



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS



**Peptídeos sintéticos são uma potencial ferramenta de imunodiagnóstico para a detecção da  
infecção de *Toxoplasma gondii* em suínos**

DÉBORA KAROLLA DE FREITAS OLIVEIRA

UBERLÂNDIA – MG

Julho - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

**Peptídeos sintéticos são uma potencial ferramenta de imunodiagnóstico para a detecção da  
infecção de *Toxoplasma gondii* em suínos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia de Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** José Roberto Mineo  
**Coorientador:** Tiago Wilson Patriarca Mineo

UBERLÂNDIA – MG

Julho - 2024

**Peptídeos sintéticos são uma potencial ferramenta de imunodiagnóstico para a detecção da  
infecção de *Toxoplasma gondii* em suínos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Imunologia de  
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de  
Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre.

Uberlândia, 29 de julho de 2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Roberto Mineo

Prof. Dr. João Luis Garcia

Dr. Ana Claudia Arantes Marquez Pajuaba

**Orientador:** Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA – MG

Julho - 2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2024	<p>Oliveira, Débora Karolla de Freitas, 1997- Peptídeos sintéticos são uma potencial ferramenta de imunodiagnóstico para a detecção da infecção de Toxoplasma gondii em suínos [recurso eletrônico] / Débora Karolla de Freitas Oliveira. - 2024.</p> <p>Orientador: José Roberto Mineo. Coorientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.567">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.567</a> Inclui bibliografia.</p> <p>1. Imunologia. I. Mineo, José Roberto ,1953-, (Orient.). II. Mineo, Tiago Wilson Patriarca,1979-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

## ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 297				
Data:	29/07/2024	Hora de início:	14h00	Hora de encerramento:	16 h 32 min
Matrícula do Discente:	12222IPA002				
Nome do Discente:	Débora Karolla de Freitas Oliveira				
Título do Trabalho:	Peptídeos sintéticos são uma potencial ferramenta de imunodiagnóstico para a detecção da infecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos"				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Rede de Pesquisa em Doenças Infecciosas Humanas e Animais no Estado de Minas Gerais				

Reuniu-se, em 29/07/2024, às 14h00, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Prof. Dr. José Roberto Mineo - ICBIM/UFU (Presidente), orientador da candidata; Prof. Dr. João Luis Garcia - Universidade Estadual de Londrina - UEL; Dra. Ana Cláudia Arantes Marques Pajuaba - ICBIM/UFU.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. José Roberto Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

### APROVADA

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente

ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/07/2024, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba, Médico(a) Veterinário(a)**, em 30/07/2024, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Luis Garcia, Usuário Externo**, em 12/08/2024, às 22:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5550550** e o código CRC **85F3F1B4**.

Referência: Processo nº 23117.046542/2024-01

SEI nº 5550550

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu marido, Victor, que me deu todo apoio e foi meu maior incentivador durante toda minha carreira acadêmica.

A meus amigos, Carolina, Bruna, Ana Paula e David, que compartilharam conhecimentos, companheirismo e que não foram apenas meus colegas de trabalho, mas sim amigos que irei levar pra toda vida. A Ruth, Melissa, Alefe, e todos meus amigos da pós-graduação que me incentivaram e acreditaram em minha trajetória.

A todos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, pelo companheirismo, convivência e aprendizados diários. A cada um dos professores e técnicos de laboratório, em especial Ana Cláudia, Cristina e Henrique, que colaboraram com minha trajetória no laboratório.

Aos professores, Ricardo Toshio Fujiwara e João Luis Garcia que colaboraram diretamente com esse trabalho.

Ao meu coorientar, Prof. Tiago Wilson Patriarca Mineo, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, que me incentivou e depositou em mim confiança. Obrigada pela oportunidade e ensinamentos de profissionalismo e ética. A meu orientador Prof. José Roberto Mineo, pelos ensinamentos, acolhimento e orientação em todos os passos deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, a Universidade Federal de Uberlândia e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio, financiamento e oportunidade de realizar esse trabalho.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii*, parasito zoonótico de distribuição mundial, é uma grande preocupação a saúde pública, devido a potencial transmissão através do consumo de carnes cruas ou mal cozidas. A vigilância e inspeção de suínos destinados ao consumo é uma iniciativa crucial no contexto de Saúde Única, para a prevenção eficaz da doença, e conseqüentemente, para minimizar as perdas económicas no setor pecuário. Atualmente, o diagnóstico sorológico ainda enfrenta desafios, principalmente devido às preparações antigénicas de alto custo e laboriosas. Portanto, este estudo visa o desenvolvimento de imunoenaios baseados em peptídeos sintéticos, derivados de epítomos de células B preditos a partir de antígenos conhecidos, a fim de detectar exposição prévia de suínos ao *T. gondii*. Para isso, predizemos e sintetizamos 18 peptídeos derivados de SRS, GRA, MIC e ROP usando ferramentas de bioinformática. Posteriormente, aplicamos os mesmos em ELISAs, utilizando amostras de soro de suínos experimentalmente infectados com taquizoítos ou oocistos de *T. gondii*, juntamente com controles negativos não infetados. Os peptídeos foram efetivos em distinguir amostras positivas e negativas. Entretanto, sequências preditas a partir de SRS29B, MAG1, SRS59B, GRA1, GRA5, e GRA7 demonstraram maior imunoreatividade. Adicionalmente, estas moléculas foram testadas em um sistema dot blot, onde todos os peptídeos mostraram desempenho semelhante. No entanto, nenhum dos ensaios, independentemente dos peptídeos utilizados, foi capaz de distinguir formas infecciosas de *T. gondii*. Portanto, com base nestes resultados, tais peptídeos podem ser utilizados em ensaios sorológicos para detectar *T. gondii* em amostras de suínos previamente expostos.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, suíno, diagnóstico sorológico, testes imunológicos, ELISA indireto, dot blot.



## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii*, a zoonotic parasite with worldwide distribution, is a major public health concern since it may be transmitted through the consumption of undercooked meat. Surveillance of the disease in pigs is a crucial one health initiative to effectively prevent infection, as well as, minimize economic losses in the meat industry. To date, serological diagnosis continues to pose significant challenges in these settings, especially due to the expensive and laborious antigen preparations. Therefore, this study aims in the development of immunoassays based on synthetic peptides, derived of B cell epitopes predicted from known antigens, in order to detect previous exposure of pigs to *T. gondii*. For that purpose, we predicted and synthesized 18 peptides from SRS, GRA, MIC, and ROP proteins using bioinformatic tools. We performed peptide-based ELISAs with positive serum samples extracted from pigs experimentally infected with *T. gondii* tachyzoites or oocysts, alongside with negative uninfected controls. Peptides were able to efficiently distinguish positive and negative samples, however, sequences predicted from SRS29B, MAG1, SRS59B, GRA1, GRA5, and GRA7 showed superior immunoreactivity. Additionally, we also tested the molecules in a dot blot system, in which all peptides presented similar performance. Neither assay, regardless of the peptides used, were able to distinguish *T. gondii* infective forms. Based on these results, we were able to select several peptides extracted from *T. gondii* proteins that may be used in serological assays directed to determine the previous exposure of pigs to *T. gondii*.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, pig, serological diagnosis, immunoassays, Indirect-ELISA, dot blot.

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

IgM - Imunoglobulina M

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

VP - Vacúolo Parasitóforo

GRA - Proteína de Granulo Denso

SAG - Antígeno de Superfície

SRS - Antígenos relacionados a SAG

ROP - Proteína de Roptrias

MIC - Proteína de Micronemas

MAG - Antígeno de Matrix

°C - Graus Celsius

IL – Interleucina

INF – Interferon

TNF – Fator de Necrose Tumoral

NK – Natural Killer

PAMPs - Padrões moleculares associados ao patógeno

TLR – Receptores do tipo Toll

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática da estrutura longitudinal de um taquizoíta de *T. gondii* indicando as principais estruturas e organelas. .... 16
- Figura 2** - Formas evolutivas de *Toxoplasma gondii* observadas em microscopia. taquizoítos obtidos a partir de lavado bronqueo-alveolar; (B) cisto tecidual contendo formas bradizoítas no cérebro de camundongo infectado; (c) oocisto (D) oocisto esporulado. .... 17
- Figura 3** - Ciclo de vida *Toxoplasma gondii*. O parasito infecta seu hospedeiro definitivo (felinos) através da via oral (ingestão de cistos teciduais ou oocistos). Neles ocorre a fase sexuada que se encerra após a eliminação de oocistos nas fezes do animal. Os oocistos que se encontram no meio ambiente, bem como os cistos teciduais, são capazes de infectar uma vasta gama de hospedeiros intermediários (animais de produção, roedores e humanos), onde o parasito entra na fase assexuada do ciclo, se transformando em taquizoítos que se dividem rapidamente por endogenia. Ainda, os taquizoítos podem se transformar em cistos, que por sua vez, contém diversos bradizoítos, formas silenciosas e características da infecção crônica. .... 18
- Figura 4** - Sequência de eventos durante a invasão da célula hospedeira. (A) Micronemas secretam MICs e (B) adesão a célula hospedeira, seguido pela liberação de ROPs, que inicia a reorganização da célula. (C e D) Formação da junção móvel que permite a entrada e englobamento do parasito para dentro do VP. .... 19
- Figura 5** - Diagrama esquemático do sistema de ELISA indireto. O antígeno é aderido ao fundo da placa e é posteriormente reconhecido pelo anticorpo presente na amostra. Subsequentemente, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima é adicionado, esse por sua vez, ao receber o substrato reage gerando cor que pode ser quantificada. .... 20

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 A toxoplasmose .....	14
1.2 Agente etiológico .....	15
1.3 Ciclo de vida.....	17
1.4 Invasão da célula hospedeira e resposta imune .....	19
1.5 Animais de produção e a toxoplasmose em suínos .....	20
1.6 Métodos de diagnóstico.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>
<b>4. CAPÍTULO II.....</b>	<b>28</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Methods.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Results.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>37</b>
<b>5. References.....</b>	<b>39</b>
<b>Tables.....</b>	<b>44</b>
<b>Figures.....</b>	<b>47</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>

# **CAPÍTULO I**

Revisão Bibliográfica

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A toxoplasmose

*Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório do filo apicomplexa, é o agente etiológico da zoonose de distribuição mundial, a Toxoplasmose. *T. gondii* infecta praticamente todos vertebrados homeotérmicos, sendo que, animais silvestres e domésticos são reservatórios do parasito. Além disso, animais de produção servem como fonte de infecção, gerando importantes perdas econômicas no setor pecuário (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A soroprevalência mundial gira em torno de um terço da população humana, fazendo da toxoplasmose uma das doenças parasitárias mais prevalentes do mundo, na qual fatores socioeconômicos, bem como hábitos culturais dos países afetados, estão diretamente relacionados ao risco de infecção e agravam o cenário epidemiológico no contexto da saúde única, que por sua vez, se refere às esferas da saúde animal, humana e ambiental, como fundamental para o controle efetivo da mesma (BEN-HARARI; CONNOLLY, 2019).

A transmissão ocorre através do consumo de carnes cruas ou malcozidas contaminadas com cistos teciduais; água e alimentos contendo oocistos liberados nas fezes dos felinos; através da via congênita, quando há infecção primária durante a gestação; e ainda, através da transfusão de sangue e transplante de órgãos (FURTADO et al., 2011). A infecção por *T. gondii* é comumente assintomática em indivíduos saudáveis, ou resulta em sintomas semelhantes a gripe, e incluem: febre, fadiga, cefaleia, mialgia, dor e linfadenopatia. Já em imunocomprometidos, com destaque aos pacientes de HIV, câncer e transplantados, a sintomatologia é severa, podendo causar distúrbios neurológicos, necrose da retina, complicações visuais, e outras manifestações sistêmicas, na qual, o desfecho mais grave da doença é associado a encefalite, acompanhada de mialgia, febre, ataxia e convulsões. Aborto, morte neonatal e complicações pós-natais significativas são observadas no contexto da transmissão congênita, onde o feto pode apresentar defeitos visuais, retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões, retardo mental, epilepsia e calcificação intracerebral, podendo levar ao óbito (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TILLEY et al., 1997). A progressão e desfecho clínico estão diretamente relacionados ao genótipo e virulência do parasito, bem como fatores inerentes à espécie, genética e sistema imune do hospedeiro (INNES, 1997; SU et al., 2010).

O tratamento da toxoplasmose tipicamente inclui medicamentos como perimitamina, sulfadiazina e ácido fólico. Essas drogas são inibidores da enzima redutase dihidrofolato (DHFR) e dihidropteroato sintetase (DHPS), bloqueando a produção de purinas e pirimidinas, essências para síntese de ácidos nucleicos e, conseqüentemente, impedindo a multiplicação e sobrevivência do parasito. Tais agentes são eficazes na resolução dos sintomas agudos, no entanto, incapazes de eliminar bradizoítos sendo assim, incapazes de levar a uma resolução clínica (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Existem diversos efeitos adversos relacionados à citotoxicidade das drogas,

fazendo com que em alguns casos o tratamento seja descontinuado, ou até mesmo não recomendado (BEN-HARARI; GOODWIN; CASOY, 2017).

## 1.2 Agente etiológico

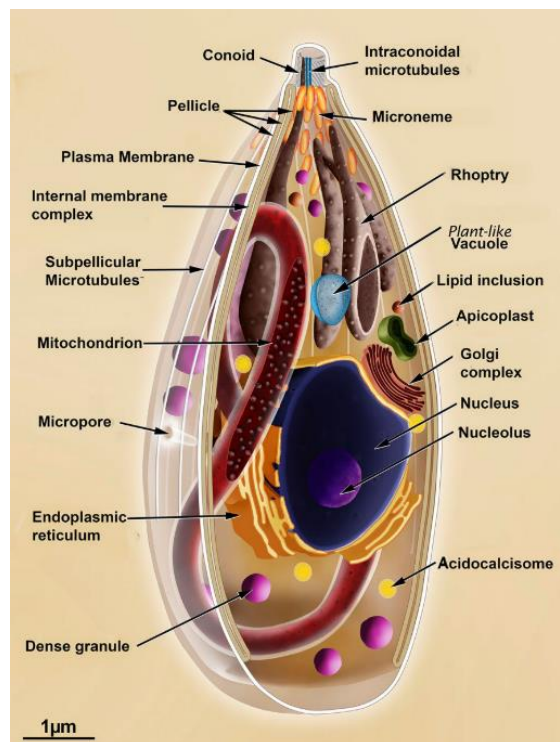
Em 1908, Nicolle e Manceaux, pesquisadores do Instituto Pasteur, observaram pela primeira vez *T. gondii* em *Ctenodactylus gundi*, roedores nativos das regiões montanhas do sul da Tunísia (NICOLLE C, MANCEAUX LH; 1908). Desde então, o parasito foi encontrado em carnívoros, insetívoros, herbívoros e diversos outros animais. No entanto, o ciclo de vida completo do parasito foi desvendado apenas após 1970, quando se determinou os felídeos (gatos domésticos e felinos selvagens) como hospedeiros definitivos, com a descoberta de que são fundamentais para o ciclo sexuado e disseminação do parasito, através da liberação de milhares de oocistos nas fezes (DUBEY, 2009).

