response	Challenge PID	Slaughter PID	
		0	21	42				49
G1								
1	M					10 ³	Bioassay of brain	
2	F				-	oocysts		
3	F					VEG		
4	M							
5	F							
6	F				LP	-		-
G2								
7	F					10 ³	Bioassay of brain	
8	F				-	oocysts		
9	F					VEG		
10	M							
G3								
11	F					10 ³	Bioassay of brain	
12	F				-	oocysts		
13	F					VEG		
Serology PID⁴								
		-6	0	21	42	49	64 79	94
All Pigs	RIFI	ELISA IgG and IgM						
Evaluation of clinical signs PID⁵								
		0	17	42			55 – 65 ³	94
All Pigs		Measurement of rectal temperature						

Table 1 - Experimental design indicating the division of groups, number of animals and the main steps developed in the experiment. ¹M = male, F = female; ²PID: post inoculation day; ³Daily; ⁴Days of obtaining the serum samples and conducting serology; ⁵Days of recovery of body temperature; LP: lymphocyte proliferation; NA: nasal route.

Group	Animals	IgM ¹	IgG ²
G1	1	0,738	0,320
	2	0,698	0,279
	3	0,687	0,325
	4	0,364	0,249
	5	0,561	0,664
	6	0,564	0,179

¹cut-off=0.558; ² cut-off=0.316

Table 2 - Anti-*Toxoplasma gondii* antibody responses from animals immunized by nasal route with crude rhoptry proteins (G1) after third dose (day 49).

Table 3 - Outcome of *Toxoplasma gondii* tissue cysts, by mouse bioassays, in brains of pigs that were challenged with oocysts of VEG strain after receiving rhoptry protein, Quil-A and saline by nasal route.

Group/ Pig no. ¹	Bioassay of pig tissues ²	N° of mice positive / (%)	PF (%) ³
	Brain		
G1			
1	0(1)/3	5/11 (45%)	41.6
2	2/2		
3	0(0)/3		
4	2(0)/3		
G2			
7	3/3	8/11 (73%)	6.5
8	0(1)/3		
9	0(2)/3		
10	2/2		
G3			
11	0(2)/3	7/9 (78%)	NE ⁴
12	3/3		
13	0(2)/3		

¹ G1 (vaccinated with 200µg of rhoptry protein); G2 (only 50µg Quil-A); G3 (only saline). All groups were challenged with 10³ oocysts of VEG strain; ² Results are expressed as number of mice positive for *T. gondii* of 3 mice inoculated with pepsin digest of pig tissue. Numbers in parenthesis indicate the number of mice with antibody titers ≥ 16 (IFA), but in which tachyzoites or cysts were not seen in their peritoneal liquid, and brain, respectively; tachyzoites or tissue cysts were seen in the other mice. ³ Preventable fraction (PF) was calculated from each group. ⁴ Not evaluated

References

- CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 10, p. 143-171, 1973.
- CHARDÉS, T.; BOUT, D. Mucosal immune response in toxoplasmosis. **Research in Immunology**, v. 144, p. 57-60, 1993.
- COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, n. 3, p. 246-256, 1997.
- DEBARD, N. D.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2158-2166, 1996.
- DUBEY, J. P.; MURRELL, K. D.; FAYER, R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 1941-1943, 1984.
- DUBEY, J. P., BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 220.
- DUBEY, J. P., URBAN, J. F., DAVIS, S. W. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1316-1319, 1991.
- DUBEY, J. P., BAKER, D. G., DAVIS, S. W. et al. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 982-987, 1994.
- DUBEY, J. P.; WEIGEL, R. M.; THULLIEZ, P. et al. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **The Journal of Parasitology**, v. 81, p. 723-729, 1995.
- DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.
- DUBEY, J. P., LUNNEY, J. K., SHEN, S. K. et al. Infectivity of low numbers of *T. gondii* oocysts to pigs. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 438-443, 1996.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75-77, 1998.
- DUBEY, J. P., LUNNEY, J. K., SHEN, S. K. et al. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 749-752, 1998b.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89-103, 2009.

- FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. et al. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulating complexes (iscoms). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 388-396, 2003.
- FRENKEL, J. K.; PFEFFERKORN, E. R.; SMITH, D. D.; FISHBACK, J. L. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 759–763, 1991.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L. et al. Soroprevalência epidemiologia e avaliação ocular do toxoplasmoze humana na área rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. “(in Portuguese, with English abstract)” **Pan American Journal of Public Health**, v. 6, p. 157-163, 1999.
- GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T. et al. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into ISCOM. **Experimental Parasitology**, v.108, p. 40-46, 2004.
- GARCIA J.L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T. et al. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 209-217, 2005.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O. et al. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 100–105, 2006.
- GARCIA, J. L.; GENARI, S. M.; MACHADO, R. Z. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 267-271, 2006b.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; BIAZZONO, L. et al. Protective activity against shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 197-206, 2007.
- JONGERT, V.; MELKEBEEK, S.; DE CRAEYE, J. et al. An enhanced GRA1—GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. **Vaccine**, v. 26, p. 1025—1031, 2008.
- JUNGERSEN, G.; JENSEN, L.; RIBER, U. et al. Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1307-1319, 1999.
- KANG, M. L.; KANG, S. G.; JIANG, H. L. Chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* antigens as novel vaccine against atrophic rhinitis in pigs. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1179–1185, 2008.
- LOVGREN, K.; MOREIN, B. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (ISCOMs). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 10, n. 2, p. 161-172, 1988.
- MATEUS-PINILLA, N. E.; DUBEY, J. P.; CHOROMANSKI, L. et al. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine reducing *T. gondii* exposure for swine. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 885-860, 1999.

- NEUMANN, E. J.; ALEX GRINBERG, A.; BONISTALLI, K. N. Safety of a live attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine for swine. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 297–303, 2009.
- PINCKNEY, R. D.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. et al. Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 438-448, 1994.
- SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.
- SIEV, D. Estimating vaccine efficacy in prospective studies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, p. 279-296, 1994.
- SMITH, R. E.; DONACHIE, A. M.; MOWAT, A. M. Immune stimulating complexes as mucosal vaccines. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, p. 263-269, 1998.
- SUPPLY, P., SUTTON, P., COUGHLAN, S. N. et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 17, p. 705-714, 1999.
- VERHELSTA, D.; CRAEYEB, S. DE.; DORNYC, P. IFN- γ expression and infectivity of *Toxoplasma* infected tissues are associated with an antibody response against GRA7 in experimentally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, in press, 2011.
- YOKOMIZO, Y.; WATANABE F.; IMADA Y. et al. Mucosal immunoadjuvant activity of the log toxic recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin produced by *Bacillus brevis* for the bacterial subunit or component vaccine in pigs and cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 291-300, 2002.
- WINGSTRAND, A.; LIND, B.; HAUGEGAARD, J. Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 129-140, 1997.
- ZHANG, L.; TIAN, X.; ZHOU, F. Intranasal administration of CpG oligonucleotides induces mucosal and systemic Type 1 immune responses and adjuvant activity to porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine in piglets in vivo. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1732–1740, 2007.

CONCLUSÃO

As proteínas de roptrias do *T. gondii* administradas pela via nasal com quil-a estimularam a resposta imune celular intestinal e sistêmica e parcialmente a produção de anticorpos em suínos.

Os suínos do grupo vacinado tiveram uma proteção parcial contra a formação de cistos cerebrais.

As vias de inoculação sistêmica e de mucosa devem ser avaliadas no futuro, para um melhor estímulo da resposta imune em suínos frente a imunógenos de *T. gondii*.