

130
2 ej



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores "CUAUTITLAN"

**"TOXOPLASMA gondii EN SEMEN DE CARNEROS Y SU
RESISTENCIA AL CONGELAR EL MISMO CON FINES
DE INSEMINACION ARTIFICIAL"**

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a

PEDRO ANTONIO PONCE RAMIREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

		Página
Cap. I	INTRODUCCION	1
Cap. II	OBJETIVOS	15
Cap. III	MATERIAL Y METODOS	16
Cap. IV	RESULTADOS	20
Cap. V	DISCUSION	24
Cap. VI	CONCLUSIONES	26
Cap. VII	BIBLIOGRAFIA	27

INTRODUCCION.

Historia:

Nicolle y Manceux en 1908, en el Instituto Paster de Túnez, hallaron un nuevo parásito mientras observaban frotis de sangre, bazo e hígado tomados a partir de un roedor llamado "gondi" - -- (Ctenodactylus gondi). El parásito fue considerado como protozoario y, por su semejanza con las leishmanias, lo denominaron - -- Leishmania gondii.

En el mismo año Splendore, en Brasil, observando vísceras - de un conejo, descubrió el mismo parásito al cual llamó Toxoplasma cuniculi. A partir de esa fecha se reportaron muchos hallazgos de este género en diversos animales, incluso en el hombre, - creandose muchas especies de Toxoplasma y dando origen a una confusión taxonómica. Sin embargo en la actualidad se acepta en forma unánime que no hay más que una sola especie capaz de infectar al hombre y a los animales y que es la especie Toxoplasma gondii (2,4, 8, 17,18)

Clasificación del Toxoplasma gondii:

SUBREINO	:	Protozoa	
PHILLUM III	:	Apicomplexa	(Levine 1970)
CLASE I	:	Perkinsea	(Levine 1978)
SUBCLASE II	:	Coccidia	(Leuckart 1879)
SUBORDEN II	:	Eimeriina	(Leger 1911)
ORDEN II	:	Protococcidiida	(Leger y Dugosa 1910)
FAMILIA	:	Toxoplasmae	
GENERO	:	Toxoplasma	
ESPECIE	:	<u>Toxoplasma gondii</u>	

Características del Toxoplasma gondii:

El Toxoplasma gondii es un pequeño protozoario en forma de media luna que lleva una larga vida intracelular. Se desarrolla en cualquier célula excepto en los eritrocitos, sin embargo -- Wolfson en 1942 y Tardin y Creemers en 1967 describen formas dentro de eritrocitos nucleados de embrión de canario y de pollo. -- El parásito muestra una marcada predilección por las células del sistema nervioso central, sistema retículoendotelial, pulmón, -- músculo esquelético y placenta. En forma libre se le puede encontrar en secreciones y fluidos orgánicos como humor vítreo, humor acuoso, esputo, lágrimas, saliva, exudado vaginal, orina, huevo, leche, líquido ganglionar, líquidos placentarios, semen y otros (2,4,8,17,19).

El parásito presenta un polo superior fino que termina en forma de cono y un inferior esférico, dándole un aspecto de pera. Microscópicamente su aspecto falciforme es sólo apreciable en preparaciones frescas y en frotis secados al aire. En estos los gérmenes presentan una anchura de 2 a 4 micras y una longitud de 4 a 7 micras. En preparaciones coloradas con Giemsa, Wright y May-Grunwald-Giemsa, se distingue una membrana a veces granulosa, un citoplasma teñido de azul (basófilo) y un núcleo coloreado en rojo que no es uniforme sino vacuolado. No posee órganos de locomoción pero se desplaza por otros medios. Tiene la facultad de enquistarse en grupos si su supervivencia se ve en peligro. En su forma intracelular presenta algunas modalidades: es más pequeño, su forma es oval o redonda y con frecuencia forma quistes que -- pueden contener dos o más parásitos unidos por su parte más o menos plana (2,4,8,17).