No mesmo período, *Toxoplasma gondii*, foi classificado como um protozoário pertencente filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiida (Coccidia), subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*. Em grego, a palavra “*Toxoplasma*” significa “forma de arco” e se refere a morfologia das formas evolutivas da espécie, a única incluída no gênero (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No filo Apicomplexa, que engloba parasitos intracelulares obrigatórios, caracterizados pela presença do complexo apical, também se encontram outras espécies de relevância médica, como *Plasmodium spp.* e *Cryptosporidium spp.*, causadoras da malária e criptosporidíase, respectivamente (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

*T. gondii* possui uma grande diversidade genética, sendo descritos mais de 36 genótipos, que são agrupados em: tipo I, II e III. O tipo I incluem as cepas consideradas mais virulentas, gerando altas cargas parasitárias. Os tipos II e III possuem virulência intermediária e baixa, respectivamente, sendo o tipo II comumente encontrada em infecções humanas. As três principais linhagens clonais são encontradas na Europa e América do Norte, sendo os tipos II e III os mais frequentes; o tipo II e III são predominantes no norte da África, Oriente Médio e Península Arábica (CHAICHAN et al., 2017; XIAO; YOLKEN, 2015). Na América do Sul, enquanto cepas do tipo I, II e III são raramente reportadas, cepas “atípicas” de alta diversidade genética são predominantes, com 156 genótipos distintos, sendo 106 exclusivamente encontrados no Brasil (AJZENBERG et al., 2004; SHWAB et al., 2014).

Os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos, apresentam uma mesma organização primária em forma alongada, semelhante a um “arco”, com aproximadamente 5 µm de comprimento e 2 µm de largura (**FIGURA 1**). O parasito é envolto por um complexo de membranas (película) e suportado por um citoesqueleto composto por uma rede de filamentos e microtúbulos proteicos, que por sua vez, conferem motilidade (FRÉNAL et al., 2017). Possuem todas organelas comuns

aos eucariotos, como núcleo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (ATTIAS et al., 2020). Como particularidade, possuem uma segunda organela de origem endossimbiótica; o apicoplasto, que assim como a mitocôndria, possui função metabólica (SHEINER; VAIDYA; MCFADDEN, 2013). Já o complexo apical, estrutura que dá nome ao filo Apicomplexa, é formado pelo conoide e dois conjuntos de organelas secretoras: os micronemas e as roptrias, que secretam fatores de virulência essenciais para sobrevivência do parasito (SANCHEZ; BESTEIRO, 2021). Os Grânulos Densos são organelas especializadas, que apesar de não se localizarem no complexo apical, também secretam importantes moléculas responsáveis para o estabelecimento do parasito dentro da célula (MERCIER; CESBRON-DELAUW, 2015).



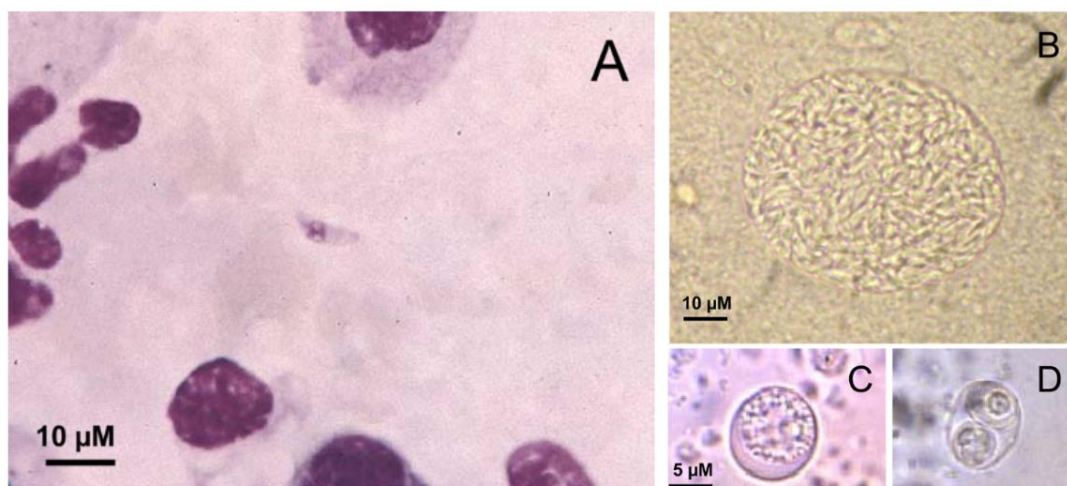
**Figura 1** - Representação esquemática da estrutura longitudinal de um taquizoíta de *T. gondii* indicando as principais estruturas e organelas.

Fonte: ATTIAS et al., 2020.

As formas evolutivas do parasito são altamente especializadas, sendo que, cada uma delas possuem um papel biológico distinto. Os taquizoítos se replicam rapidamente dentro do vacúolo parasitário (VP) e contribuem para a disseminação do parasito (**FIGURA 2A**). Enquanto os merozoítos se replicam dentro dos enterócitos do hospedeiro definitivo, os taquizoítos são capazes de invadir todas células nucleadas (DUBEY, 1997). Posteriormente, tais formas se transformam em bradizoítos, que são envoltos por uma grossa parede, formando os cistos teciduais (**FIGURA 2B**). Possuem uma lenta divisão e metabolismo latente, permanecendo por longos períodos dentro



da célula. Além disso, o tamanho dos mesmos varia de 10 µm a 100 µm, podendo conter milhares de bradizoítos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012a). Já os oocistos são formas ovaladas, de 12 a 13 µm, extremamente resistentes, podendo permanecer viáveis por até um ano no ambiente externo (FIGURA 2 C). Os oocistos maduros passam por um processo de esporulação, formando dois esporocistos, que por sua vez, contém quatro esporozoítos (FIGURA 2 D) (MAI et al., 2009).



**Figura 2** - Formas evolutivas de *Toxoplasma gondii* observadas em microscopia. tachizoítos obtidos a partir de lavado bronqueo-alveolar; (B) cisto tecidual contendo formas bradizoítas no cérebro de camundongo infectado; (c) oocisto (D) oocisto esporulado.

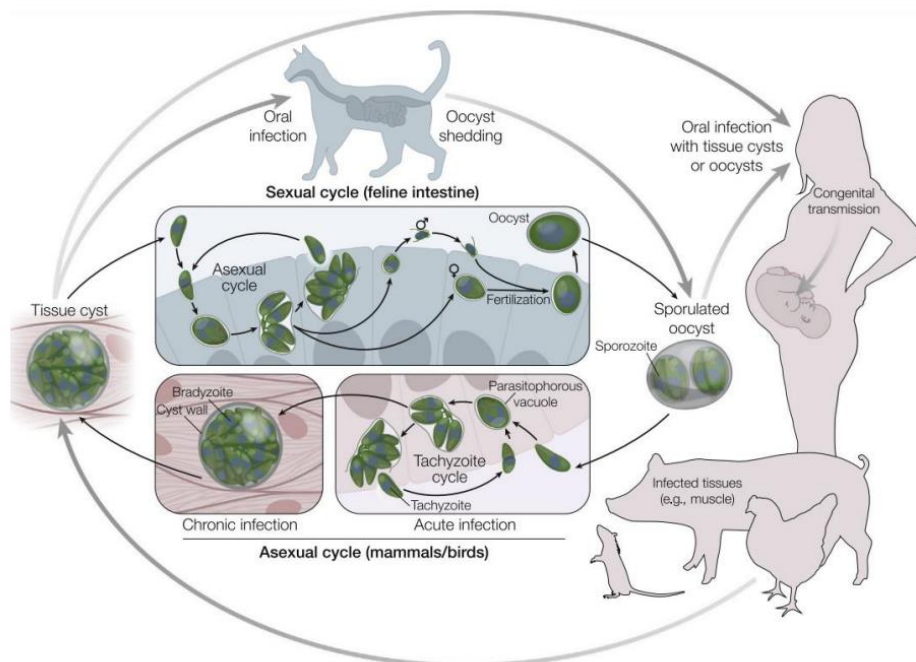
Fonte: Adaptado de ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012.

### 1.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. gondii* é complexo e altamente regulado, o qual se inicia no hospedeiro definitivo (felinos selvagens e domésticos) após a ingestão de cistos teciduais presentes em suas presas. No intestino, a ação de enzimas proteolíticas e o baixo pH promovem a destruição da parede celular dos cistos, liberando os bradizoítos. Esses, invadem os enterócitos, células epiteliais do intestino, e se transformam em esquizontes que dão início a reprodução assexuada por meio da esquizogônia. Durante esse processo, ocorre a divisão nuclear sucessiva, seguida pela formação das membranas, complexo apical, e por fim, individualização das células merozoítas. Posteriormente, ocorre a ruptura dos enterócitos liberando os merozoítos, que por sua vez, são capazes de invadir novas células e se dividir por esquizogônia (ATTIAS et al., 2020).

Aproximadamente 3 a 15 dias após a infecção primária do felino, os esquizontes e merozoítos dão início ao ciclo sexuado, através da formação dos gametas femininos e masculinos. Neste processo, denominado gametogâmia, os merozoítos formam os macrogametas (gameta

feminino), já os esquizontes formam os microgametas (gameta masculino), que possuem dois corpos basais flagelados. Após a fertilização, forma-se os oocistos imaturos contendo um único esporoblasto, que são liberados nas fezes do hospedeiro. Em um período de 18 dias, os felinos podem liberar até 100 milhões de oocistos. Uma vez no meio ambiente, fatores como umidade e calor estimulam o amadurecimento dos oocistos, os quais se dividem em dois esporocistos, cada um contendo dois esporozoítos haploides. Os oocistos se mantem ativos por longos períodos, podendo permanecer infeccioso por até um ano, mesmo em condições de seca (ATTIAS et al., 2020; UDDIN et al., 2021). No hospedeiro intermediário, quando os oocistos são ingeridos, os esporozoítos são liberados e invadem as células epiteliais do intestino, onde se diferenciam em taquizoítos. Esses, se replicam por endogenia e rapidamente se disseminam no organismo do hospedeiro, sendo capaz de invadir células de todos órgãos. Sete a dez dias após a infecção, os taquizoítos se transformam em bradizoítos, ou seja, nas formas de cistos teciduais as quais podem permanecer pela maior parte da vida do hospedeiro (**FIGURA 3**) (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

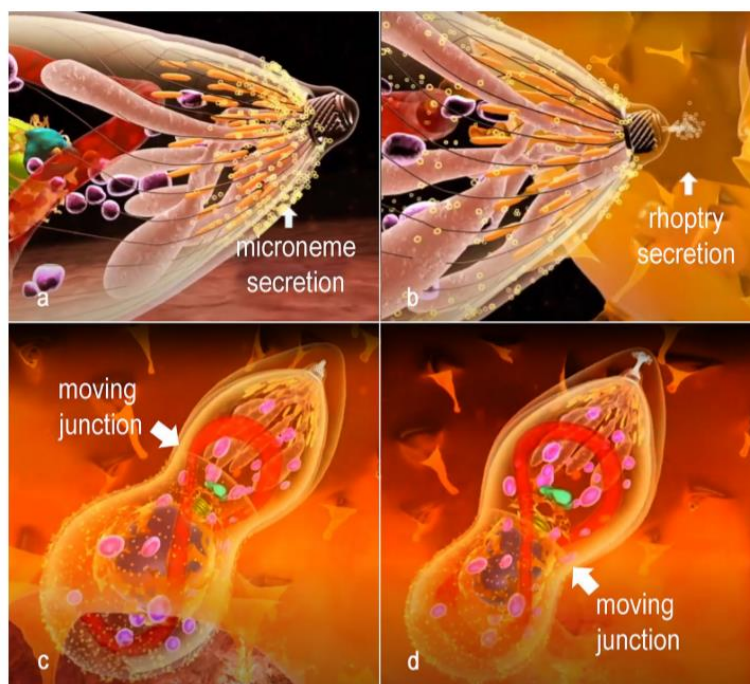


**Figura 3** - Ciclo de vida *Toxoplasma gondii*. O parasito infecta seu hospedeiro definitivo (felinos) através da via oral (ingestão de cistos teciduais ou oocistos). Neles ocorre a fase sexuada que se encerra após a eliminação de oocistos nas fezes do animal. Os oocistos que se encontram no meio ambiente, bem como os cistos teciduais, são capazes de infectar uma vasta gama de hospedeiros intermediários (animais de produção, roedores e humanos), onde o parasito entra na fase assexuada do ciclo, se transformando em taquizoítos que se dividem rapidamente por endogenia. Ainda, os taquizoítos podem se transformar em cistos, que por sua vez, contém diversos bradizoítos, formas silenciosas e características da infecção crônica.

Fonte: LOURIDO, 2019.

#### 1.4 Invasão da célula hospedeira e resposta imune

*T. gondii* é altamente eficiente ao invadir a célula hospedeira, liberando diversas moléculas que desempenham funções específicas nesse processo. Assim, em um primeiro momento, a participação de proteínas secretas pelas micronemas, chamadas de MICs, são essenciais para promover a reorientação e adesão do parasito a superfície da célula hospedeira. Dentre elas, há adesinas, perforinas e serinas. A invasão celular, apesar de ocorrer rapidamente, é complexa e depende da reorganização do citoesqueleto celular, reconhecimento dos receptores celulares, e por fim, da associação entre o complexo apical e membrana celular, formando uma junção móvel e levando a internalização do parasito em um VP (**FIGURA 4**) (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Além de contribuírem para formação da junção móvel e estabelecimento do VP, as ROPs, secretadas pelas Roptrias, também estão envolvidas na invasão e subversão de funções da célula hospedeira (BRADLEY; SIBLEY, 2007). Ainda, há a participação das GRAs, secretadas pelos Grânulos Densos, que atuam na formação de túbulos e estruturas filamentosas na membrana, que permitem a troca de moléculas entre o parasito e célula hospedeira, facilitando a aquisição de nutrientes (GRIFFITH; PEARCE; HEASLIP, 2022).



