

TOXOPLASMOSE

RÉSUMÉ

Définition et description de la maladie : la toxoplasmose est une infection zoonotique des animaux causée par un protozoaire parasite : Toxoplasma gondii. Ce parasite est capable d'infecter tous les animaux à sang chaud ; bien que l'infection n'entraîne pas une maladie clinique dans la plupart des espèces, chez certaines elle se traduit par une maladie aiguë qui peut mettre en danger la vie de l'animal et, chez d'autres espèces, notamment les moutons et les chèvres, elle entraîne une maladie de la gestation, le parasite se multipliant dans le placenta et dans le fœtus. Chez ces animaux, la toxoplasmose cause des avortements ou la naissance d'agneaux/chevreaux faibles, qui peut s'accompagner de fœtus momifiés. Typiquement, les membranes intercotylédonaires sont normales mais de petits foyers de nécrose, d'environ 2 à 3 mm de diamètre, peuvent être visibles dans les cotylédons. Microscopiquement, ces foyers apparaissent comme des zones de nécrose libre de toute inflammation. L'inflammation, quand elle est présente, n'est pas suppurée. Les tachyzoïtes de Toxoplasma ne sont vus que rarement en association avec des foyers, habituellement en périphérie des lésions. L'examen de l'encéphale peut révéler une microgliose focale. Ces lésions ont souvent un petit foyer central de nécrose qui peut être calcifié. Une leucomalacie focale dans la substance grise cérébrale, due à l'anoxie provenant de l'atteinte placentaire est souvent présente. La microgliose focale est plus spécifique que la leucomalacie, laquelle reflète des dommages placentaires, mais peut aussi se produire dans d'autres états pathologiques dans lesquels le placenta est impliqué, y compris, bien que rarement, lors d'une chlamydiose ovine. L'infection chez le porc peut provoquer des pertes sévères chez la truie gestante mais est habituellement modérée et pas remarquée. Des infections aiguës souvent mortelles affectent les singes du Nouveau Monde, les marsupiaux et certains autres animaux.

Identification de l'agent pathogène : le toxoplasme est un parasite intra-cellulaire obligatoire qui présente un cycle sexué chez les félinés et un cycle asexué à deux temps chez tous les animaux à sang chaud. Il comprend, en général, 3 lignées (I, II et III). Dans la phase aiguë d'infection, les tachyzoïtes se multiplient dans les cellules entraînant une destruction tissulaire plus ou moins importante, et dans les cas mortels, les tachyzoïtes peuvent être mis en évidence dans le liquide d'ascite ou dans des empreintes de tissu pulmonaire. Quand la réponse immunitaire débute, les tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes qui se multiplient lentement dans les cellules pour donner naissance à des kystes. Chez les brebis, les chèvres et les truies qui ont avorté, T. gondii est souvent difficile à trouver dans les coupes tissulaires, mais il est plus souvent visible dans les coupes d'encéphale et de placenta. Son identité peut être confirmée par immunohistochimie, alors que l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) peut être utilisée pour identifier l'ADN du parasite dans les tissus. L'isolement du toxoplasme à partir de prélèvements est coûteux et lent, mais, si nécessaire, le mieux est l'inoculation à la souris de broyat de tissu provenant de l'encéphale fœtal ou du placenta. Le cycle sexué du parasite se déroule exclusivement dans les cellules épithéliales de l'intestin des félins et peut entraîner l'excrétion d'un très grand nombre d'oocystes dans les fèces. Les oocystes peuvent survivre pendant des mois dans le milieu extérieur.

Épreuves sérologiques : le dye test (DT) est la méthode sérologique la plus ancienne et de plusieurs façons, représente le « gold standard », au moins chez l'homme. Le DT utilise des tachyzoïtes de toxoplasme virulent, un facteur accessoire comparable au complément et le sérum à

tester. Quand des anticorps spécifiques agissent sur les tachyzoïtes, ces derniers ne se colorent pas uniformément avec le bleu de méthylène alcalin. Le test n'est pas fiable chez toutes les espèces. En outre, comme on utilise des toxoplasmes vivants, ce test présente un risque potentiel d'infection humaine et est cher à réaliser. L'immunofluorescence indirecte (IFI) donne des titres comparables au DT, mais il est plus sûr puisqu'il utilise des tachyzoïtes tués. L'épreuve d'IFI peut être utilisée pour différencier les IgG et les IgM. Le test d'agglutination directe et le test d'agglutination au latex sont tous les deux relativement rapides et ne nécessitent pas de matériels de laboratoire compliqués. La méthode immuno-enzymatique (ELISA) nécessite des équipements plus sophistiqués mais peut traiter de grandes quantités de sérums et n'est pas liée à une interprétation humaine pour la lecture du résultat.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : un vaccin composé de tachyzoïtes vivants est disponible commercialement pour utilisation chez le mouton dans certains pays européens et en Nouvelle-Zélande. Le vaccin est présenté comme une suspension concentrée de tachyzoïtes associé à un système de délivrance. Le vaccin doit être strictement maintenu et manipulé selon les recommandations du fabricant car il a une brève durée de vie.

A. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire qui a aussi un potentiel zoonotique. Il est capable d'infecter tous les animaux à sang chaud ; bien que l'infection n'entraîne pas de maladie clinique dans la plupart des espèces, chez certaines elle se traduit par une maladie aiguë qui peut mettre en danger la vie de l'animal et, chez d'autres espèces, notamment les moutons et les chèvres, elle entraîne une maladie de la gestation, le parasite se multipliant dans le placenta et dans le fœtus. Des cas aigus pouvant être fatals sont signalés sur des singes du Nouveau Monde (8), des marsupiaux (6), et sur certains autres animaux (voir ci-dessous). Dans ces cas, les symptômes peuvent comprendre une lymphadénopathie, une hépatomégalie, une pneumonie interstitielle et des signes nerveux. À l'autopsie, les nœuds lymphatiques, la rate et le foie peuvent apparaître hypertrophiés et le foie notamment peut présenter des foyers de décoloration. Chez les moutons, les chèvres et les porcs, une infection primaire contractée pendant la gestation peut résulter en une infertilité apparente, ou de la mortinatalité et des avortements, selon le stade de la gestation au cours duquel l'infection a commencé. Dans le cas typique d'un avortement, une brebis ou une chèvre infectée en milieu de gestation produira un agneau/cheveau mort-né quelques jours avant la fin prévue de la gestation. Le fœtus avorté est souvent accompagné soit d'un autre fœtus faible ou d'un fœtus momifié (5). La brebis/chèvre reste cliniquement normale. Dans de tels cas, les cotylédons placentaires sont typiquement tachetés par des foyers blanchâtres d'environ 2 à 3 mm de diamètre alors que les membranes intercotylédonaires apparaissent normales. L'infection en début de gestation, quand le fœtus n'a qu'un système immunitaire rudimentaire, aboutit à la mort fœtale et sa résorption. Dans ce cas, la mère apparaît comme stérile ce qui peut mimer un problème d'infertilité du troupeau. Les mères qui sont infectées en fin de gestation donnent a priori une descendance infectée mais normale cliniquement. À la suite d'une infection, soit durant soit en dehors d'une gestation, le parasite n'est pas incriminé dans les avortements des gestations suivantes. Bien que certaines recherches récentes remettent en question cette conclusion (13, 38), l'opinion générale actuellement est que la recrudescence d'une infection persistante pendant la gestation n'entraîne pas normalement des avortements à répétition (28). L'infection chez le porc peut provoquer des pertes sévères chez la truie gestante, mais dans les conditions d'élevage intensif avec une contamination minimale, voire nulle, des bâtiments et de la nourriture par les oocystes de *T. gondii*, on peut estimer que l'infection évolue avec une faible incidence et est plus souvent modérée ou pas remarquée (24). Cependant, quand les porcs sont élevés en plein air dans des systèmes extensifs, ils ont plus de risques d'entrer en contact avec des oocystes et l'infection est plus fréquente (21).

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui présente un cycle asexué à deux temps chez tous les animaux à sang chaud et un cycle sexué chez les félinés. Les souches de toxoplasme sont réparties en 3 lignées clonales (I, II et III), les lignées II et III étant associées à la maladie chez les animaux, alors que la lignée I prédomine lors de la maladie chez l'homme (17, 20). Dans la phase asexuée, deux stades de développement existent : le tachyzoïte à multiplication rapide et le bradyzoïte à multiplication lente. Au cours des infections aiguës, les tachyzoïtes pénètrent activement les cellules de l'hôte dans lesquelles ils se multiplient causant la rupture de la cellule, libérant les parasites localement et dans la circulation. Lorsque l'hôte développe une immunité, le parasite garde ses dimensions et sa forme mais se transforme en stade bradyzoïte, se multiplie plus lentement à l'intérieur de kyste tissulaire établissant une infection permanente. Ces kystes tissulaires microscopiques sont présents la plupart du temps dans l'encéphale et les muscles squelettiques et représentent le stade quiescent du parasite chez l'hôte. Les kystes tissulaires vivants au sein des muscles (viande) sont une source importante d'infection humaine. Chez les animaux qui succombent à une infection aiguë, les tachyzoïtes

peuvent être mis en évidence dans le liquide d'ascite ou sur des empreintes de poumons ainsi que sur des coupes de foie et d'autres organes affectés.

La phase sexuée se déroule dans les cellules épithéliales intestinales du chat hôte définitif et aboutit à la production d'oocystes de *Toxoplasma*. À la suite d'une infection primaire chez un chat, les oocystes peuvent être éliminés dans les fèces durant plusieurs jours. Les oocystes sporulent dans le milieu extérieur en 1 à 5 jours (selon l'oxygénation, l'humidité et la température) au terme desquels l'oocyste devient infectant. Ils sont très résistants et peuvent rester infectants dans le milieu une année ou plus. Les oocystes sporulés sont de $11 \times 13 \mu\text{m}$ de diamètre et chacun contient 4 sporozoïtes dans chacun des 2 sporocystes (11). Quand un animal sensible ingère des oocystes sporulés, les sporozoïtes pénètrent la paroi intestinale, se transforment en tachyzoïtes et établissent une infection.

Chez le mouton, la chèvre, le porc, le cheval et l'homme, les kystes tissulaires persistent pour le reste de la vie du sujet (11). Le toxoplasme ne provoque pas habituellement de maladie clinique chez les bovins, les camélidés et les cervidés, mais peut provoquer une maladie fatale chez les singes du Nouveau Monde, les marsupiaux, et certains autres animaux tels que les lièvres (*Lepus europaeus*, *L. timidus*) (16), le chat de Pallas (2), le renard de l'Arctique (32), certains oiseaux (12) et certains mammifères marins (15). On peut penser que ces animaux, ainsi que d'autres infectés de façon semblable, ont été en contact au cours des temps avec *T. gondii* dans leur environnement naturel, ce qui les auraient rendus plus vulnérables au parasite.

L'avortement dû à *T. gondii* chez le mouton et la chèvre peut être distingué de celui causé par d'autres agents infectieux, y compris les infections à *Chlamydophila abortus* (cf. Chapitre 2.7.7., « Avortement enzootique des brebis [chlamydiose ovine] »), *Coxiella burnetii* (cf. Chapitre 2.1.12., « Fièvre Q »), *Brucella melitensis* (cf. Chapitre 2.7.2., « Brucellose ovine et caprine [Infection à *Brucella ovis* exclue] »), *Campylobacter fetus fetus* (cf. Chapitre 2.7.1., « Maladie de la frontière ["Border Disease"] ») et les virus qui causent la bluetongue, la maladie de Wesselsbron et la maladie d'Akabane. Chez le porc, *Brucella suis* (cf. Chapitre 2.8.5.) peut aussi causer une mort fœtale, une momification et des avortements.