El toxoplasma gondii es único entre los protozoarios por su capacidad para parasitar una amplia gama de hospedadores y tejidos. Es uno de los parásitos más ampliamente distribuidos. Pueden infectarse experimentalmente todos los animales homeotermos y en forma natural casi todo animal, sea de sangre fría o caliente, de

la especie que sea y se encuentre en el clima y la región geográfica donde se encuentre excepción hecha al parecer de la Antártida donde no ha sido encontrado. Entre sus hospedadores se encuentran aves, roedores, animales insectívoros, herbívoros y carnívoros, incluidas las especies domésticas y el hombre, donde representa un importante problema de Salud Pública (2,4,7,8,17,18,19).

Reproducción del Toxoplasma gondii:

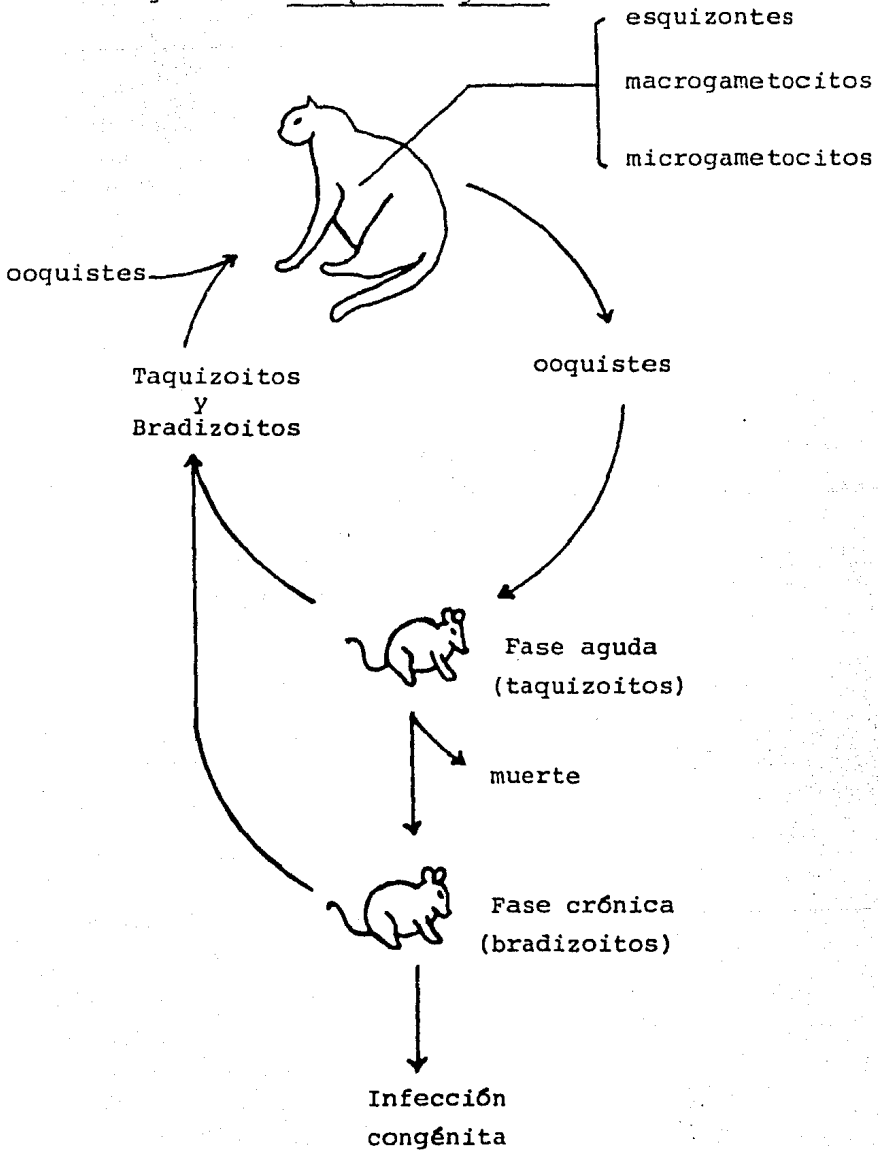
Frankel y col., en 1969, demostraron que el gato actúa como - hospedador definitivo en la evolución biológica del Toxoplasma gondii (17).