**Figura 4** - Sequência de eventos durante a invasão da célula hospedeira. (A) Micronemas secretam MICs e (B) adesão a célula hospedeira, seguido pela liberação de ROPs, que inicia a reorganização da célula. (C e D) Formação da junção móvel que permite a entrada e englobamento do parasito para dentro do VP.

Fonte: ATTIAS et al., 2020.

Nos primeiros momentos após a infecção, as células da imunidade inata (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células natural killer) representam a primeira linha de defesa do organismo, sendo essencial no controle inicial da infecção. Mediante o reconhecimento dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), presentes em *T. gondii*, pelos receptores do tipo toll (toll like receptors - TLR), ocorre a secreção de IL-12. Além disso, a mesma também estimula a produção de IFN $\gamma$  que está associado a resposta adequada em indivíduos imunocompetentes (GEE et al., 2009). Em contrapartida, a susceptibilidade com relação a infecção de *T. gondii* é aumentada em casos de depleção das células da imunidade inata, que possuem importância significativa na resposta imune. Outros componentes da imunidade inata também são essenciais nos estágios iniciais da resposta imune para conter o crescimento e disseminação do parasito, como os complexos multiproteicos, denominados inflamassomos, que ativam caspase-1, responsável pela clivagem e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1B e IL-18), promovendo morte celular por piroptose (SANCHEZ; BESTEIRO, 2021; WANG et al., 2020).

Células apresentadoras de antígeno, principalmente macrófagos e células dendríticas, induzem a proliferação de células natural killer, através da secreção de IL-12, e por fim, a produção de IL-18 e TNF- $\alpha$ . Posteriormente, a resposta adaptativa de perfil Th1 desencadeia na expansão de células T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$ , que reconhecem diversos antígenos secretados pelo parasito e secretam IFN $\gamma$ , que por sua vez, é apontado como o principal mediador da resposta imune contra *T. gondii*. Além da imunidade celular, a resposta humoral e produção de anticorpos por células B é de suma importância para o controle da infecção a longo prazo e resistência induzida por vacinação, além disso, são ótimas ferramentas para o diagnóstico e manejo clínico (KHAN; MORETTO, 2022; MATTA et al., 2021). A fase aguda é caracterizada pela presença de anticorpos IgM, que pode ser detectado após uma semana e persistir por meses após a infecção primária. Anticorpos IgG podem ser detectados após cerca de 3 semanas e persistem por anos. Sua avidéz é utilizada para estimar o tempo de infecção, uma vez que, a mesma é baixa durante os primeiros momentos de infecção, porém aumenta nas semanas e meses consecutivos devido a seleção de células B (TEIMOURI et al., 2020).

### **1.5 Animais de produção e a toxoplasmose em suínos**

*T. gondii* possui uma vasta gama de hospedeiros intermediários, sendo encontrado em mais de 350 espécies, incluindo mamíferos domésticos, selvagens e marinhos. A transmissão deste protozoário depende da presença do hospedeiro definitivo e de uma complexa interação de fatores ambientais e comportamentais. Ambientes úmidos e quentes favorecem a sobrevivência dos oocistos de *T. gondii*, contribuindo para sua disseminação. A dieta e os hábitos alimentares também influenciam, com uma prevalência maior observada em carnívoros e onívoros

comparados a herbívoros. O peso e tamanho do animal podem afetar o tempo de exposição ao parasita, enquanto a susceptibilidade varia entre diferentes espécies, como gado, cavalos e veados, que se mostram resistentes à infecção, já marsupiais e primatas do novo mundo apresentam casos sistêmicos e fatais (INNES, 1997; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Animais de produção desempenham um papel crucial epidemiológico, já que cerca de 30-60% dos casos em humanos são atribuídos ao consumo de carnes contaminadas (COOK, 2000). Cistos teciduais são frequentemente observados em carneiros, cabras e suínos infectados. A soroprevalência de *T. gondii* em animais utilizados para o consumo varia de acordo com hábitos culturais e alimentares de cada país, alguns registros chegando a 92% em carneiros; 77% em cabras e 65% em galinhas (KIJLSTRA; JONGERT, 2008; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Nas últimas décadas, em países desenvolvidos, a soroprevalência em suínos reduziu significativamente devido a implementação de estratégias de higiene em criadouros, nos quais os animais são mantidos em ambientes fechados, limpos e livres de roedores, aves, gatos, e outras possíveis fontes de infecção. Tais estratégias reduziu a soroprevalência de suínos destinados ao consumo para <5% (DUBEY; JONES, 2008). No entanto, recentemente, a demanda por sistemas de criação “animal-friendly” e “orgânicos”, coloca em risco a reemergência da infecção. Adicionalmente, a inspeção de suínos por técnicos e veterinários no momento do abate não é realizada, agravando o cenário atual (DUBEY, 2009).

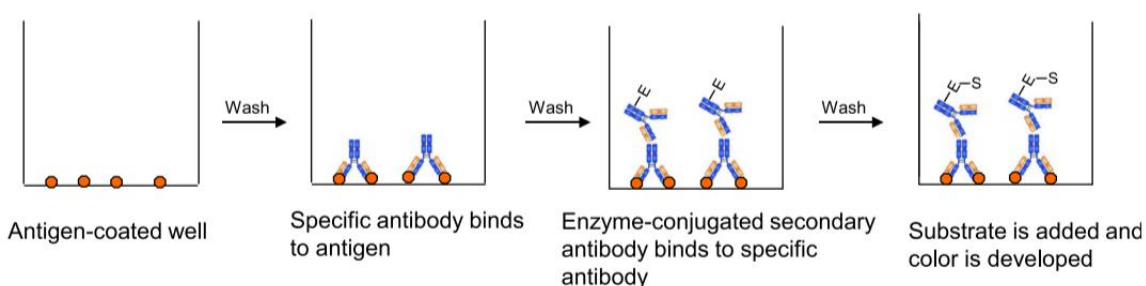
Assim como nos humanos, a toxoplasmose em animais de produção, geralmente é assintomática, sendo que, sintomas severos em suínos é considerado raro (DUBEY, 2009). No entanto, quando presente, as manifestações clínicas podem incluir anorexia, febre, dispneia e fraqueza (ALMERIA; DUBEY, 2021). Sintomas relacionados a distúrbios reprodutivos são preocupantes, podendo incluir aborto, absorção ou mumificação do feto. Tais desfechos causam percas na indústria e ressaltam a importância da detecção de *T. gondii* em suínos (BUXTON, 1998).

### **1.6 Métodos de diagnóstico**

O diagnóstico é crucial para o estudo epidemiológico, prevenção e controle da toxoplasmose em animais e humanos. No entanto, o mesmo é desafiador e complexo devido a inespecificidade e amplo espectro de sintomas; e as diferentes fases clínicas, uma vez que, na sua forma latente o parasito não é encontrado na circulação sanguínea (HILL; DUBEY, 2002; UDDIN et al., 2021). Nesse contexto, diferentes técnicas e abordagens podem ser utilizadas de acordo com o contexto clínico. Dentre elas, *T. gondii* pode ser identificado através de bioensaios, no qual modelos *in vivo* são inoculados com o parasito e posteriormente isolados. Para visualização de formas taquizoítas e bradizoítas a microscopia de fluidos corporais ou cortes histológicos podem ser utilizados. Técnicas de imagem, incluindo tomografia, ultrassonografia e ressonância

magnética, são comumente utilizadas para o diagnóstico de toxoplasmose ocular e cerebral (LIU et al., 2015). Nas últimas décadas, as técnicas moleculares possibilitaram a detecção de material genético de *T. gondii*, comumente realizado através da Reação de Polimerase em cadeia (PCR), que pode ser feito durante a fase aguda da infecção. Porém, a detecção de anticorpos de fase aguda (IgM e IgA) e crônica (IgG) através do diagnóstico sorológico é o mais utilizado, tendo em vista, sua praticidade e fácil implementação laboratorial (YBAÑEZ; YBAÑEZ; NISHIKAWA, 2020).

Para o diagnóstico sorológico, existem diferentes tipos de reação (Teste de Hemoaglutinação Indireta, Reação de Sabin-Feldman, Aglutinação em Látex, Imunofluorescência Indireta, Western Blotting, Imunoabsorbância, dentre outros) que possuem componentes comuns entre si: um antígeno reconhecido por um anticorpo (UDDIN et al., 2021). A Reação de Imunoabsorbância Enzimática (ELISA) é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial, sendo composta por um antígeno ou anticorpo de fase sólida; um antígeno ou anticorpo ligado a uma enzima; e um substrato para a reação enzimática. Existem diferentes tipos de ELISA (direto, indireto, sanduiche e de competição), no qual o Indireto é o mais aplicado na sorologia de *T. gondii* (FIGURA 5). Assim, a reação é performada em uma placa de poliestireno, na qual o antígeno está aderido. O antígeno se liga ao anticorpo, que por sua vez, é reconhecido por um anticorpo secundário conjugado a uma enzima, que ao receber um substrato reage emitindo cor e permitindo a quantificação da luz emitida (LIU et al., 2015). Os antígenos solúveis *T. gondii* (STAg) são comumente utilizados, na qual para sua obtenção é necessário o cultivo *in vitro* ou *in vivo* do parasito. Apesar de sua alta confiabilidade, a preparação antigênica é de alto custo, difícil quantificação e padronização, uma vez que, geram resultados contraditórios dentre diferentes laboratórios, prejudicando a eficácia e qualidade no diagnóstico (YBAÑEZ; YBAÑEZ; NISHIKAWA, 2020).



**Figura 5** - Diagrama esquemático do sistema de ELISA indireto. O antígeno é aderido ao fundo da placa e é posteriormente reconhecido pelo anticorpo presente na amostra. Subsequentemente, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima é adicionado, esse por sua vez, ao receber o substrato reage gerando cor que pode ser quantificada.

Fonte: Adaptado de LIU et al., 2015.

Devido a capacidade de secretar diversas moléculas capazes de gerar uma resposta humoral detectável em imunoenaios, o uso de antígenos de *T. gondii* surgem como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico, visando solucionar as dificuldades existentes nos testes disponíveis (LIU et al., 2015). A alta imunorreatividade de diversas proteínas tem sido reportada pela literatura, dentre elas: SAG1 (APPIAH-KWARTENG et al., 2019), SAG2A, ROP1 (TOMASZ FERRA et al., 2019), GRA1, e GRA6 (LECORDIER et al., 2000). Tais moléculas são altamente versáteis podendo ser utilizadas em peptídeos sintéticos, quiméricos e recombinantes (HAJISSA et al., 2015; SANTANA et al., 2021). Devido a sensibilidade e especificidade, seu uso possibilita a padronização das técnicas, redução dos custos de produção, bem como a capacidade de diferenciar as fases da doença e vias de transmissão (HAJISSA et al., 2017). Dessa forma, tais abordagens são vantajosas e de grande interesse, sendo benéficas, não apenas para o setor pecuário, mas também para a iniciativa de Saúde Única, que visa tratar a esfera ambiental, animal e humana, para que haja o controle efetivo da toxoplasmose.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver imunoenaios utilizando peptídeos sintéticos, preditos a partir de proteínas SRS, GRA, MIC, e ROP, visando a detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro suíno, bem como diferenciar as vias de infecção.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter sequências de aminoácidos e sintetizar peptídeos derivados de proteínas pertencentes às SRS, GRA, MIC, e ROP, para o diagnóstico de infecção por *T. gondii* utilizando ELISA e Dot blot;
- Avaliar a performance dos peptídeos sintéticos em detectar IgG anti-*T. gondii* em testes ELISA;
- Avaliar a efetividade dos peptídeos sintéticos em diferenciar amostras de soro suíno infectadas por oocistos e taquizoítos, oferecendo distinção entre as rotas de transmissão através de testes ELISA;
- Avaliar a performance dos peptídeos sintéticos em detectar IgG anti-*T. gondii* em testes Dot blot.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJZENBERG, D. et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185–1196, set. 2004.
- ALMERIA, S.; DUBEY, J. P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 371–385, mar. 2021.
- APPIAH-KWARTENG, C. et al. Native SAG1 in *Toxoplasma gondii* lysates is superior to recombinant SAG1 for serodiagnosis of *T. gondii* infections in chickens. **Parasitology International**, v. 69, 2019.
- ATTIAS, M. et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites and Vectors**, v. 13, p. 588, 30 out. 2020.
- BEN-HARARI, R. R.; CONNOLLY, M. P. High burden and low awareness of toxoplasmosis in the United States. **Postgraduate Medicine**, v. 131, n. 2, p. 103–108, 17 fev. 2019.
- BEN-HARARI, R. R.; GOODWIN, E.; CASOY, J. Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. **Drugs in R&D**, v. 17, n. 4, p. 523–544, 6 dez. 2017.
- BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 582–587, dez. 2007.
- BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. **Veterinary research**, v. 29, n. 3–4, p. 289–310, 1998.
- CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83–89, fev. 2007.
- CHAICHAN, P. et al. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 227–238, set. 2017.
- COOK, A. J. C. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study Commentary: Congenital toxoplasmosis---further thought for food. **BMJ**, v. 321, n. 7254, p. 142–147, 15 jul. 2000.
- DUBEY, J.; JONES, J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, set. 2008.
- DUBEY, J. P. Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradyzoites of - Different Strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592–602, 2 nov. 1997.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1–2, p. 1–14, jul. 2009.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 1 jul. 2009.



- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, vol. 164, n. 2-4, p. 89-10314, out. 2009.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–99, abr. 1998.
- FRÉNAL, K. et al. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 645–660, 4 nov. 2017.
- FURTADO, J. et al. Toxoplasmosis: A global threat. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 281, 2011.
- GEE, K. et al. The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 40–52, 1 mar. 2009.
- GRIFFITH, M. B.; PEARCE, C. S.; HEASLIP, A. T. Dense granule biogenesis, secretion, and function in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology** John Wiley and Sons Inc, 1 nov. 2022.
- HAJISSA, K. et al. Design and evaluation of a recombinant multi-epitope antigen for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 315, 11 dez. 2015.
- HAJISSA, K. et al. An evaluation of a recombinant multiepitope based antigen for detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 807, 29 dez. 2017.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, 2002.
- INNES, E. A. Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 131–138, fev. 1997.
- KHAN, I. A.; MORETTO, M. Immune responses to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology** Elsevier Ltd, v. 77, 1 ago, 2022.
- KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1359-70, out. 2008.
- LECORDIER, L. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using the Recombinant Dense Granule Antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, vol. 7,4, p. 607-11, 2000.
- LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vectors**, v. 8, p. 292, 28 mai. 2015.
- LOURIDO, S. *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 11, p. 944–945, nov. 2019.
- MAI, K. et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 281–289, mar. 2009.
- MATTA, S. K. et al. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 19,7, p. 467-480, 1 jul. 2021.

MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M.-F. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 60–71, fev. 2015.

MONTOYA, J.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, jun. 2004.

On a Leishman body infection (or related organisms) of the gondi. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 863–864, jul. 2009.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, abr. 2012.

SANCHEZ, S. G.; BESTEIRO, S. The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 3095–3114, 31 dez. 2021.

SANTANA, S. S. et al. A peptide originated from *Toxoplasma gondii* microneme 8 displaying serological evidence to differentiate recent from chronic human infection. **Parasitology International**, v. 84, 1 out. 2021.

SHEINER, L.; VAIDYA, A. B.; MCFADDEN, G. I. The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 452–458, ago. 2013.

SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453–461, 5 abr. 2014.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1–11, 21 jan. 2010.

TEIMOURI, A. et al. Role of *Toxoplasma gondii* IgG Avidity Testing in Discriminating between Acute and Chronic Toxoplasmosis in Pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 9, 24 ago. 2020.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, nov. 2000.

TILLEY, M. et al. *Toxoplasma gondii* Sporozoites Form a Transient Parasitophorous Vacuole That Is Impermeable and Contains Only a Subset of Dense-Granule Proteins. **Infection and immunity**, vol. 65,11, p. 4598-605, 1997.

TOMASZ FERRA, B. et al. The first study on the usefulness of recombinant tetravalent chimeric proteins containing fragments of SAG2, GRA1, ROP1 and AMA1 antigens in the detection of specific anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in mouse and human sera. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 1 jun. 2019.

UDDIN, A. H. M. M. et al. Review on diagnosis and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in humans and animals. **Tropical Biomedicine**, v. 38, n. 4, 2021.

WANG, Y. et al. Insight Into Inflammasome Signaling: Implications for *Toxoplasma gondii* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 16 dez. 2020.

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 4, p. 828–845, 28 abr. 2015.

YBAÑEZ, R. H. D.; YBAÑEZ, A. P.; NISHIKAWA, Y. Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2020.

# CAPÍTULO II

Manuscrito formatado para submissão a revista One Health



The screenshot shows the journal page for One Health on the ScienceDirect platform. The page features a green header with the journal title and impact factors. Below the header is a navigation bar with various links and a search function.

ScienceDirect Journals & Books Help Search My account Sign in

**One Health**  
Open access

8.1 CiteScore | 4.1 Impact Factor

Articles & Issues About Publish Search in this journal Submit your article Guide for authors

1       **Title**

2       Synthetic peptides are useful immunodiagnostic tools for the detection of *Toxoplasma gondii* infection  
3       in pigs

4

5       **Authors**

6       Débora Karolla de Freitas Oliveira<sup>1</sup>, Bruna Barbosa de Sousa Simamoto<sup>1</sup>, Angelis del Valle  
7       Benitez Betancourt<sup>1</sup>, João Luis Garcia<sup>2</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>3</sup>, José Roberto Mineo<sup>1</sup>, Tiago Wilson  
8       Patriarca Mineo<sup>1</sup>,

9       Laboratory of Immunoparasitology “Dr. Mário Endsfeldz Camargo”, Institute of Biomedical  
10      Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil <sup>1</sup>

11      Protozoology Laboratory, Preventive Veterinary Medicine Department, State University of  
12      Londrina, Londrina, Paraná, Brazil <sup>2</sup>

13      Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas  
14      Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil <sup>3</sup>

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28      Corresponding author: [tiago.mineo@ufu.br](mailto:tiago.mineo@ufu.br) (T. W. P. Mineo)

29 **Highlights**

- 30 • Pigs have an important role in disseminating toxoplasmosis through meat consumption
- 31 • Synthetic peptides derived from SAGs and GRAs exhibit serological potential to detect *T.*  
32 *gondii* infection in an Indirect ELISA using serum samples from pigs
- 33 • Six predicted peptides show superior immunoreactivity in ELISAs and dot blots and have the  
34 potential to be used in the field to determine the infection by the parasite in pig farms.

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55 **Abstract**

56

57 *Toxoplasma gondii*, a zoonotic parasite with worldwide distribution, is a major public health concern  
58 since it may be transmitted through the consumption of undercooked meat. Surveillance of the disease  
59 in pigs is a crucial one health initiative to effectively prevent infection, as well as, minimize economic  
60 losses in the meat industry. To date, serological diagnosis continues to pose significant challenges in  
61 these settings, especially due to the expensive and laborious antigen preparations. Therefore, this study  
62 aims in the development of immunoassays based on synthetic peptides, derived of B cell epitopes  
63 predicted from known antigens, in order to detect previous exposure of pigs to *T. gondii*. For that  
64 purpose, we predicted and synthesized 18 peptides from SRS, GRA, MIC, and ROP proteins using  
65 bioinformatic tools. We performed peptide-based ELISAs with positive serum samples extracted from  
66 pigs experimentally infected with *T. gondii* tachyzoites or oocysts, alongside with negative uninfected  
67 controls. Peptides were able to efficiently distinguish positive and negative samples, however,  
68 sequences predicted from SRS29B, MAG1, SRS59B, GRA1, GRA5, and GRA7 showed superior  
69 immunoreactivity. Additionally, we also tested the molecules in a dot blot system, in which all  
70 peptides presented similar performance. Neither assay, regardless of the peptides used, were able to  
71 distinguish *T. gondii* infective forms. Based on these results, we were able to select several peptides  
72 extracted from *T. gondii* proteins that may be used in serological assays directed to determine the  
73 previous exposure of pigs to *T. gondii*.

74 **Keywords:** *Toxoplasma gondii*, pig, serological diagnosis, immunoassays, Indirect-ELISA, dot blot.

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85           **1. Introduction**

86           Toxoplasmosis is a widespread zoonotic disease caused by the intracellular Apicomplexan  
87 protozoa, *Toxoplasma gondii*. Affecting one-third of the human population worldwide, *T. gondii* has a  
88 broad host range, encompassing almost all warm-blooded vertebrates [1]. Livestock are exposed to the  
89 parasite present in the environment and are important reservoirs of *T. gondii*, serving as sources of  
90 infection to humans, thus representing a serious One Health problem, where humans, animals, and the  
91 environment are at risk [2]. Although infection is predominantly asymptomatic, it can result in severe  
92 outcomes for neonates and immunocompromised individuals, causing encephalitis, hydrocephalus,  
93 and retinal choroiditis in humans, and is also associated with morbidity and mortality in other hosts  
94 [3,4]. *T. gondii* is a major concern in pig farms and meat industry, due to the induction of reproductive  
95 disorders, including abortions, stillbirths, and fetal mummification [5,6].

96           Intermediate hosts are typically infected through the ingestion of tissue cyst forms present in raw  
97 or undercooked meat, as well as through water and food contaminated with oocyst forms shed by  
98 felids – the parasite’s definitive hosts - into the environment. Despite the importance of foodborne  
99 transmission, that accounts for 30-63% of human cases, pigs destined for consumption are not  
100 routinely tested for *T. gondii* at slaughter [7,8]. While seroprevalence in pigs is hard to estimate, a  
101 significant reduction of infection in industrialized countries has been observed due to the  
102 implementation of hygiene strategies and cleaner confinements. However, the rise of animal-friendly  
103 production systems puts the industry at risk of re-emergence of the infection [9]. Therefore, there’s an  
104 urgent need to implement fast, cheap and effective detection of *T. gondii* exposure in pigs in order to  
105 effectively control the infection within pig droves.

106           Serological diagnosis plays a predominant role when it comes to toxoplasmosis, allowing the  
107 detection of different classes of antibodies against *T. gondii*. Immunoassays are easily applicable to  
108 laboratory routine and can be performed by different techniques [10]. One of them is the enzyme-  
109 linked immunosorbent assay (ELISA), reliable and widely used to detect acute (IgM and IgA) and  
110 chronic phase (IgG) of infection using a preparation of crude antigens of *T. gondii* [11]. This method  
111 faces significant challenges related to the preparation of antigens, which is labor-intensive, costly, and  
112 prone to inter-assay variations due to the lack of standardization [12,13]. In this sense, research has  
113 increasingly focused on alternative diagnostic tools using surface antigens (SAG) of *T. gondii* and  
114 proteins secreted by micronemes (MIC), rhoptries (ROP), and dense granules (GRA). These molecules  
115 are essential for the invasion and subsequent establishment of the parasite inside the cell, stimulating a  
116 persistent humoral immune response and eliciting antibody production detectable through  
117 immunoassays [14]. For decades, different studies have targeted the use of parasite’s antigens as  
118 purified [15], recombinant protein [16], chimeric or multiepitope [17,18], and synthetic peptides [19].  
119 In that context, we here propose serological diagnostic protocols based on synthetic peptides, derived



120 of B cell epitopes predicted from known antigens, in order to detect previous exposure of pigs to *T.*  
121 *gondii*.

122

## 123 **2. Methods**

### 124 **2.1 Synthetic peptides and protein modeling**

125 We have selected known proteins from *T. gondii*, previously described as antigens or as potential  
126 tools for *T. gondii* detection, namely SRS29B [15], SRS34A [20], BSR4 [21], MAG1 [22], GRA1 [23],  
127 GRA2 [24], GRA3 [25], GRA5 [26], GRA7 [27], and MIC8 [19]. We also synthesized 8 oocyst-  
128 specific peptides from GRA80, GRA80, GRA81, GRA82, ROP26, SRS48K, SRS59B, BRP1, and  
129 CK2 as described and characterized by Antunes et al., 2024 [28]. Protein sequences were obtained in  
130 ToxoDB (<https://toxodb.org/toxo/app/>) using Me49 as the reference strain, in which more data is  
131 available for this type of analyses. Topology prediction was used to exclude signal peptide and  
132 transmembrane domains of each protein. For this we used SignalP 5.0 and TMHMM-2.0 server, both  
133 provided by the DTU Health Tech website (<https://www.healthtech.dtu.dk/>). Prediction of B cell  
134 epitopes was performed in the Immune Epitope Database and Tools (<https://www.iedb.org/>), where  
135 Bepipred was used to obtain sequences considering as reference score values of  $\geq 0.5$ . This tool uses  
136 parameters such as hydrophilicity, flexibility, accessibility, turns, exposed surface, polarity and  
137 antigenic propensity giving a different score for each residue (BepiPred 2.0, Sequential B-Cell Epitope  
138 Predictor) (Table 1).

139 The online tool Innovagen PepCalc (<https://pepcalc.com>) was used to estimate the  
140 physicochemical properties of the molecules such as molecular weight, extinction coefficient, iso-  
141 electric point, and net charge at pH 7. Instability index and average hydrophobicity (GRAVY)  
142 (<https://www.gravy-calculator.de/>) was used, in which negatives values means a better interaction with  
143 water, while positives indexes indicate hydrophobicity (Table 2). The peptides were chemically  
144 synthesized using an automatic synthesizer ResPep SL (Intavis1) in the dedicated core facility at the  
145 Federal University of Minas Gerais. To confirm purity and check identity, the peptides were submitted  
146 to a MALDI method (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization) coupled to a Time-of-flight Mass  
147 Spectrometer [29]. For three-dimensional structure analyses we used the AlphaFold Structure  
148 Prediction Visualization, available on ToxoDB and protein model was visualized through UCSF  
149 ChimeraX (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics)  
150 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>).

151

152

153        **2.2 Pig serum samples**

154        Serum samples were obtained from experimentally infected pigs supplied by Prof. João Luis  
155 Garcia [30]. Briefly, mixed bred pigs, with 6 to 8 weeks old, lodged in separate stables, were divided  
156 in two groups (n = 10/each): TA - intramuscular infection with  $7 \times 10^7$  tachyzoites of the RH strain;  
157 OC - oral infection with  $4 \times 10^4$  oocysts from the VEG strain; UN - uninfected animals. Serum  
158 samples were collected weekly up to slaughter (around 100 days of infection). All samples were  
159 checked for seroconversion by ELISA (Supplementary figure 1). These protocols were approved by  
160 the Ethical Committee for Experimental Utilization of Animals from the State University of Londrina  
161 (CEUA 17/09).

162

163        **2.3 ELISA based on Soluble *Toxoplasma* Antigen (STAg)**

164        The preparation of soluble *T. gondii* antigens (STAg) was conducted as previously established  
165 [31]. Briefly, RH strain parasites were routinely kept in NIH-3T3 cells with RPMI-1640 (Thermo,  
166 USA) supplemented with 2% of fetal calf serum (FCS). After lysis of the cell monolayer, the parasite  
167 enriched suspension was washed with sterile Phosphate-Buffered Saline (PBS) (4°C, 800 x g for 10  
168 minutes) prior to freeze-thaw and sonication cycles. After a final centrifugation (10.000 x g, 4°C for 30  
169 minutes), the protein's concentration was determined using the BCA (Bicinchoninic Acid Assay,  
170 Sigma Aldrich, St. Lois MO, USA) and the antigen was stored at -80°C.

171        ELISA using STAg was performed as previously described [31]. High binding 96 wells platos  
172 (Corning, USA) were sensitized with 10 µg/mL of STAg in carbonate-bicarbonate buffer 0.06 M (pH  
173 9.6) and incubated at 4°C overnight. Plates were washed with 100 µL of PBS 1x plus 0.05% Tween 20  
174 (PBS-T) 3 times and blocked with 5% skimmed milk in PBS-T. After incubation for 1 hour at room  
175 temperature, plates were washed 3 times and samples diluted at 1:64 in 5% skimmed milk PBS-T were  
176 added for 1 hour at 37°C. After another washing cycle (6x), anti-pig was followed IgG peroxidase  
177 (Bio-Rad, USA) at 1:2000 diluted in 5% skimmed milk PBS-T was added. After washing, the reaction  
178 was revealed with 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid peroxidase substrate (ABTS,  
179 Thermo) and read at 405 nm (Molecular Devices, USA) after 5 minutes of incubation at room  
180 temperature, in the dark. The cut off value was determined by the mean of optical density (OD) of  
181 negatives samples plus two standard deviations of negatives samples. The reactivity was expressed by  
182 ELISA index (EI), according to the following formula: OD samples/ cut off. Samples with EI values >  
183 1.2 were considered positive [32].