• Risques pour la santé humaine

Toxoplasma gondii infecte l'homme et alors que l'infection est assez commune (approximativement 30 % de la population selon l'âge et l'environnement), la maladie clinique est assez rare. Les individus présentant un risque important de développer une maladie clinique regroupent la femme enceinte, parce que le parasite peut constituer, chez les mères infectées pour la première fois, une menace sérieuse pour l'enfant avant la naissance, et les individus qui sont immunodéprimés tels les transplantés, les patients du SIDA, ceux souffrant de certains cancers et ceux recevant certaine thérapeutique anticancéreuse. Ces patients risquent de développer une infection aiguë mortelle en l'absence de traitement. Les sujets très jeunes et âgés sont également très sensibles. Eventuellement les sujets sans immunodéficience apparente peuvent développer une maladie caractérisée par un affaiblissement général, de la fièvre et une lymphadénopathie. Les sources d'infection humaine sont l'ingestion de viande crue ou faiblement cuite contenant des kystes tissulaires de *T. gondii*, l'ingestion de légumes crus ou légèrement cuits contaminés par des oocystes ou l'exposition à des oocystes provenant de fèces de chat, comme cela se produit dans les jardins et les bacs à sable. La toxoplasmose est maintenant considérée comme une zoonose d'origine hydrique (10). Ce mode de transmission est possible quand le traitement de l'eau est inefficace ou absent, et qu'il existe localement une population de chats de taille suffisante pour contaminer l'eau avec des oocystes (1, 10). Associé à ce mode de transmission, est l'opinion que les mammifères marins peuvent s'infecter dans des eaux souillées par de la terre contaminée ou les effluents d'égouts de ville non traités (15).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

a) Isolement

Le mieux pour l'isolement du toxoplasme *T. gondii* à partir de fœtus issus d'avortements ovins et caprins et de membranes fœtales est l'inoculation à la souris de laboratoire. Les meilleurs tissus pour l'inoculation sont l'encéphale fœtal et les cotylédons placentaires, et les résultats optimaux sont obtenus avec des échantillons frais et exempts de toute contamination. À aucun moment, les échantillons ne doivent être refroidis car cela tue le parasite.

- i) Récolter aseptiquement 2 à 5 g de cotylédons placentaires ou de tissu cérébral provenant du fœtus avorté ;

- ii) Homogénéiser le tissu en volumes égaux de 0,3 M de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS), pH 7,4, additionné d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 745 UI/ml de streptomycine) dans un « stomacher » (Seward Laboratory, Londres) ou tout équipement fiable d'homogénéisation. Le tissu cérébral peut être effectivement homogénéisé en le passant à l'aide d'une seringue 10 fois dans une aiguille de calibre 16 G ;
- iii) Inoculer 0,5 ml du mélange homogène par voie intrapéritonéale à 3 souris indemnes de toxoplasmose ;
- iv) Tuer les souris 6 à 8 semaines après l'inoculation et recueillir les encéphales. Le sang doit également être recueilli à ce stade et le sérum préparé et conservé à -20 °C. Les encéphales des souris qui meurent avant les 6 à 8 semaines doivent aussi être prélevés ;
- v) Homogénéiser chaque encéphale de souris dans un volume équivalent de PBS stérile en le passant 10 fois dans une aiguille de 16 G à l'aide d'une seringue ;
- vi) Déposer une goutte (5 µl) de la suspension donnée sur 5 lames ;
- vii) Sécher et colorer avec le Giemsa, sécher et mettre une lamelle ;
- viii) Examiner les lames au microscope. Les kystes tissulaires apparaissent comme des structures circulaires mesurant 5 à 50 µm colorés en bleu, avec des bradyzoïtes en croissant.

Une autre méthode pour l'examen de l'encéphale de souris est de prendre une petite portion du prosencéphale (approximativement de la dimension d'une tête d'allumette) écrasée avec la lamelle. Les kystes tissulaires peuvent aisément être observés au microscope.

Si les tissus inoculés sont fortement infectés par *T. gondii*, les souris meurent en 1 à 2 semaines.

Un échec lors d'une tentative pour mettre en évidence des kystes tissulaires ne doit pas faire exclure un diagnostic positif. Le sérum des souris doit être analysé pour la recherche d'anticorps à *T. gondii* (par exemple par l'IFI) et si l'analyse est également négative, l'infection toxoplasmique est peu vraisemblable.

b) Coupes histologiques

Chez les animaux qui succombent à une toxoplasmose aiguë, des foyers d'inflammation mononucléaire associés ou non à des foyers de nécrose peuvent être observés dans un grand nombre de tissus, notamment le foie, le cœur et les poumons. Ceux-ci peuvent être oedémateux. Les nœuds lymphatiques sont hypertrophiés avec ou non des foyers de nécrose et des hémorragies. Classiquement, les tachyzoïtes de *Toxoplasma* sont mis en évidence associés à la nécrose et à l'inflammation.

Lors d'avortements ou de mortinatalité chez les brebis et les chèvres, de grands foyers typiques de nécrose qui peuvent se calcifier au cours du temps sont visibles dans les cotylédons placentaires affectés. Toute l'inflammation associée est classiquement modérée et non suppurée. Les échantillons bien conservés de cotylédons du placenta peuvent montrer un oedème modéré du mésenchyme des villosités fœtales, avec une hypercellularité diffuse due à la présence de cellules mononucléées. Parfois, de petites quantités de toxoplasmes intra- et extracellulaires sont visibles, habituellement en périphérie de zones nécrosées ou dans une villosité ce qui constitue les stades précoces de l'infection. Les tachyzoïtes de toxoplasmose apparaissent ovoïdes, de 2 à 6 µm de longueur, avec des noyaux modérément basophiles, centraux ou à proximité de l'extrémité postérieure.