Se ha postulado que existen tres etapas en la evolución biológica del parásito: 1) Desarrollo asexual en los tejidos retículo endoteliales 2) Desarrollo de quistes en el sistema nervioso central y músculo esquelético y 3) Fases sexuales en el epitelio intestinal (2).

La figura No. 1 muestra el ciclo evolutivo del Toxoplasma gondii.

El hospedador definitivo (el gato) puede infectarse a partir de alimentos contaminados con ooquistes procedentes del excremento de otros gatos infectados, o bien por la ingestión de taquizoitos y bradizoitos eliminados por el hospedador intermediario (representado por el ratón). Dentro del intestino delgado del gato se llevan a cabo varias fases evolutivas que principian con la producción de esquizontes los cuales darán lugar a la formación de macrogametocitos para seguir con la producción de microgametocitos; estos, al unirse entre sí, darán lugar a la formación de ooquistes, una de las formas infectantes del parásito. Esta clase de reproducción se efectúa en forma sexual y los ooquistes resultantes son capaces de infectar a otros gatos o bien a cualquier animal que los ingiera. Cuando el ooquiste es -

Ciclo biológico del Toxoplasma gondii:



ROCH. E, 1971

Figura No. 1

ingerido por un animal o por el hombre mismo (hospedador intermedio), se produce una liberación de taquizoitos los cuales desencadenarán una fase aguda de la enfermedad que puede producirle la muerte o pasar a una forma crónica con la subsecuente aglomeración para formar bradizoitos (quistes) en los diferentes órganos como medio de defensa. Tanto en la forma aguda como en la crónica hay formación y liberación de taquizoitos y bradizoitos que pueden llegar a infectar a otros animales, cerrándose así un círculo infeccioso que abarca no sólo a animales de la misma especie, sino a cualquier animal que tenga contacto cercano con ellos. Esta segunda forma de reproducción se lleva a cabo en forma asexual principalmente por dos mecanismos que son: división binaria longitudinal y endodiogenia, ambos dando como resultado la formación de dos células hijas a partir de una célula madre - (4,17).

La enfermedad en el hombre:

En general el desarrollo del padecimiento en el hombre es idéntico al observado en los animales. Los síndromes más frecuentes, cuando la enfermedad es adquirida, consisten en exantema febril con neumonitis y enterocolitis; en la mujer gestante puede producir además placentitis y, dependiendo de la etapa de la gestación durante la cual la afecte, producirle: 1) Reabsorción fetal; 2) Aborto; 3) Problemas perinatales (muerte, hidrocefalia, ceguera) y 4) Retraso mental (2,4,17).

En el hombre, la mayoría de la veces, la enfermedad representa un problema de tipo ocupacional y la infección puede deberse a la ingestión de carne mal cocida, leche, huevo o cualquier subproducto proveniente de animales infectados o a la contaminación de heridas, alimentos, agua, utensilios, etc. con secreciones provenientes de los animales que pueden ser portadores del parásito, como es el caso del gato, el perro y cualquier animal

que viva en contacto con él (2,7,14,17,18,19,21).

En 1952 Naghme encontró el parásito en una placenta humana. En 1959 Butler calculó que el 25 al 50 % de la población de Inglaterra había estado alguna vez infectada con Toxoplasma. En 1960 Jacobs y Remington encontraron bradizoitos de Toxoplasma gondii en úteros provenientes de necropsias e histerectomías en humanos (9,17).

Langer en 1963 demostró la presencia de pseudoquistes en el endométrio de mujeres con aborto habitual y encontró al parásito en algunos embriones de embarazos sucesivos (3).