184

185

## 186 **2.4 Peptide ELISA**

187 For ELISA using synthetic peptides, previous optimization of the reaction was established through  
188 simultaneous testing of different concentrations of antigens, blocking buffers, serum samples, and  
189 conjugated antibodies. Reaction was performed as described before with a few modifications [29].  
190 Plates of 96 wells (Corning, USA) were sensitized with 2 µg/well of the peptide in sodium carbonate  
191 buffer (pH 9.6), then incubated overnight at 37°C. The wells were washed 4 times with 100 µL of  
192 PBS-T and blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS 1x for 1h at 37°C. The serum  
193 samples were diluted at 1:100 in 2.5% BSA in PBS 1x and incubated for 1h at 37°C. After 4 washes,  
194 the anti-pig IgG peroxidase (Bio-Rad, USA) was used as the secondary antibody and diluted at 1:2000  
195 in 2.5% BSA and PBS 1x. Again, the plates were incubated 1h at 37°C and washed 4 times. The  
196 reaction was revealed, read and ELISA index was calculated as described for the STAg ELISA.

197

## 198 **2.5 Dot blot assay**

199 10mm diameter circles of nitrocellulose membranes were coated with 1 µg/µL of each peptide and  
200 dried at 37°C for 15 minutes. The membrane was then blocked with 5% skimmed milk in PBS-T and  
201 incubated for 2 hours, at room temperature under agitation. The membranes were washed with PBS-T  
202 prior to the incubation with serum samples at 1:200, diluted in 1% skimmed milk with PBS-T.  
203 Membranes were incubated overnight at room temperature. The membranes were submitted to a  
204 washing cycle (6x) with PBS-T prior to the addition of the anti-pig IgG peroxidase antibody (Bio-Rad,  
205 USA) at 1:4000 dilution in 1% skimmed milk. After a 2-hour incubation period, the membranes were  
206 again washed and revelation performed with ECL chemiluminescent substrate (Promega, USA)  
207 captured by a dedicated imaging system (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad, USA).

208

## 209 **2.6 Statistical analyses**

210 Data and statistical analyses were performed in GraphPad Prism v. 10. ELISA indexes were  
211 compared by a One-way or Two-way ANOVA. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically  
212 significant.

213

## 214 **3. Results**

215 We started our experiments by testing the level of reactivity of the 18 synthetic peptides in an  
216 Indirect ELISA against samples of naïve and experimentally infected pigs. In that setup, we found that  
217 all peptide were able to discriminate negative and positive samples. On the other hand, it was

218 noteworthy that there were clear differences in reactivity between the peptides. From all the sequences  
219 tested, only one (GRA81<sup>76-89</sup>) failed to detect a single positive control sample. Samples from  
220 tachyzoite infected pigs (TA) presented stronger reaction to most peptides, if compared to samples  
221 derived from the oocyst infected animals (OC), even to those amino acid sequences extracted from  
222 proteins predicted to be sexual stage markers. In order to check for targets that could yield best results  
223 within a diagnostic arrangement, we selected targets that posed highest reactivity rates, establishing  
224 the mean ELISA Index (EI) equal/over 5 as criteria for further enquiry (Table 3). Results obtained with  
225 synthetic peptides with EI under 5 may be observed at Supplementary figure 2. The six selected  
226 peptides (EI > 5) belonged to the SRS and GRA families, namely SRS29B<sup>201-219</sup>, MAG1<sup>107-123</sup>,  
227 SRS59B<sup>534-548</sup>, GRA5<sup>60-72</sup>, GRA1<sup>23-37</sup>, and GRA7<sup>160-179</sup>.

228 The SAG-related sequence 29B, previously known as the Surface Antigen 1 (SAG1) and P30, is a  
229 complex protein, encompassing multiple features, as showed by the three-dimensional model (Figure 1  
230 A). We chose the peptide with the highest B cell epitope prediction score, which curiously did not  
231 seem to be affected by its inner position within the protein structure that included 2 beta-sheets  
232 (Figures 1B, 1C). Accordingly, positive control samples reached the highest mean EI among all tested  
233 targets in ELISAs based on SRS29B<sup>201-219</sup> peptide, with an average EI of 8.06 (Figure 1D). In contrast,  
234 the epitope predicted in another SRS target sequence, SRS59B<sup>534-548</sup>, is positioned in an exposed loop,  
235 that would, in theory, facilitate antibody recognition, as evidenced by the B cell epitope prediction  
236 scores (Figures 2A-C). The prediction of the epitope in this 570 amino acid antigen was located at its  
237 C-terminal end, which presented a good diagnostic performance, with a clear distinction between  
238 positive and negative samples (EI mean = 5,99). However, although SRS59B is considered to be an  
239 antigen with increased expression in sporozoites, the peptide was not able to differentially distinguish  
240 infections by tachyzoites and oocysts (Figure 2D).

241 In a similar manner, GRA1 has 190 amino acids and the GRA1<sup>23-37</sup> peptide contained the predicted  
242 B cell epitope within a loop (Figures 3A, 3B). This predicted peptide also presented a good  
243 performance in ELISA, with average EI of 5.4 (Figures 3 C, 3D). The Matrix Antigen 1 derived  
244 peptide, MAG1<sup>107-123</sup>, also followed the same trend, being positioned in a loop that would provide a  
245 good accessibility for antibody recognition (Figures 4 A - D). Interestingly, this peptide presented a  
246 homogenous reactivity in pigs infected with tachyzoites and oocysts, differently from the others targets,  
247 with an EI mean of 6.07 (Figure 4 D). The peptide chosen for GRA5 (GRA5<sup>60-72</sup>) was contained within  
248 an alpha helix and was not the highest sequence predicted at the BepiPred algorithm (Figures 5 A – C).  
249 Nonetheless, these possible caveats did not seem to have negatively impacted its performance in  
250 ELISA, since the average EI obtained by the samples of experimentally infected pigs was 5.85 (Figure  
251 5D). GRA7<sup>160-179</sup> also followed the same rationale: a peptide located in a more inner portion of the  
252 protein, between alpha helices. However, as it was the case for the synthetic peptide chosen for GRA5,

253 it also was able to efficiently discriminate between infected and uninfected animals (Mean EI = 5.22,  
254 Figures 6 A – D).

255 Based on the data gathered in the ELISAs with these synthetic peptides to detect specific IgGs  
256 generated after infection by *T. gondii*, we the opted to test these antigens in a dot blot setup, in order to  
257 emulated potential use in rapid tests. As expected, samples from pigs infected with tachyzoites and  
258 oocysts strongly reacted with serum samples with the membranes imprinted with each peptide, while  
259 membranes incubated with serum samples from naïve pigs did not emit chemiluminescence signals  
260 (Figure 7A). In terms of differential recognition between the different experimental groups, serum  
261 samples of the TA group reacted stronger than those obtained from the OC for all targets, confirming  
262 the reactivity pattern observed in ELISA. In addition, we also noticed a milder reactivity of individual  
263 samples of infected animals to some peptides, but we were able to clearly discriminate positives and  
264 negatives. This result was confirmed by the pixel intensity of each reaction, where no statistical  
265 differences in the reactivity of the sequences was found, indicating a similar performance for all the  
266 targets in the dot blots (Figure 7B).

267

#### 268 **4. Discussion**

269 *Toxoplasma gondii* is a remarkable protozoan, and much of its success is due to its ability to  
270 secrete a variety of molecules, each with an essential role in cell invasion, immune evasion, and  
271 intracellular survival [33]. Given that many of these proteins may activate the host's immune system  
272 and induce a humoral response, predicted epitopes from these antigens have demonstrated their  
273 potential for detecting serologically positive samples, working as a significant asset for the diagnosis  
274 of *T. gondii* infection [34]. Here, we selected and synthesized peptides predicted from known *T. gondii*  
275 antigens with the aim of detecting specific antibodies in experimentally infected pigs.

276 For that purpose, we predicted B cell epitopes with those antigens, analyzed the peptides within  
277 the protein's three-dimensional structure, as well as tested the reactivity against pig sera by Indirect  
278 ELISA. All 18 predicted epitopes successfully detected specific IgG antibodies in samples of infected  
279 animals, while naive sera remained negative in the peptide-based ELISAs. On the other hand, none of  
280 the 8 peptides derived from proteins that should be enriched in sporozoites, was able to distinguish  
281 experimental infection with tachyzoites or oocysts. Instead, pigs infected with tachyzoites reacted in a  
282 stronger manner to most peptides. This result could be related to the route used to experimentally  
283 infect pigs, with a possibly milder IgG response in orally infected animals with oocysts, compared to  
284 intraperitoneally infected pigs with tachyzoite. Since mucosal immunity plays a predominant role, the  
285 detection of specific IgA could yield a more fitting parameter for detection of previous exposure in  
286 animals orally infected with oocysts [35]. Additionally, parasite genotype and host species also affect  
287 parasite burden and consequent seroconversion [36,37], which may have influenced the outcome.

288 In this study, B cell epitopes derived from proteins of the SRS and GRA families were shown to  
289 the best to discriminate between positive and negative samples SRS29B<sup>201-219</sup> and SRS59B<sup>534-548</sup> are  
290 glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored antigens that are evenly distributed along the parasite's  
291 surface, these are one of the main targets of host immune recognition, making them highly  
292 immunogenic and useful for the detection of *T. gondii* [38,39]. The potential of SAG1 is widely  
293 recognized in the literature, being targeted by multiple approaches, from isolation of the native protein  
294 [15], to the production of recombinant antigens [40], to its association with other antigens in chimeric  
295 construct [41].

296 Proteins from the GRA family may be retained within the parasitophorous vacuole (PV), aiding  
297 the parasite's nutrient acquisition, or be secreted into the host cell, where they act as immune  
298 modulators [14]. GRAs have been repeatedly reported as immune response stimulants with serological  
299 potential [42], with recent studies using GRA-derived peptides joined by linkers [33] and even in a  
300 biosensor-based immunoassay [43]. Thus, besides offering a specific, sensitive method with low  
301 production costs, the application of peptides is not limited to serological detection and can be used for  
302 different approaches. Combining these immunogenic antigens could optimize peptide performance.

303 Our peptides were also tested in a Dot blot system, a membrane array that could be used to  
304 develop new rapid, sensitive, non-invasive, and cost-effective tests. This approach has been widely  
305 pursued, with similar methods used for GRA3, GRA5, GRA6, and GRA7, where the assay  
306 discriminated among major strains of *T. gondii* in mice and human samples [44].

307 With the increasing demand for agricultural production, a rapid test could be widely used on  
308 farms. The detection of *T. gondii* in pigs destined for human consumption would be a significant asset  
309 for disease management, helping to identify infection and prevent transmission and outbreaks. This  
310 represents an advancement from a One Health perspective and offers a step towards the effective  
311 control of *T. gondii*.

312

### 313 **Acknowledgments**

314 This work was supported by Brazilian Research agencies: Fundação Coordenação de  
315 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado  
316 de Minas Gerais (FAPEMIG); and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
317 (CNPq).

318

319

320 **References**

- 321 [1] F. Robert-Gangneux, M.-L. Dardé, Epidemiology of and Diagnostic Strategies for  
322 Toxoplasmosis, *Clin Microbiol Rev* 25 (2012) 264–296. [https://doi.org/10.1128/CMR.05013-](https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11)  
323 11.
- 324 [2] J.P. Dubey, F.H.A. Murata, C.K. Cerqueira-Cézar, O.C.H. Kwok, C. Su, Economic and public  
325 health importance of *Toxoplasma gondii* infections in sheep: 2009–2020, *Vet Parasitol* 286  
326 (2020) 109195. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109195>.
- 327 [3] J. Montoya, O. Liesenfeld, Toxoplasmosis, *The Lancet* 363 (2004) 1965–1976.  
328 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).
- 329 [4] J.P. Dubey, Toxoplasmosis: an overview., *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 22 Suppl  
330 (1991) 88–92.
- 331 [5] S. Almeria, J.P. Dubey, Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last  
332 decade. An overview, *Res Vet Sci* 135 (2021) 371–385.  
333 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.019>.
- 334 [6] J.P. Dubey, C.K. Cerqueira-Cézar, F.H.A. Murata, O.C.H. Kwok, D. Hill, Y. Yang, C. Su, All  
335 about *Toxoplasma gondii* infections in pigs: 2009–2020, *Vet Parasitol* 288 (2020) 109185.  
336 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109185>.
- 337 [7] J.P. Dubey, Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years, *Vet Parasitol* 163 (2009) 1–14.  
338 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026>.
- 339 [8] A.J.C. Cook, Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-  
340 control study Commentary: Congenital toxoplasmosis---further thought for food, *BMJ* 321  
341 (2000) 142–147. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>.
- 342 [9] A. Kijlstra, E. Jongert, *Toxoplasma*-safe meat: close to reality?, *Trends Parasitol* 25 (2009) 18–  
343 22. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.008>.
- 344 [10] M. Pal, B. Alem, G. Tuli, Toxoplasmosis in Animals and Humans - Its Diagnosis, Epidemiology  
345 and Control, *International Journal of Livestock Research* 4 (2014) 1.  
346 <https://doi.org/10.5455/ijlr.20140608054253>.
- 347 [11] A.H.M.M. Uddin, D. Hossain, M.I. Ahsan, M. Atikuzzaman, M.R. Karim, Review on diagnosis  
348 and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in humans and animals, *Trop Biomed* 38  
349 (2021). <https://doi.org/10.47665/tb.38.4.091>.
- 350 [12] S. Pishkari, S. Shojaee, H. Keshavarz, M. Salimi, M. Mohebal, Evaluation of *Toxoplasma gondii*  
351 soluble, whole and excretory/secretary antigens for diagnosis of toxoplasmosis by ELISA test,  
352 *Journal of Parasitic Diseases* 41 (2017) 289–291. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0794-1>.
- 353 [13] B. Ferra, L. Holec-Gasior, J. Kur, Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals  
354 (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens,  
355 *Parasitol Int* 64 (2015) 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.03.004>.