Dans l'encéphale du fœtus, des lésions primaires et secondaires peuvent se développer. Des foyers de microglie, typiquement avec un centre nécrosé et parfois calcifié et souvent associé à une méningite lymphoïde modérée représente une réponse immunitaire fœtale postérieure aux lésions provoquées par la multiplication du parasite. Les kystes tissulaires de *Toxoplasma* ne sont que rarement observés, habituellement en périphérie des lésions. Une leucomalacie focale est aussi fréquente et est considérée comme la conséquence d'une anoxie fœtale causée par des lésions évoluées du placenta interdisant le transfert de l'oxygène de la mère au fœtus. Ces foyers sont observés le plus souvent dans les cornes de matière blanche cérébrale, mais quelquefois dans la substance grise cérébelleuse. Ces foyers de leucomalacie seuls suggèrent une atteinte placentaire ou une insuffisance aiguë, mais les deux modifications neuropathologiques, vues ensemble, sont caractéristiques de l'infection toxoplasmique. La confirmation de l'identité de structures ressemblant au toxoplasme dans des coupes histologiques, peut être réalisée par immunohistochimie qui marque le toxoplasme intact ou des traces antigéniques. La technique est à la fois commode et sensible ; elle est utilisée sur des tissus fixés (y compris des tissus anciens) qui peuvent présenter un haut degré de décomposition où l'isolement n'est ni approprié ni possible. La méthode d'immunoperoxydase indirecte à ABC et la technique peroxydase-antiperoxydase (PAP) (34) sont de qualité égale.

c) Méthodes de reconnaissance des acides nucléiques

Plusieurs essais basés sur la PCR ont été développés pour la détection de l'ADN de *T. gondii*. Les principales régions cibles sont la séquence répétée B1 (3), le gène P30 (SAG1) (31) et l'ARN ribosomal 18S (ARNr) (14). La sensibilité de la PCR dépend du nombre de copies de la séquence cible (P30 : 1 copie, B1 : 35 copies, ARNr : 110 unités répétées). Des oligonucléotides synthétiques d'ADN sont disponibles commercialement (ex. www.sigma-genosys.co.uk). Des oligonucléotides synthétiques d'ADN sont disponibles commercialement (ex. www.sigma-genosys.co.uk). La méthode d'amplification de la séquence répétitive B1 a été récemment utilisée pour analyser les produits d'aspiration chez des patients humains atteints de cataracte congénitalement infectés (25) et elle s'est révélée plus sensible que la méthode conventionnelle (épreuve immuno-enzymatique [ELISA]). Cependant, bien que la PCR soit très sensible, des précautions doivent être prises si c'est le seul test mis en œuvre ; dans de nombreux cas un diagnostic plus fiable sera obtenu si elle est associée à d'autres éléments diagnostiques.

Récemment, une PCR en temps réel a été mise au point afin de permettre en même temps l'amplification et la quantification de l'ADN. Elle est semblable aux méthodes de PCR existantes et peut être réalisée dans des plaques de microtitrage à 96 puits. Après chaque cycle d'amplification, des molécules de colorants fluorescents s'intercalent avec l'ADN double brin ce qui permet la quantification de l'ADN du parasite présent dans l'échantillon. La PCR en temps réel a été utilisée pour amplifier et quantifier le gène B1 de *T. gondii* (7, 23). Cette quantification de l'ADN permet de déterminer le nombre des parasites présents dans les tissus et les liquides tels que le liquide amniotique de patients soupçonnés d'être congénitalement infectés par *T. gondii* (27). La PCR en temps réel est hautement spécifique et sensible, mais elle est coûteuse et nécessite des systèmes de détection spécialisés ; de ce fait, elle n'est rentable que dans les laboratoires qui analysent un grand nombre d'échantillons.

La méthode qui est décrite ci-dessous, est une PCR nichée, amplifiant la séquence répétée B1 d'ADN (36). L'ADN parasite peut être extrait et purifié à partir de plusieurs tissus, y compris le placenta, le système nerveux central, le cœur et le muscle strié.

Les globules rouges contaminant les tissus peuvent être éliminés en lavant ceux-ci dans du tampon 10 mM Tris/NH₄Cl pH 7,6, avant une centrifugation à 2 000 *g* pendant 15 min. L'ADN est extrait du culot et remis en suspension dans du tampon 10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ contenant la protéinase K 100 µg/ml et 0,5 % de Tween 20.

Les échantillons sont incubés à 55 °C pendant au moins 1 h, puis la protéinase K est inactivée par ébullition. La PCR est réalisée dans des volumes de 50 µl. L'amplification des gènes B1 est réalisée en modifiant la procédure décrite en réf. 1. Le mélange réactif renferme 10 mM Tris, pH 8,3, 2,5 mM de MgCl₂, 40 mM de KCl, 0,01 % de gélatine, 0,1 mM de dNTPs, 0,2 µM de chaque amorce (les amorces oligonucléotidiques sont celles qui sont décrites en réf. 1), 2 amorces P1 et P2 et 2 amorces anti-sens P3 et P4 et 2,5 unités de Taq polymérase.

L'amplification première est réalisée avec des amorces 1 et 4 et donne un produit de 193 pb sur 25 cycles à 93 °C pendant 1 min, 50 °C pendant 1,5 min et 72 °C pendant 3 min. Le produit amplifié est dilué au 1/20 dans l'eau distillée pour réduire l'amplification de produits non spécifiques.

L'amplification seconde utilisant les amorces cachées 2 et 3 et les mêmes conditions de réaction, est fondée sur 15 cycles et donne un produit de 94 pb. Le produit final est visualisé sur gel d'agarose à 1 %. La technique de « southern blotting » en utilisant une sonde marquée peut être utilisée pour confirmer l'identité des produits de la PCR B1 et les distinguer des produits non spécifiques.

d) Détection des oocystes dans l'eau de boisson

Des oocystes de *Toxoplasma gondii* ont été détectés dans de l'eau de boisson par la méthode de détection des oocystes de *Cryptosporidium* (18). La méthode repose sur la collecte d'un grand volume d'eau et de son passage sur un filtre. L'identification des oocystes de *Toxoplasma* a été réalisée par inoculation à des rongeurs.