En México, en 1972, se analizaron muestras de sueros humanos y se encontró una positividad promedio de 35.1% de anticuerpos contra Toxoplasma gondii. Al mismo tiempo se estudiaron casos de aborto habitual en mujeres, habiendo encontrado una positividad a Toxoplasma de 40 % en promedio, obteniéndose reacciones positivas hasta de 68 %. Se demostró que el número de reacciones positivas aumenta con la edad, siendo más frecuente encontrarlas entre los 35 y los 45 años de edad. También se practicaron pruebas a mujeres que habían tenido un parto normal encontrándose una positividad promedio de 47.1 % la cual se elevó hasta 49 % en mujeres mayores de 36 años (22).

Disko, en 1973, encontró Toxoplasma gondii en el semen de tres personas infectadas en forma natural. Hallazgos similares fueron reportados por Janitschke y Nurnberger en 1975. Sin embargo la evidencia epidemiológica sugiere que el contacto sexual no juega un papel importante en la transmisión del Toxoplasma gondii en el humano (4,20).

En 1977, en Ontario, Canadá, el 40 % de la población mostró anticuerpos contra Toxoplasma (21).

En 1978, en Colombia se comprobó que el 30 al 44 % de la población humana tiene anticuerpos contra Toxoplasma gondii (14).

La toxoplasmosis aguda en el hombre, según la edad, provoca cuadros clínicos diferentes. En niños lactantes son afectados principalmente los ojos y el cerebro, produciendo entre otros defectos hidrocefalia y corioretinitis. En los niños mayores generalmente se presenta una encefalomiелitis violenta, en la que más tarde aparecen depósitos calcáreos en el cerebro. Las consecuencias clínicas son trastornos del sistema nervioso central, de curso mortal, ataques apileptiformes, parálisis, ceguera, tumefacción de hígado y bazo, alteraciones del líquido cefalorraquídeo y deformaciones cefálicas como brequicefalia, microcefalia e hidrocefalia. Las más de las veces el cuadro clínico se traduce en graves alteraciones neurálgicas y mentales. En los adultos la toxoplasmosis en el aparato digestivo o respiratorio generalmente es latente y asintomática, pero el curso latente no debe hacer olvidar el riesgo de la transmisión congénita hacia el producto provocándole los trastornos antes citados (3).

La enfermedad en los animales :

Como ya se ha expuesto, el Toxoplasma gondii es capaz de infectar a casi todo ser viviente. La transmisión del parásito se efectúa principalmente por vía oral, pero no deben descartarse otras menos usuales como la respiratoria, a través de piel y mucosas intactas, por medio de la saliva con las mordeduras y en ocasiones algunos ectoparásitos como piojos, pulgas, garrapatas y chinches, los cuales pueden actuar como vectores sin sufrir la enfermedad. A pesar de todo se considera que las vías y formas de transmisión no se conocen del todo (2,3,9,11).

El curso de la infección depende de varios factores tales como la receptividad natural de la especie animal en cuestión y su capacidad de reacción, sobre las que influyen diversas cir---

cunstancias, su constitución y la cepa del Toxoplasma y, de modo decisivo, la cantidad de la dosis infectante inicial, así como - las posibles reinfecciones. Pequeñas cantidades de Toxoplasma -- por lo general dan lugar a infecciones latentes mientras que las dosis altas cursan de modo agudo o subagudo y pueden pasar a formas crónicas (seudolatentes). La gran difusión del Toxoplasma -- gondii se ve favorecida por su peculiar biología: su escasa especificidad de hospedador, su poder para localizarse en cualquier órgano, su eliminación en estado infectante, su gran resistencia a factores externos naturales y sus amplias posibilidades de infección (3).

Los signos clínicos y el curso de la enfermedad varían notablemente entre las especies e incluso entre animales de diversas edades (2,8).

En el perro las formas más graves y la morbilidad más alta se registran entre individuos menores de un año y entre las hembras. La muerte se presenta en el 85 % de los casos. La enfermedad en su forma neumónica y gastrointestinal puede confundirse con moquillo y en su forma nerviosa con rabia, lo que hace que su diagnóstico sea aún más difícil (3, 8, 17).