- 356 [14] S.G. Sanchez, S. Besteiro, The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*, *Virulence* 12  
357 (2021) 3095–3114. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2012346>.
- 358 [15] F. Santoro, D. Afchain, R. Pierce, J.Y. Cesbron, G. Ovlaque, A. Capron, Serodiagnosis of  
359 *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30)., *Clin Exp Immunol* 62 (1985) 262–  
360 9.
- 361 [16] Y. Song, Y. Zhao, K. Pan, B. Shen, R. Fang, M. Hu, J. Zhao, Y. Zhou, Characterization and  
362 evaluation of a recombinant multiepitope peptide antigen MAG in the serological diagnosis of  
363 *Toxoplasma gondii* infection in pigs, *Parasit Vectors* 14 (2021) 408.  
364 <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04917-w>.
- 365 [17] J. Dai, M. Jiang, Y. Wang, L. Qu, R. Gong, J. Si, Evaluation of a recombinant multiepitope  
366 peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection, *Clinical and Vaccine Immunology* 19  
367 (2012). <https://doi.org/10.1128/CVI.05553-11>.
- 368 [18] K. Hajissa, R. Zakaria, R. Suppian, Z. Mohamed, An evaluation of a recombinant multiepitope  
369 based antigen for detection of *Toxoplasma gondii* specific antibodies, *BMC Infect Dis* 17 (2017)  
370 807. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2920-9>.
- 371 [19] S.S. Santana, V.F. Paiva, F.R. Carvalho, H.L.S. Barros, T.L. Silva, P.S.C. Barros, A.C.A.M.  
372 Pajuaba, G.B. Barros, R. Dietze, T.W.P. Mineo, J.R. Mineo, A peptide originated from  
373 *Toxoplasma gondii* microneme 8 displaying serological evidence to differentiate recent from  
374 chronic human infection, *Parasitol Int* 84 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102394>.
- 375 [20] S.R. Béla, D.A. Oliveira Silva, J.P. Cunha-Júnior, C.P. Pirovani, F.A. Chaves-Borges, F. Reis  
376 de Carvalho, T. Carrijo de Oliveira, J.R. Mineo, Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii*  
377 surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and  
378 avidity of IgG and IgG1 antibodies, *Diagn Microbiol Infect Dis* 62 (2008) 245–254.  
379 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.017>.
- 380 [21] M. Di Cristina, P. Del Porto, W. Buffolano, E. Beghetto, A. Spadoni, S. Guglietta, E. Piccolella,  
381 F. Felici, N. Gargano, The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce  
382 early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection, *Microbes Infect* 6  
383 (2004) 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.11.009>.
- 384 [22] L. Holec, E. Hiszczyńska-Sawicka, A. Gąsior, A. Brillowska-Dąbrowska, J. Kur, Use of MAG1  
385 Recombinant Antigen for Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans, *Clinical and*  
386 *Vaccine Immunology* 14 (2007) 220–225. <https://doi.org/10.1128/CVI.00419-06>.
- 387 [23] L. Lecordier, † Marie-Pierre Fourmaux, C. Mercier, E. Dehecq, ‡ E Masy, M.-F. Cesbron-  
388 Delauw, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using the Recombinant Dense Granule  
389 Antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G  
390 Antibodies, 2000. <https://journals.asm.org/journal/cdli>.



- 391 [24] M. Golkar, S. Rafati, M.S. Abdel-Latif, M.-P. Brenier-Pinchart, H. Fricker-Hidalgo, B.K. Sima,  
392 J. Babaie, H. Pelloux, M.-F. Cesbron-Delauw, C. Mercier, The dense granule protein GRA2, a  
393 new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected  
394 in both France and Iran from pregnant women, *Diagn Microbiol Infect Dis* 58 (2007) 419–426.  
395 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.003>.
- 396 [25] D. Arranz-Solís, L.R. Tana, E. Tejerina-de-Urbe, N.M. López-Ureña, B. Koudela, M.E. Francia,  
397 L.M. Ortega-Mora, G. Álvarez-García, A combination of GRA3, GRA6 and GRA7 peptides  
398 offer a useful tool for serotyping type II and III *Toxoplasma gondii* infections in sheep and pigs,  
399 *Front Cell Infect Microbiol* 14 (2024). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1384393>.
- 400 [26] L. Holec-Gasior, J. Kur, *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of  
401 immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay, *Exp Parasitol* 124  
402 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.10.010>.
- 403 [27] A. Teimouri, M.J. Abbaszadeh Afshar, S. Mohtasebi, S. Jafarpour Azami, R. Alimi, H.  
404 Keshavarz, Assessment of an In-House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and IgG Avidity  
405 Test Based on SAG1 and GRA7 Proteins for Discriminating between Acute and Chronic  
406 Toxoplasmosis in Humans, *J Clin Microbiol* 59 (2021). <https://doi.org/10.1128/JCM.00416-21>.
- 407 [28] A.V. Antunes, M. Shahinas, C. Swale, D.C. Farhat, C. Ramakrishnan, C. Bruley, D. Cannella,  
408 M.G. Robert, C. Corrao, Y. Couté, A.B. Hehl, A. Bougdour, I. Coppens, M.A. Hakimi, In vitro  
409 production of cat-restricted *Toxoplasma* pre-sexual stages, *Nature* 625 (2024) 366–376.  
410 <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06821-y>.
- 411 [29] W.F. Siqueira, M.S. Cardoso, V.G. Fraga, J. Ottino, V.M. Ribeiro, C.N. Gondim, J.M. de P.  
412 Barçante, A.C.A. Gomes, A.S. Galdino, K. Eersels, B. van Grinsven, D.C. Bartholomeu, L.L.  
413 Bueno, T. Cleij, R.T. Fujiwaraid, Immunogenic mapping of rDyn-1 and rKDDR-plus proteins  
414 and selection of oligopeptides by immunoblotting for the diagnosis of *Leishmania infantum*-  
415 infected dogs, *PLoS Negl Trop Dis* 17 (2023). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011535>.
- 416 [30] J.L. Garcia, S.M. Gennari, I.T. Navarro, R.Z. Machado, I.L. Sinhorini, R.L. Freire, E.R.M.  
417 Marana, V. Tsutsui, A.P.A. Contente, L.P. Begale, Partial protection against tissue cysts  
418 formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*, *Vet Parasitol*  
419 129 (2005) 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.01.006>.
- 420 [31] F.R. Carvalho, D.A.O. Silva, J.P. Cunha, M.A. Souza, T.C. Oliveira, S.R. Béla, G.G. Faria, C.S.  
421 Lopes, J.R. Mineo, Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies  
422 against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect  
423 specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera, *Clinical and Vaccine*  
424 *Immunology* 15 (2008) 1265–1271. <https://doi.org/10.1128/CVI.00069-08>.
- 425 [32] D.A.O. Silva, N.M. Silva, T.W.P. Mineo, A.A. Pajuaba Neto, E.A. V Ferro, J.R. Mineo,  
426 Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs

- 427 experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain., *Vet Parasitol* 107 (2002) 181–95.  
428 [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00132-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00132-2).
- 429 [33] L. Xicoténcatl-García, S. Enriquez-Flores, D. Correa, Testing New Peptides From *Toxoplasma*  
430 *gondii* SAG1, GRA6, and GRA7 for Serotyping: Better Definition Using GRA6 in  
431 Mother/Newborns Pairs With Risk of Congenital Transmission in Mexico, *Front Cell Infect*  
432 *Microbiol* 9 (2019). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00368>.
- 433 [34] M. Attias, D.E. Teixeira, M. Benchimol, R.C. Vommaro, P.H. Crepaldi, W. De Souza, The life-  
434 cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations, *Parasit Vectors* 13 (2020).  
435 <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>.
- 436 [35] P. da S. Watanabe, A.R. Trevizan, S.E. Silva-Filho, M.B. Góis, J.L. Garcia, R.K.N. Cuman, A.C.  
437 Breithaupt-Faloppa, D. de M.G. Sant`Ana, G. de A. Nogueira de Melo, Immunocompetent host  
438 develops mild intestinal inflammation in acute infection with *Toxoplasma gondii*, *PLoS One* 13  
439 (2018) e0190155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190155>.
- 440 [36] D.P. Chiebao, H.F. de J. Pena, A.D. Cabral, M.P. Rocca, E.G. Lopes, S.Y.O.B. Valadas, L.B.  
441 Keid, J.H.H. Grisi Filho, R.M. Soares, Infection of mice with oocysts of *Toxoplasma gondii* by  
442 oral route showed differences of virulence from Brazilian RFLP genotypes BrI and BrIII, *Res*  
443 *Vet Sci* 107 (2016) 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.010>.
- 444 [37] D.K. Howe, L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of  
445 Parasite Genotype with Human Disease, *Journal of Infectious Diseases* 172 (1995) 1561–1566.  
446 <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>.
- 447 [38] C. Lekutis, D.J.P. Ferguson, M.E. Grigg, M. Camps, J.C. Boothroyd, Surface antigens of  
448 *Toxoplasma gondii*: variations on a theme, *Int J Parasitol* 31 (2001) 1285–1292.  
449 [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00261-2).
- 450 [39] H.V. Nielsen, S.L. Lauemøller, L. Christiansen, S. Buus, A. Fomsgaard, E. Petersen, Complete  
451 Protection against Lethal *Toxoplasma gondii* Infection in Mice Immunized with a Plasmid  
452 Encoding the SAG1 Gene, 1999.
- 453 [40] T. Qi, J. Ai, Y. Sun, H. Ma, M. Kang, X. You, J. Li, Application of *Toxoplasma gondii*-specific  
454 SAG1, GRA7 and BAG1 proteins in serodiagnosis of animal toxoplasmosis, *Front Cell Infect*  
455 *Microbiol* 12 (2022). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1029768>.
- 456 [41] A. Huertas-López, M. Contreras Rojo, W. Sukhumavasi, S. Martínez-Subiela, G. Álvarez-  
457 García, N.M. López-Ureña, J.J. Cerón, C. Martínez-Carrasco, Comparative performance of five  
458 recombinant and chimeric antigens in a time-resolved fluorescence immunoassay for detection  
459 of *Toxoplasma gondii* infection in cats, *Vet Parasitol* 304 (2022).  
460 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109703>.
- 461 [42] J.S. Ma, M. Sasai, J. Ohshima, Y. Lee, H. Bando, K. Takeda, M. Yamamoto, Selective and strain-  
462 specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6,

463 Journal of Experimental Medicine 211 (2014) 2013–2032.  
464 <https://doi.org/10.1084/jem.20131272>.

465 [43] S. Sousa, A. Castro, J.M. Correia da Costa, E. Pereira, Biosensor Based Immunoassay: A New  
466 Approach for Serotyping of *Toxoplasma gondii*, *Nanomaterials* 11 (2021) 2065.  
467 <https://doi.org/10.3390/nano11082065>.

468 [44] D. Arranz-Solís, C.G. Carvalheiro, E.R. Zhang, M.E. Grigg, J.P.J. Saeij, *Toxoplasma* GRA  
469 Peptide-Specific Serologic Fingerprints Discriminate Among Major Strains Causing  
470 Toxoplasmosis, *Front Cell Infect Microbiol* 11 (2021).  
471 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.621738>.

472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486

## Tables

Protein	Peptide sequence	Amino acids position
SRS16C	TSAARGTESGKT	194 - 205
SRS29B	GVKVPQDNNQYCSGTTLTG	201 - 219
SRS34A	CVAEAGAPAGRNNGSSAP	123 - 142
SRS48K	CKALIEVKGVPK	327 - 338
SRS59B	C+IHVPGTDSTSSGPGS	534 - 548
GRA1	AAEGGDNQSSAVSDR	23 - 37
GRA2	NVESDRSTTTTQAPDS	142 - 157
GRA3	DAESDKVDNQAEGGE	95 - 109
GRA5	FERGRAAVTGHPV	60 - 72
GRA7	VPELTEEQQRGDEPLTTGQN	160 - 179
GRA80	C+RPPWAPGAGPEN	201 - 212
GRA81	C+QKELAEVAQRALEN	76 - 89
GRA82	C+SDVNTEGDATVANPE	50 - 64
MAG1	CEEQQEQGDTTLDHDF	107 - 123
MIC8	MIPSAPAPPPSGGIW	668 - 683
BRP1	C+QVKEGTKNNKGLSDK	124 - 138
ROP26	CQETVQGNGETQL	559 - 570
CK2	C+IRAQYHAYKGKYSHA	269 - 283

**Table 1.** Selected antigens of *Toxoplasma gondii* including SAG-related sequences, dense granules, micronemes, and rhoptries proteins. Bepipred B cell epitope prediction was used to obtain the amino acid sequence of each target and position of peptide in the protein is indicated in the last column.

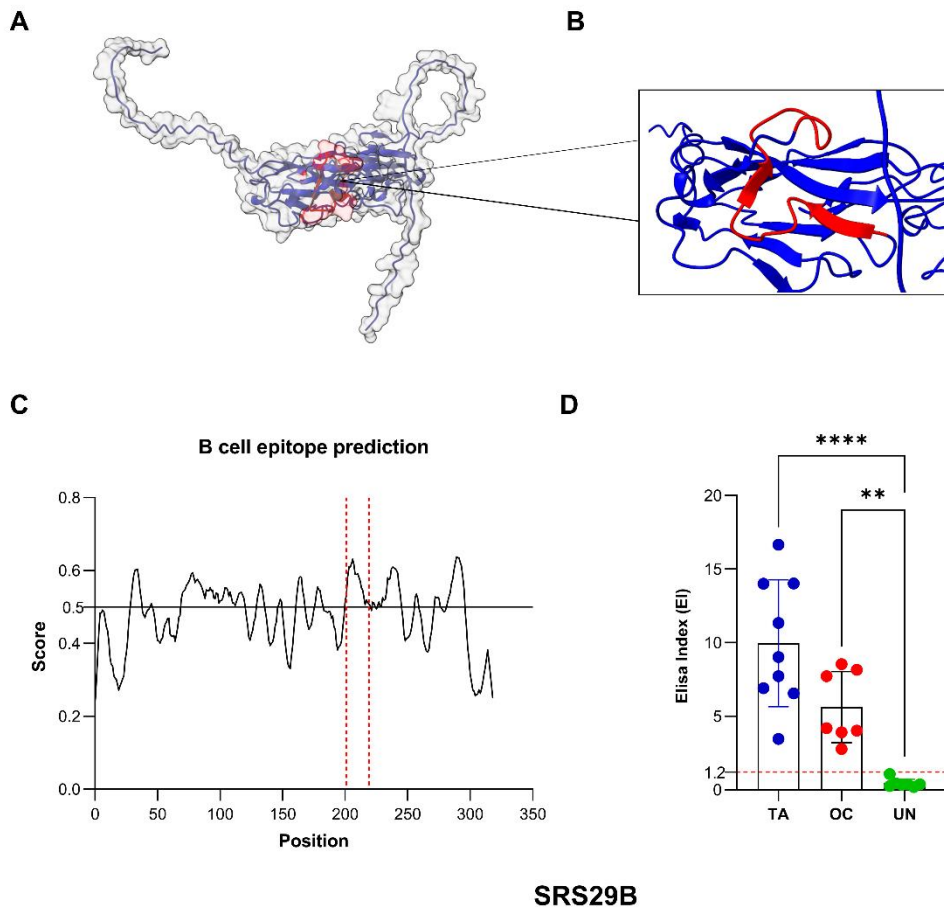
Peptide	Number of residues	Molecular weight	Extinction coefficient	Iso-electric point	Net charge at pH 7	GRAVY
SRS29B <sup>201-219</sup>	19	1982.14 g/mol	1280 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 5.91	-0.1	-0.72
MIC8 <sup>668-683</sup>	15	1477.73 g/mol	5690 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 3.35	0	0.21
GRA2 <sup>142-157</sup>	16	1708.69 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 3.54	-2	-1.425
SRS34A <sup>123-142</sup>	18	1628.73 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 6.14	-0.1	-0.294
MAG1 <sup>107-123</sup>	17	1981.96 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 3.19	-6	-1.65
BSR4 <sup>194-205</sup>	12	1165.21 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 9.81	1	-1.06
GRA1 <sup>23-37</sup>	15	1463.42 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 3.54	-2	-1.04
GRA7 <sup>160-179</sup>	20	2241.33 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 3.44	-4	-1.51
GRA3 <sup>95-109</sup>	15	1563.49 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 3.19	-5	-1.71
GRA5 <sup>60-72</sup>	13	1396.55 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 10.44	1.1	-0.30
GRA80 <sup>201-212</sup>	13	1351.49 g/mol	5690 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 6.14	-0.1	-1.33
GRA81 <sup>76-89</sup>	15	1701.9 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 4.45	-1.1	-0.87
GRA82 <sup>50-64</sup>	16	1621.64 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 0.56	-4.1	-0.88
ROP26 <sup>559-570</sup>	13	1406.48 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 0.76	-2.1	-1.26
SRS48K <sup>327-338</sup>	12	1284.61 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 10.09	1.9	0.11
SRS59B <sup>554-548</sup>	16	1501.58 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 4.87	-1	-0.46
BRP1 <sup>124-138</sup>	16	1748.96 g/mol	0 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 9.98	1.9	-1.82
CK2 <sup>269-283</sup>	16	1896.14 g/mol	3840 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	pH 9.99	3.1	-1.16