2. Épreuves sérologiques

Il existe plusieurs épreuves sérologiques pour la détection des anticorps contre *T. gondii*. Lors d'une épreuve, l'examineur observe la couleur des tachyzoïtes au microscope, comme dans le dye test (DT) ou l'IFI. D'autres dépendent du principe de l'agglutination des tachyzoïtes de *Toxoplasma*, de globules rouges ou de particules de latex comme dans les cas respectifs de l'agglutination directe (DAT), de l'hémagglutination indirecte (HAI) et de l'agglutination au latex (LA). Avec la méthode immuno-enzymatique (ELISA), l'intensité de la couleur définit la quantité d'anticorps présents dans une solution donnée. Le DT, IFI, DAT et ELISA sont exposés ci-dessous, avec plus de détails en ce qui concerne l'IFI.

Le DT (29) est également appelé l'épreuve sérologique « gold standard » (de référence) pour la détection des anticorps *T. gondii* chez l'homme. Des tachyzoïtes vivants de toxoplasme sont incubés avec un facteur accessoire type complément et le sérum à tester à 37 °C pendant 1 h avant d'ajouter le bleu de méthylène. Les anticorps spécifiques entraînent la perméabilité membranaire du parasite telle que le cytoplasme peut s'échapper ; le tachyzoïte ne peut incorporer le colorant et il apparaît ainsi incolore. Les tachyzoïtes non exposés à l'action des anticorps spécifiques (c'est-à-dire d'un sérum négatif) prennent le colorant et deviennent bleus. Le DT est à la fois sensible et spécifique chez l'homme, mais peut être non fiable chez d'autres espèces. En outre, il est potentiellement risqué puisque l'on utilise des parasites vivants. Il est coûteux et requiert un haut niveau d'expertise technique. Du fait des considérations liées au bien être animal, il est recommandé, quand c'est possible, de multiplier les tachyzoïtes sur cultures cellulaires plutôt que sur péritoine de souris.

L'IFI (26) est une méthode simple et largement utilisée. Des tachyzoïtes entiers et tués de toxoplasme sont incubés avec le sérum dilué à tester, le sérum fluorescent spécifique de l'espèce ajouté et le résultat est observé au microscope à fluorescence. Les anticorps marqués à la fluorescéine sont disponibles commercialement pour une variété d'espèces animales ; la méthode est relativement peu coûteuse et des kits de diagnostic sont disponibles dans le commerce. Néanmoins la méthode nécessite un microscope à fluorescence et les résultats sont lus à l'œil, aussi peut-il exister une variation individuelle. Il peut être difficile de trouver les conjugués spécifiques et il existe un risque de réactivité croisée avec le facteur rhumatoïde et les anticorps antinucléaires.

La DAT (9) est sensible et spécifique. Des tachyzoïtes formolés de toxoplasme sont versés dans des puits en forme de U sur des plaques et les dilutions du sérum à tester préparées. Les échantillons positifs produiront une agglutination qui peut être mesurée, alors que les échantillons négatifs produiront un « culot » de tachyzoïtes précipités dans le fond du puits. Le test est simple et facile à réaliser bien que de grandes quantités d'antigène soient nécessaires. Des kits de diagnostic sont disponibles dans le commerce. La méthode d'obtention des parasites est donnée ci-dessous. Un test d'agglutination au latex (LAT) est disponible dans le commerce. Le DAT et le LAT ne sont pas spécifiques d'espèce et peuvent être utilisés pour toutes les espèces.

L'ELISA (35) utilise une préparation soluble d'antigènes provenant de tachyzoïtes de la souche RH (décrite ci-dessous) et déposés dans les puits d'une microplaque. Le sérum à tester (ex. d'origine ovine) est ajouté, suivi par le conjugué spécifique couplé à une enzyme comme l'IgG anti-mouton couplé à la peroxydase de raifort. Tout conjugué fixé provoque un changement de couleur du substrat qui est directement en relation avec la quantité d'anticorps fixés, et qui peut être lue avec un spectrophotomètre pour l'absorption spécifique du substrat utilisé. Le test est simple, permet de tester facilement un grand nombre d'échantillons et est aisé à réaliser avec le conjugué spécifique choisi. Des conjugués spécifiques, les substrats et des kits de diagnostic entiers sont commercialisés. Néanmoins, le test nécessite un spectrophotomètre. L'ELISA convient bien aux laboratoires choisis pour traiter de grands nombres d'échantillons.

Un test ELISA cinétique (KELA pour *kinetics ELISA*) a été mis au point récemment (37). Le système KELA permet de mesurer le taux de réaction entre l'enzyme liée et la solution substrat qui mène à la coloration. Trois densités optiques (DO) sont lues à 45 s d'intervalle (en utilisant le programme de gestion des données du KELA) et les résultats sont donnés sous forme de pentes. La corrélation entre le KELA et l'ELISA est très bonne et les deux tests sont donc de très bons outils pour le diagnostic, la seule différence étant l'aspect pratique de leur réalisation.

Pour améliorer la spécificité de l'ELISA conventionnel, des tests utilisant des antigènes recombinants (19) ou des antigènes spécifiques de *Toxoplasma* purifiés pour une haute affinité (22) ont été développés pour être employés chez les moutons (30, 33) mais ces tests ne sont pas encore utilisés en routine.

Avec l'ELISA conventionnel, la détection des IgG et IgM spécifiques de *Toxoplasma* permet de distinguer entre une toxoplasmose aiguë et une toxoplasmose chronique. Récemment, des tests basés sur l'avidité ont été mis au point. Comme la réponse immunitaire se modifie une fois l'infection établie, les anticorps présentent une avidité croissante (affinité fonctionnelle) pour l'antigène. Cette avidité peut être mesurée et permet d'indiquer s'il s'agit d'une infection active ou récente par *T. gondii*. Un test pour la détection chez les moutons de l'avidité des IgG pour l'antigène P30 de *T. gondii* a été mis au point (30). Ce test est un bon outil diagnostique pour distinguer des infections relativement récentes de celles plus anciennes.

- **Préparation de l'antisérum et des antigènes**

L'antisérum de *T. gondii* et l'antisérum conjugué utilisés pour l'IFI et l'ELISA, permettant d'analyser plusieurs espèces animales, peuvent être obtenus commercialement. Des réactifs de référence internationaux pour les sérums animaux ne sont pas disponibles.