En los casos clínicamente manifiestos el curso puede ser -- incidioso con fiebre, decaimiento, anorexia y diarrea, o violento con vómito, convulsiones, parálisis y otros signos nerviosos, pudiendo entonces observarse descarga nasal, lacrimación, disnea y neumonía. En perras gestantes puede atacar infectando a los -- productos con el consecuente aborto o deformación de los cachorros (9).

El gato es otro de los carnívoros altamente susceptible; -- aunque la mayoría de las veces tiene la infección en forma latente, también puede padecerla en forma aguda, si esto ocurre los -

signos clínicos son muy parecidos a los del perro (2,3,8,9,17).

El padecimiento en bovinos puede seguir un curso agudo con fiebre, disnea, trastornos nerviosos que incluyen ataxia e hiperexcitabilidad por lo cual es fácilmente confundible con derriente, a lo que sigue una letargia extrema en etapas tardías. También puede observarse expulsión de fetos muertos o nacimiento de becerros débiles o deformes que mueren poco después del nacimiento, algunos presentando los signos clásicos de la enfermedad (2,3,8,17).

Los cerdos presentan preferentemente formas latentes de infección, sin embargo los lechones pueden manifestar formas clínicas con eczemas, vértigos, debilidad, disnea, temblores, tumefacción testicular, fiebre e incluso signos de neumonía, enteritis y nefritis. A veces hay infecciones agudas en adultos predominando los signos neumónicos (2,3,17).

Según trabajos de Morgan y col. en 1947, el caballo se infecta espontáneamente, en él su incidencia es muy variable y va del 7 al 40%. Básicamente los trastornos son los mismos que para otras especies. Se ha informado de una asociación entre títulos elevados de anticuerpos contra Toxoplasma gondii y uveítis (2,17).

La toxoplasmosis puede ocurrir en forma natural en ovinos y caprinos, aunque puede aparecer como síndrome de fiebre, disnea, temblor generalizado, emaciación, anorexia, descarga nasal y ocular, postración y aborto con expulsión del feto muerto, el hallazgo más frecuente es el aborto y las muertes perinatales (1,2,19).

En 1957, en Nueva Zelanda se identificó al Toxoplasma gondii como una causa de aborto y mortinatos en ovejas. Al pasar el tiempo este se ha convertido en la principal causa de los mismos y ha sido reconocido también en Australia, Gran Bretaña, Canadá,

Tasmania y Unión Soviética (5,6,16).

En 1963, Jacobs y col. aislaron el parásito del 67 % de borregos seropositivos a Toxoplasma gondii (6),

En 1974, Hartley y Moyle aislaron toxoplasmas de quince corderos infectados en forma congénita (1).

En 1976, fueron inoculados carneros en edad reproductiva -- con una cepa de Toxoplasma gondii. El parásito fue detectado en el exudado peritoneal de ratones inoculados con semen de los mismos pero no se recobró ningún Toxoplasma de sus tejidos al sacrificarlos, aunque mostraron ser seropositivos al parásito. Al siguiente año se repitió el trabajo y se obtuvieron resultados similares pero, a diferencia del primer intento, esta vez si aislaron el germen de algunos tejidos como el epidídimo. El único signo palpable mostrado en ambas ocasiones por los carneros consistió en una elevación de la temperatura rectal por arriba de los 41°C. Al mismo tiempo se inocularon ovejas con Toxoplasma gondii por vía vaginal y el parásito fue subsecuentemente recobrado del corazón, músculo esquelético, e hígado de las mismas. Este trabajo comprueba que la transmisión del Toxoplasma gondii por medio del coito es posible, aunque no se sabe si es una vía frecuente de infección (20).

En 1977, en Nueva Zelanda se reportaron pérdidas del 5 al 50 % de los corderos producidos debidos a este parásito. En Australia se indica un rango de abortos por Toxoplasma gondii de alrededor del 7 % (16).