**Table 2.** Properties of the 18 predicted peptides estimated by the online tools Innovagen PepCalc and GRAVY.

Peptide	EI mean
SRS29B <sup>201-219</sup>	8.06
MAG1 <sup>107-123</sup>	6.07
SRS59B <sup>554-548</sup>	5.99
GRA5 <sup>60-72</sup>	5.85
GRA1 <sup>23-37</sup>	5.40
GRA7 <sup>160-179</sup>	5.22
SRS34A <sup>123-142</sup>	4.65
GRA2 <sup>142-157</sup>	4.54
GRA3 <sup>95-109</sup>	4.41
MIC8 <sup>668-683</sup>	3.85
BSR4 <sup>194-205</sup>	3.78
BRP1 <sup>124-138</sup>	3.56
GRA81 <sup>76-89</sup>	2.77
GRA80 <sup>201-212</sup>	2.72
GRA82 <sup>50-64</sup>	2.60
SRS48K <sup>327-338</sup>	2.67
ROP26 <sup>559-570</sup>	2.50
CK2 <sup>269-283</sup>	2.49

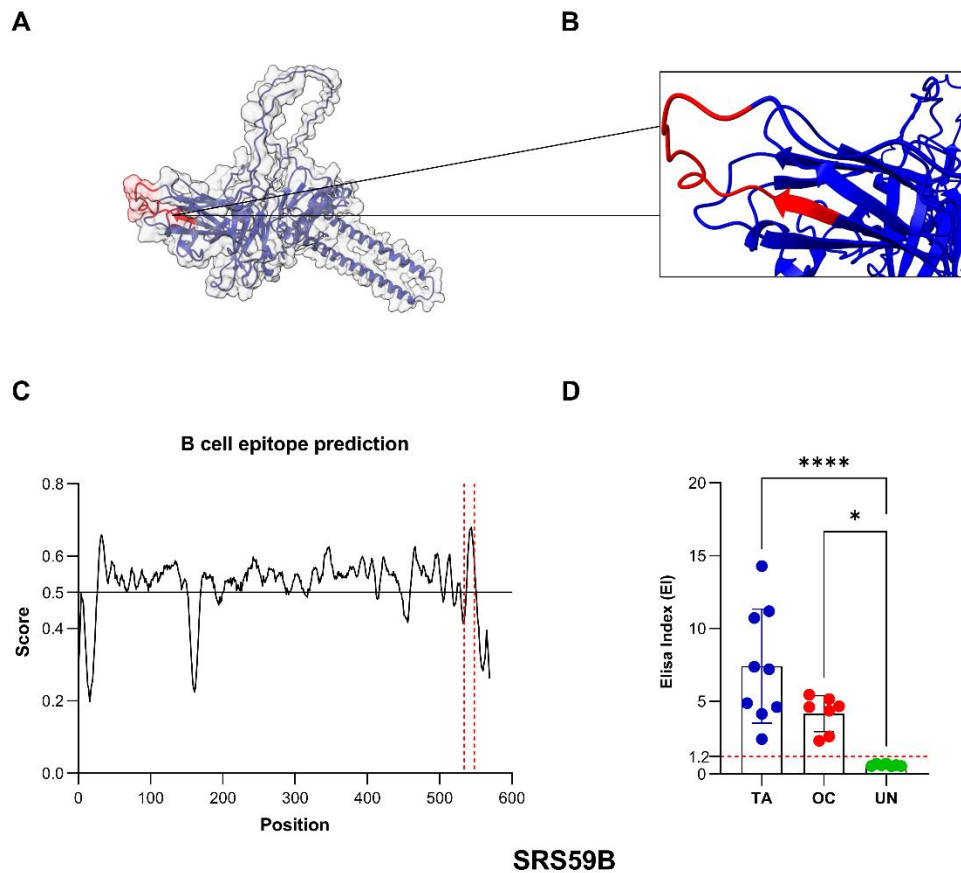
**Table 3.** Average ELISA Index obtained assessing sera of pigs experimentally infected with tachyzoites and oocysts of *Toxoplasma gondii*, with different synthetic peptides based on B cell epitopes predicted in proteins of different parasitic organelles, namely surface SAG-related sequences, dense granules, micronemes, and rhoptries.

## Figures



**Figure 1. Epitope prediction and immunoreactivity of Indirect ELISA using SRS29B derived peptide.**

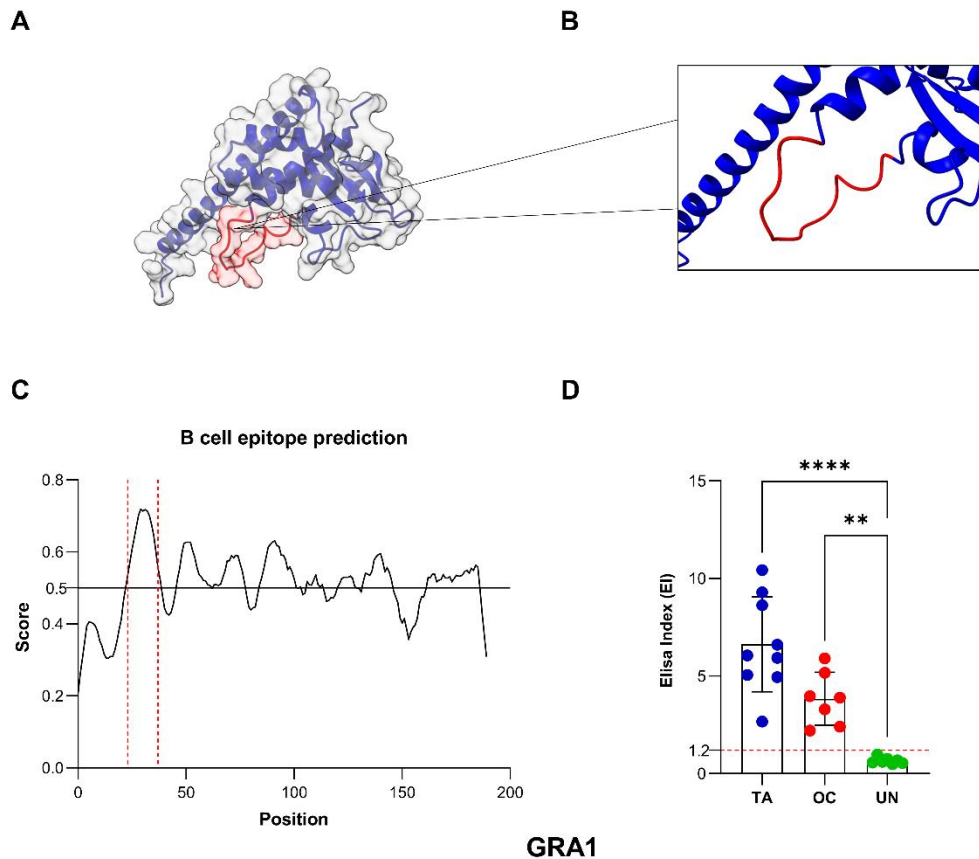
(A) Three-dimensional model of SRS29B protein highlighting in red the predicted peptide position. (B) Zoomed image allows greater visualization of peptide and its conformation. (C) B cell epitope prediction using BepiPred 2.0 (IEDB), where red line indicates peptide and black line the reference score of  $\geq 0.5$ . (D) The Plot of Indirect ELISA shows immunoreactivity of SRS29B<sup>201-219</sup>, in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n = 7) pigs serum samples. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.



**Figure 2. Epitope prediction and immunoreactivity of Indirect ELISA using SRS59B derived peptide.**

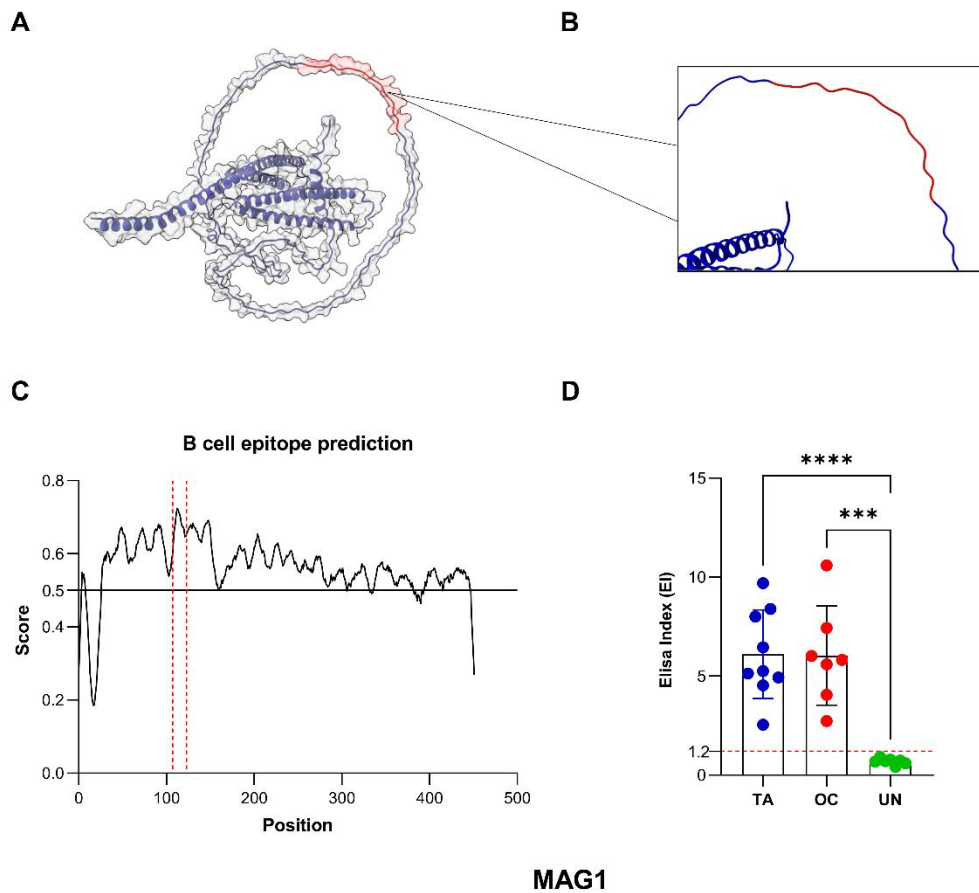
(A) Three-dimensional model of SRS59B protein highlighting in red the predicted peptide position. (B) Zoomed image allows greater visualization of peptide and its conformation. (C) B cell epitope prediction using BepiPred 2.0 (IEDB), where red line indicates the selected sequence and black line the reference score of  $\geq 0.5$ . (D) The Plot of Indirect ELISA shows immunoreactivity of SRS59B<sup>534-548</sup> in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n = 7) pigs serum samples. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.





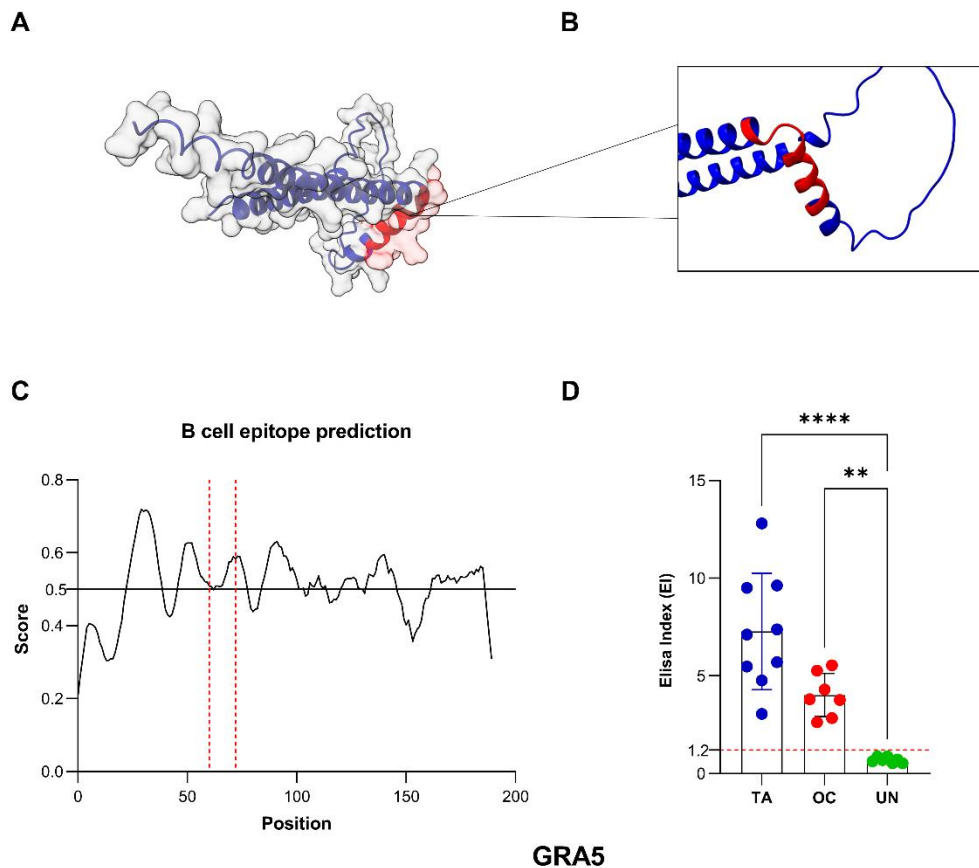
**Figure 3. Epitope prediction and immunoreactivity of Indirect ELISA using GRA1 derived peptide.**

(A) Three-dimensional model of GRA1 protein highlighting in red the predicted peptide position. (B) Zoomed image allows greater visualization of peptide and its conformation. (C) B cell epitope prediction using BepiPred 2.0 (IEDB), where red line indicates the selected sequence and black line the reference score of  $\geq 0.5$ . (D) The Plot of Indirect ELISA shows immunoreactivity of GRA1<sup>23-37</sup> in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n = 7) pigs serum samples. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.