Ci-dessous sont présentés les protocoles pour la préparation des antigènes de tachyzoïte pour les tests IFI et l'ELISA. Les tachyzoïtes peuvent se multiplier chez la souris ou en culture cellulaire ; ils restent en tant que parasites entiers dans l'IFI, ou sont préparés sous forme d'antigène soluble dans l'ELISA.

- **Production de tachyzoïtes de *Toxoplasma* chez la souris**

- Injecter à 6 souris indemnes de toxoplasmes, chacune recevant 0,2 ml de 1×10^7 /ml de tachyzoïtes de *T. gondii* de la souche RH par la voie intrapéritonéale en utilisant une seringue de 1 ml et une aiguille 23 G ; les tachyzoïtes sont préparés à partir d'une souris infectée par une culture tissulaire (pour observer un optimum de tachyzoïtes dans les cellules mononuclées de l'hôte, les souris doivent être âgées de 6 à 8 semaines et peser approximativement 22 à 25 g) ;
- Tuer les souris 3 jours plus tard par inhalation de CO₂ (éviter l'élongation cervicale qui peut causer une contamination du liquide péritonéal par des globules rouges) ;
- Poser les souris sur le dos sur un morceau de liège. Nettoyer la paroi abdominale avec une solution aseptique, recueillir le liquide péritonéal par une aiguille 21 G sertie à une seringue de 1 ml et transférer l'exsudat obtenu dans un volume équivalent de PBS ;

Le délai optimal pour recueillir les tachyzoïtes est de 72 h après l'inoculation, délai suffisant pour la multiplication des parasites mais avant que la contamination par les cellules de l'hôte n'intervienne. Il est également important de ne pas dépasser 3 jours pour recueillir le liquide car au-delà la souris pourrait mourir (si les tachyzoïtes utilisés pour l'inoculation des souris proviennent d'un stabilat refroidi, il peut être nécessaire d'attendre 4 à 5 jours après l'inoculation et de passer une fois de plus le parasite sur souris avant de l'utiliser comme antigène dans les tests ci-dessous) ;

- Centrifuger le liquide à 500 **g** pendant 5 min, recueillir le surnageant et remettre en suspension dans une solution équilibrée de Hank (HBSS). Rincer par centrifugation alternativement par PBS et HBSS ;
- Calculer la concentration en tachyzoïtes et en cellules de l'hôte avec une cellule de comptage Neubauer (nombre de tachyzoïtes à la concentration de 1/1 000 et la contamination cellulaire à 1/10) ;
- Procéder à des rinçages supplémentaires (étape iv au-dessus) pour réduire la contamination cellulaire à moins de 0,5 % de cellules mononuclées et moins de 0,25 % de globules rouges ;
- Remettre en suspension les tachyzoïtes dans du PBS pour obtenir une concentration finale de 1×10^7 /ml ;
- Les tachyzoïtes peuvent être maintenus de cette façon par repiquage continu sans addition de pénicilline/streptomycine et en observant des procédures aseptiques strictes.

- **Préparation d'aliqots d'un stabilat refroidi de tachyzoïtes de *T. gondii***

- Produire les tachyzoïtes chez la souris ou en culture cellulaire comme décrit ;
- Centrifuger à 500 **g** pendant 5 min et remettre en suspension dans le milieu de Dulbecco modifié Iscove (IMDM) à peu près 3 fois (Gibco BRL, Paisley, Royaume-Uni) ;
- Ajouter les solutions suivantes pour obtenir ces concentrations : dimethyl sulphoxyde à 10 % ; sérum de cheval sain à 20 % (indemne de toxoplasme) ; tachyzoïtes remis en suspension à 70 % pour obtenir une concentration finale de 1×10^8 tachyzoïtes/ml ;
- Laisser reposer la préparation sur la paillasse pendant 1 h ;
- Distribuer dans des tubes de 1 ml fermés par un bouchon et appropriés à un stockage dans l'azote liquide ;
- Disposer les tubes dans un petit récipient, puis emballer celui-ci dans un épais matériel isolant et le placer au congélateur à -70 °C afin de permettre aux tachyzoïtes d'être refroidis de manière graduelle ;
- Le jour suivant transférer dans l'azote liquide, en conservant l'isolation du matériel transféré ;
- Ce stabilat peut être utilisé pour être inoculé à des souris ou des cultures cellulaires du parasite. Pour récupérer le matériel de l'azote liquide, le passer brutalement sous eau chaude.

- **Production de tachyzoïtes de *Toxoplasma* en culture tissulaire**

- Toxoplasma gondii* peut se multiplier et se maintenir en culture par passage 2 fois par semaine sur cellules de rein de singes verts africains (Vero) ;
- Les cellules et le parasite se développent sur milieu IMDM supplémenté avec 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine et du sérum de veau fœtal à 2 % ;
- Les tachyzoïtes sont prélevés des flacons de culture cellulaire en raclant la couche monocellulaire à l'aide d'un racloir à cellule stérile ;