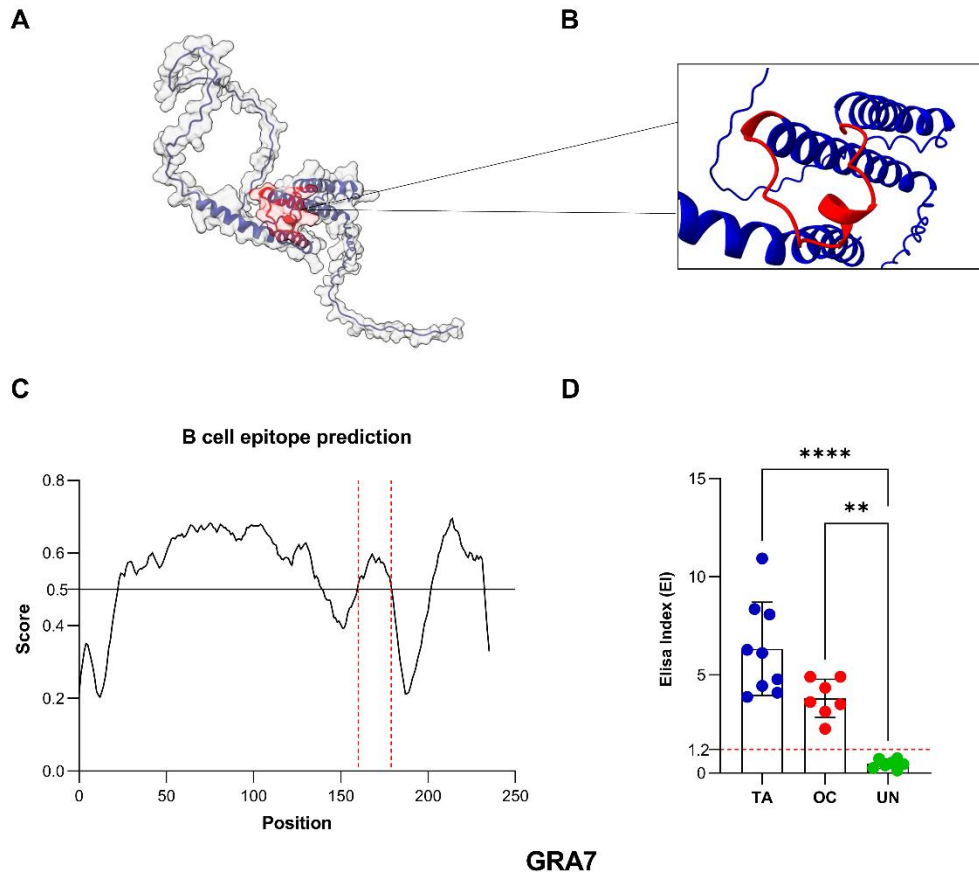
**Figure 4. Epitope prediction and immunoreactivity of Indirect ELISA using MAG1 derived peptide.**

(A) Three-dimensional model of MAG1 protein highlighting in red the predicted peptide position. (B) Zoomed image allows greater visualization of peptide and its conformation. (C) B cell epitope prediction using BepiPred 2.0 (IEDB), where red line indicates the selected sequence and black line the reference score of  $\geq 0.5$ . (D) The Plot of Indirect ELISA shows immunoreactivity of MAG1<sup>107-123</sup> in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n = 7) pigs serum samples. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.



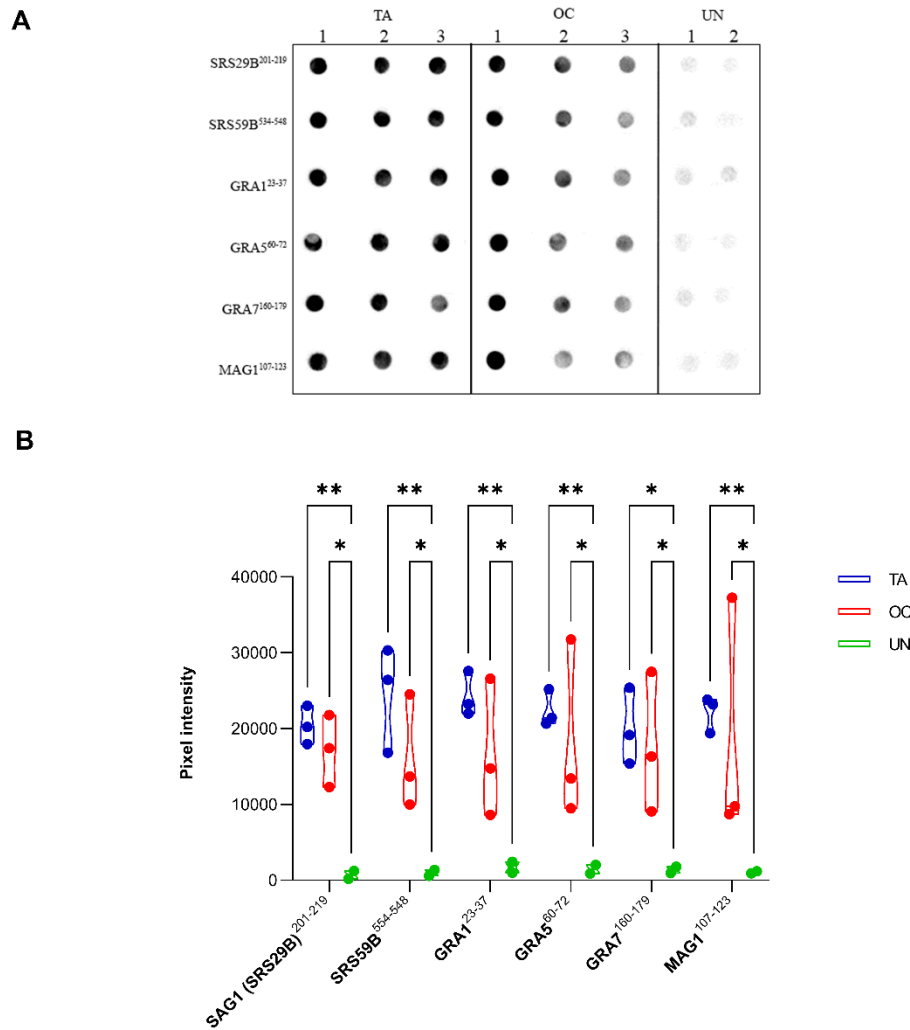
**Figure 5. Epitope prediction and immunoreactivity of Indirect ELISA using GRA5 derived peptide.**

(A) Three-dimensional model of GRA5 protein highlighting in red the predicted peptide position. (B) Zoomed image allows greater visualization of peptide and its conformation. (C) B cell epitope prediction using BepiPred 2.0 (IEDB), where red line indicates the selected sequence and black line the reference score of  $\geq 0.5$ . (D) The Plot of Indirect ELISA shows immunoreactivity of GRA5<sup>60-72</sup> in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n = 7) pigs serum samples. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.



**Figure 6. Epitope prediction and immunoreactivity of Indirect ELISA using GRA7 derived peptide.**

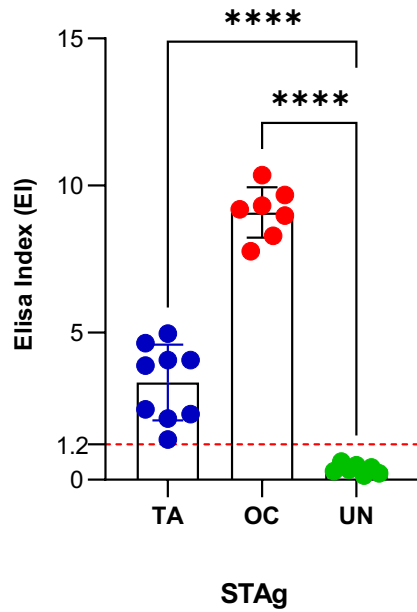
(A) Three-dimensional model of GRA5 protein highlighting in red the predicted peptide position. (B) Zoomed image allows greater visualization of peptide and its conformation. (C) B cell epitope prediction using BepiPred 2.0 (IEDB), where red line indicates the selected sequence and black line the reference score of  $\geq 0.5$ . (D) The Plot of Indirect ELISA shows immunoreactivity of GRA5<sup>60-72</sup> in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n = 7) pigs serum samples. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.



**Figure 7. Dot blot of peptides**

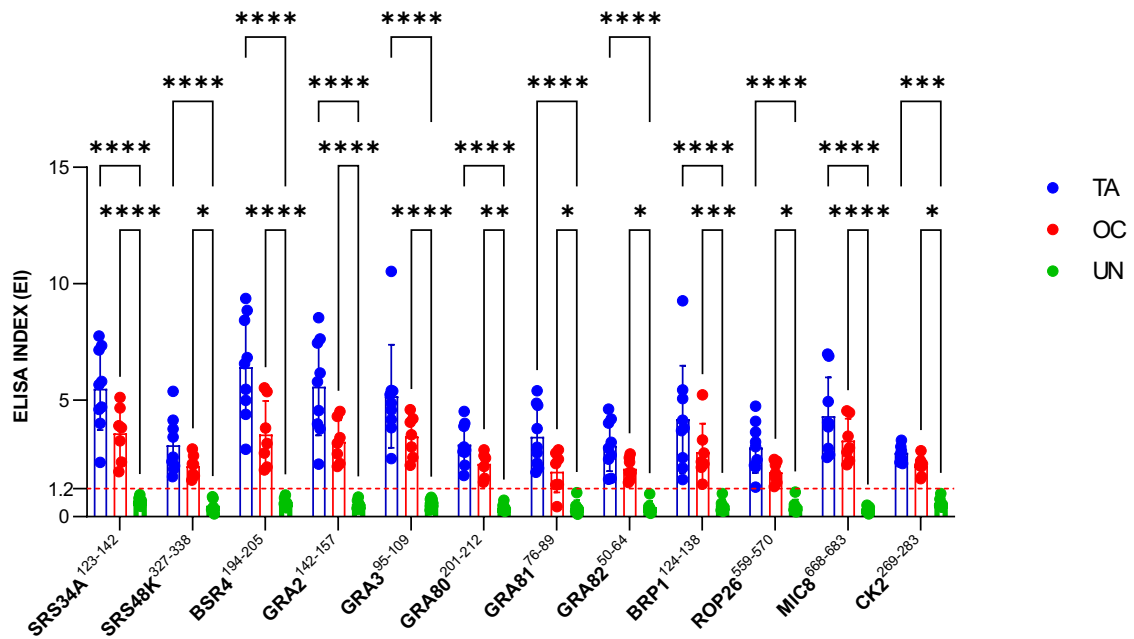
(A) Chemiluminescence image of dot blots shows immunoreactivity of the SRS29B<sup>201-219</sup>, SRS59B<sup>534-548</sup>, GRA5<sup>60-72</sup>, GRA1<sup>23-37</sup>, GRA7<sup>160-179</sup> and MAG1<sup>107-123</sup>, respectively. Uninfected samples (UN) (1 and 2) did not react, while samples from infected with tachyzoites (TA) (1, 2 and 3), and oocysts (OC) (1, 2 and 3) showed immunoreactivity of peptides. (B) Intensity of pixels were used to measure peptides performance. Statistical analyses using a Two-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, shows difference among uninfected and infected samples.

## Supplementary figures



### Supplementary figure 1. Indirect ELISA using STAg.

Plot of Indirect ELISA using STAg in uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n= 7) pigs serum samples. . Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.



**Supplementary figure 2. Immunoreactivity of peptides derived from SRS, GRA, ROP and MIC.**

Plot of Indirect ELISA showing reactivity of uninfected (UN) (n = 7), experimentally infected with tachyzoites (TA) (n = 9), and oocysts (OC) (n= 7) pigs serum samples against derived peptides of: SRS34A, SRS48K, BSR4, GRA2, GRA3, GRA80, GRA81, GRA82, BRP1, ROP26, MIC8, and CK2. Results are expressed in ELISA INDEX and red line represents cut off value of 1.2. Statistical analyses were performed using a One-Way ANOVA, where values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo selecionou e sintetizou 18 peptídeos derivados de proteínas imunodominantes de *Toxoplasma gondii* para o desenvolvimento de um ELISA Indireto e Dot Blot. Os peptídeos foram capazes de detectar amostras de soro suíno infectadas, oferecendo uma diferenciação eficaz entre negativos e positivos, mas não entre as formas taquizoítas e oocystos. Dentre os alvos analisados, (SRS29B)<sup>201-219</sup>, MAG1<sup>107-123</sup>, SRS59B<sup>534-548</sup>, GRA5<sup>60-72</sup>, GRA1<sup>23-37</sup>, e GRA7<sup>160-179</sup> possuíram a melhor performance, uma vez que, alcançaram as melhores EI. Assim, esse estudo oferece bons alvos com potencial diagnóstico para a aplicação em larga escala em suínos de produção.

O presente estudo contou com a coloração dos nossos parceiros Ricardo Toshio Fujiwara e João Luis Garcia. Ainda, com o apoio da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).