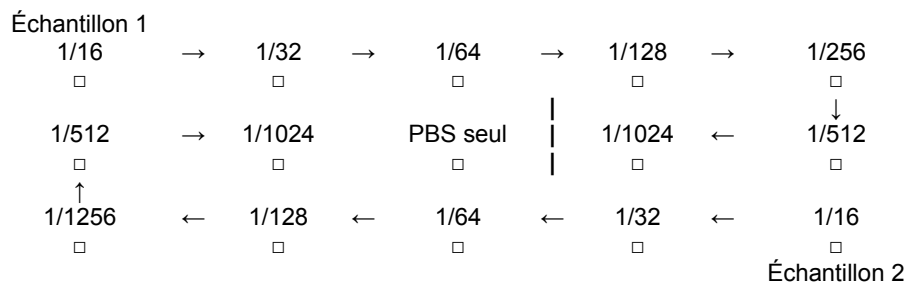
- iv) En utilisant 25 cm² de culture tissulaire dans des flacons ensemencés avec 1×10^5 cellules Vero, ajouter les tachyzoïtes à raison de 2 tachyzoïtes par cellule mononuclée et incuber à 37 °C dans une chambre humide à 5 % de CO₂. Recueillir après 3 à 4 jours.
- **Préparation de tachyzoïtes entiers pour l'utilisation en IFI**
 - i) Produire 4×10^7 /ml en suspension de tachyzoïtes de *T. gondii* de la souche RH en PBS ;
 - ii) Ajouter du formol (40 %) de manière à obtenir une concentration finale de 0,2 % (v/v) ;
 - iii) Incuber à 4 °C toute la nuit, puis diviser la suspension en autant de tubes fermés que nécessaire et les conserver congelés jusqu'à utilisation.
- **Production d'antigène soluble pour le test ELISA**
 - i) Produire une suspension de tachyzoïtes de *T. gondii* de la souche RH en PBS ;
 - ii) Centrifuger à 2 000 *g* pendant 15 min, recueillir le culot et remettre en suspension dans 9 fois son volume d'eau ;
 - iii) Casser les tachyzoïtes par congélation–décongélation 3 fois de suite ;
 - iv) La préparation antigénique est soumise à ultrasons pendant 20 s à 4 °C à une amplitude de 20 microns ;
 - v) Eliminer tout débris cellulaire par centrifugation à 10 000 *g* pendant 30 min à 4 °C ;
 - vi) Recueillir le surnageant et conserver à –20 °C jusqu'à utilisation (l'estimation en protéines doit être comprise dans une fourchette de 2 à 4 µg/ml).
- **Protocole pour l'épreuve d'IFI**

Ce qui suit est un protocole pour la détection des anticorps IgG anti-toxoplasme dans du sérum de mouton par une épreuve d'IFI. Il nécessite des modifications mineures pour tester d'autres espèces ou détecter des IgM.

- i) Nettoyer le nombre nécessaire de lames à 15 puits de culture cellulaire (Flow laboratories) et laisser sécher ;
- ii) Déposer 5 µl de préparation de tachyzoïtes entiers dans chaque puits et laisser sécher ;
- iii) Fixer au méthanol pendant 10 min ;
- iv) Laver 2 fois 10 min dans 0,3 M PBS pH 7,4 ;
- v) Ajouter 5 µl de sérum de mouton à tester (dilué en PBS) dans chaque puits (préparer les dilutions des sérums, c'est-à-dire 1/16, 1/32, etc jusqu'à 1/1024). S'assurer que les témoins positif et négatif sont inclus dans chaque essai ainsi qu'un échantillon PBS uniquement. Incuber pendant 30 min à la température de la pièce ;
- vi) Laver 2 fois 10 min en PBS ;
- vii) Ajouter 5 µl d'IgG de lapin anti-mouton à la dilution appropriée conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine, diluée dans du bleu d'Evans à 0,2 % dans du PBS, dans chaque puits et incuber 30 min à la température de la pièce ;
- viii) Laver 3 fois 10 min dans du PBS ;
- ix) Monter les lames et lamelles avec du glycérol tamponné (9 parts de glycérol pour une part de PBS) ou Citifluor (Citifluor Ltd, London) ;
- x) Examiner au microscope à fluorescence aux objectifs de $\times 20$ et $\times 40$.

Avec un sérum négatif, les parasites entiers apparaissent rouges en raison de l'autofluorescence du bleu d'Evans. Ils peuvent aussi être vus avec une fluorescence verte à un pôle du parasite (fluorescence polaire non spécifique). Avec un sérum positif, les parasites sont rouges fluorescents et au moins 80 % d'entre eux dans un puits donné sont entourés d'une bande continue de fluorescence verte. Pour un mouton ou une chèvre adulte, un sérum est considéré positif si la dilution de 1/64 au minimum est positive, et un sérum est négatif si la dilution de 1/32 au plus est positive. Pour l'agneau et chevreau et le sérum fœtal, les titres respectifs sont de 1/32 au plus et 1/16 au moins.

Un exemple est donné ci-dessous :



C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Le seul vaccin disponible est un produit vivant commercialisé pour le mouton (Toxovax, Intervet BV, Pays-Bas ; Toxovax, AgVax, Ag Research, Nouvelle-Zélande), autorisé au Royaume-Uni, en Irlande, en France, au Portugal, en Espagne et en Nouvelle-Zélande. Il consiste en une culture cellulaire de tachyzoïtes de toxoplasme S48 atténués par 3 000 passages sur souris. Le vaccin stimule une immunité efficace pour au moins 18 mois après une simple injection sous-cutanée, mais le mouton ne garde pas une infection persistante car le vaccin est incapable de produire des kystes tissulaires. Le vaccin a une durée de vie courte et présente un danger potentiel pour les sujets immunodéprimés et les manipulatrices enceintes (4). Le vaccin doit être conservé et utilisé strictement selon les recommandations du fabricant ; ainsi ne doit-il jamais être congelé, mais maintenu au frais (à 4 °C environ) et à l'abri de la lumière. Le diluant fourni avec le vaccin ne doit être ajouté à la suspension concentrée de tachyzoïtes que juste avant l'utilisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOWIE W.R., KING A.S. WERKER D.H., ISAAC-RENTON J.L., BELL A., ENG S.B.V& MARION S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, **350**, 173–177.
2. BROWN M., LAPPIN M.R., BROWN J.L., MUNKHTSOG B. & SWANSON W.F. (2005). Exploring the ecological basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J. Wildlife Dis.*, **41**, 691–700
3. BURG J.L., GROVER C.M., POULETTY P. & BOOTHROYD J.C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1787–1792.
4. BUXTON D. (1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, **9**, 335–337.
5. BUXTON D. (2000). Toxoplasmosis and neosporosis. *In: Diseases of Sheep*, Martin W.B. & Aitken I.D., eds. Blackwell Science, Oxford, UK, 86–94.
6. CANFIELD P.J., HARTLEY W.J. & DUBEY J.P. (1990). Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *J. Comp. Pathol.*, **103**, 159–167.
7. COSTA J.M., PAUTAS C., ERNAULT P., FOULET F., CORDONNIER C. & BRETAGNE S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2929–2932.
8. CUNNINGHAM A.A., BUXTON D. & THOMSON K.M. (1992). An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Pathol.*, **107**, 207–219.
9. DESMONTS G. & REMINGTON J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 562–568.
10. DUBEY J.P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, **126**, 57–72.

11. DUBEY J.P. & BEATTIE C.P. (1988). Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
12. DUBEY J.P., GARNER M.W., WILLETTE M.M., BATEY K.L. & GARDINER C.H. (2001). Disseminated toxoplasmosis in magpie geese (*Anseranas semipalmata*) with large numbers of tissue cysts in livers. *J. Parasitol.*, **87**, 219–223.
13. DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2001). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 1699–1703.
14. ELLIS J.T. (1998). Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1053–1060.
15. FAYER R., DUBEY J.P. & LINDSAY D.S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitol.*, **20**, 531–536.
16. GUSTAFSSON K. & UGGLA A. (1994). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus*) in Sweden. *J. Wildlife Dis.*, **30**, 402–407.
17. HOWE D.K. & SIBLEY D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Inf. Dist.*, **172**, 1561–1566.
18. ISAAC-RENTON J., BOWIE W.R., KING A., IRWIN G.S., ONG C.S., FUNG C.P., SHOKEIR M.O. & DUBEY J.P. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied Environ. Microbiol.*, **64**, 2278–2280.
19. JOHNSON A.M. & ILLANA S. (1991). Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene*, **99**, 127–132.
20. KHAN A., BÖHME U., KELLY K.A., ADLEM E., BROOKS K., SIMMONDS M., MUNGALL K., QUAIL M.A., ARROWSMITH C., CHILLINGWORTH T., CHURCHER C., HARRIS D., COLLINS M., FOSKER N., FRASER A., HANCE Z., JAGELS K., MOULE S., MURPHY L., O'NEIL S., RAJANDREAM M.A., SAUNDERS D., SEEGER K., WHITEHEAD S., MAYR T., XUAN X., WATANABE J., SUZUKI Y., WAKAGURI H., SUGANO S., SUGIMOTO C., PAULSEN I., MACKAY A.J., ROOS D.S., HALL N., BERRIMAN M., BARRELL B., SIBLEY L.D. & AJIOKA J.W. (2006). Common inheritance of chromosome 1a associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res.*, **16**, 1119–1125.
21. KIJLSTRA A., EISSEN O.A., CORNELISSEN J., MUNNIKSMA K., EIJCK I. & KORTBEEK T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.*, **45**, 3165–3169.
22. LEKUTIS C., FERGUSON D.J., GRIGG M.E., CAMPS M. & BOOTHROYD J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.*, **112**, 1–10.
23. LIN M.H., CHEN T.C., KUO T., TSENG C.C. & TSENG C.P. (2000). Real-Time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4121–4125.
24. LIND P. & BUXTON D. (2000). Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In: Congenital Toxoplasmosis; Scientific Background, Clinical Management and Control, Ambroise-Thomas P. & Petersen E., eds. Springer, Paris, France, 261–269.
25. MAHALAKSHIMA B., THERESE K.L., SHYAMALA G., DEVIPRIYA U & MADHAVAN H.N. (2007). *Toxoplasma gondii* detection by nested polymerase chain reaction in lens aspirate and peripheral blood leukocyte in congenital cataract patients: The first report from a tertiary eye hospital in India. *Curr. Eye Res.*, **32**, 653–657.
26. MUNDAY B.L. & CORBOULD A. (1971). The application of the *Toxoplasma* indirect fluorescent-antibody test to sheep sera. *Aust. J. Med. Technol.*, **2**, 3–6.
27. NAGY B., LÁZÁR L., NAGY G., BÁN Z. & PAPP Z. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using quantitative real-time PCR method. *Orv. Hetil.*, **148**, 935–938.
28. RODGER S.M., MALEY S.W., WRIGHT S.E., MACKELLAR A., WESLEY F., SALES J. & BUXTON D. (2006). Ovine toxoplasmosis; the role of endogenous transmission. *Vet. Rec.*, **159**, 768–772.
29. SABIN A.B. & FELDMAN H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**, 660–663.

30. SAGER H., GLOOR M., TENTER A., MALEY S., HÄSSIG M. & GOTTSTEIN B. (2003). Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol. Res.*, **91**, 171–174.
31. SAVVA D., MORRIS J.C., JOHNSON J.D. & HOLLIMAN R.E. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.*, **32**, 25–31.
32. SØRENSEN K.K., MØRK T., SIGURDSDÓTTIR Ó.G., ÅSBAKK K., ÅKERSTEDT J., BERGSJØ B. & FUGLEI E. (2005). Acute toxoplasmosis in three wild arctic foxes (*Alopex alopex*) from Svalbard; one with co-infections of *Salmonella enteritidis* PT1 and *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 2b. *Res. Vet. Sci.*, **78**, 161–167.
33. TENTER A.M., VIETMEYER C. & JOHNSON A.M. (1992). Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. *Vet. Parasitol.*, **43**, 189–201.
34. UGGLA A., SJOLAND L. & DUBEY J.P. (1987). Immunohistochemical demonstration of toxoplasmosis in fetuses and fetal membranes of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 348–351.
35. VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A., FLECK D.G., PERKINS M. & OLADEHIN B. (1976). A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 150–153.
36. WASTLING J.M., NICOLL S. & BUXTON D. (1993). Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J. Med. Microbiol.*, **38**, 360–365.
37. WERRE S.R., JACOBSON R.H., BOWMAN D.D., DUBEY J.P. & MOHAMMED H.O. (2002). Evaluation of kinetics and single-read enzyme-linked immunoassays for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **14**, 225–230.
38. WILLIAMS R.H., MORLEY E.K., HUGHES J.M., DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2005). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitol.*, **130**, 301–307.

*

* *