En 1978, Sharma y col. inocularon ovejas preñadas con una cepa de Toxoplasma gondii y encontraron los siguientes resultados:

- 1.- Signos clínicos que encajan dentro del síndrome antes descrito.

- 2.- Algunas ovejas abortaron, otras tuvieron un mortinato, otras murieron y otras tuvieron un parto normal.
- 3.- Se tomaron muestras de varios órganos (hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, diafragma, cotiledones y membranas fetales) y de todas se obtuvo positividad a Toxoplasma.
- 4.- Se comprobaron los trabajos de Beverly y Watson (1957) y Cook (1964) según los cuales el Toxoplasma gondii no siempre mata el feto al infectarlo por vía transplacentaria sino que este puede nacer normalmente aunque las membranas fetales y placenta estén infectadas (19).

En 1980, Dubey y col. inocularon ooquistes de Toxoplasma gondii por vía oral a borregos para estudiar sus órganos a fin de localizar al parásito y este fue encontrado en ocho de dieciocho muestras de tejidos mostrando marcada predilección por algunos como cerebro, corazón, diafragma, músculo esquelético e intestino (6).

Aunque la infección por Toxoplasma gondii parece ser común en los Estados Unidos, este no había sido reconocido como causante de abortos hasta que, en 1981, se le encontró al examinar un cordero muerto y su placenta provenientes de una granja donde abortaron treinta de treinta y cuatro ovejas (5).

En 1983, en Brasil inocularon borregos con Toxoplasma gondii, un grupo fue inoculado con ooquistes y otro con bradizoitos. En el primer grupo hubo signos clínicos que consistieron en hipertermia, inapetencia, taquicardia, tos, flujo nasal, diarrea, rechinar de dientes y tremor muscular generalizado; el segundo grupo sólo mostró hipertermia entre el quinto y el decimoprimer día post inoculación (1).

Resistencia del Toxoplasma gondii:

La resistencia del Toxoplasma gondii a diversos factores ecológicos, físicos, químicos y biológicos es diferente según se trate de la forma vegetativa (taquizoito) o la quística (bradizoito), siendo esta última la más resistente. También tiene importancia la naturaleza del hospedador, su posición en la escala zoológica y la localización del Toxoplasma en sus diferentes tejidos. El parásito resiste en su forma vegetativa una temperatura de 100° C durante 5 minutos, a 80°C resiste 10 minutos, a 60°C resiste 15 minutos y a 37°C de cuatro a cinco días. Al someterse a temperaturas bajas su resistencia es a 10°C más de un mes y a -4°C veinte días. Si el Toxoplasma es mezclado con compuestos crioprotectores como glicerina o suero de caballo, su resistencia a la congelación parece aumentar conforme disminuye la temperatura. En 1979 utilizando dimetilsulfoxido como crioprotector se logró preservar una cepa de Toxoplasma gondii en nitrógeno líquido a -196°C durante dos años sin que disminuyera su virulencia y suponiéndose que puede seguir así por tiempo indefinido. El parásito es fácilmente destruido por agentes químicos como el ácido clorhídrico, sosa cáustica, formol, alcohol, fenol, cloramina, compuestos yodados y detergentes comerciales concentrados. En huevo de gallina a 4°C sobrevive dos meses y en carne a la misma temperatura cuatro meses. (11, 17).

Aspectos inmunológicos:

El Toxoplasma gondii es el primer protozoario que debe añadirse a la lista de los organismos infecciosos que producen interferón dando origen a una inmunidad intracelular específica. - Reeskin y Remington proponen que al parasitar al hospedador el Toxoplasma le confiere resistencia contra algunas infecciones como listeriosis, salmonelosis, brucelosis y otras (17).

En Estados Unidos, investigaciones encaminadas a detectar anticuerpos contra Toxoplasma gondii muestran una positividad de 34% en perros, 34 a 59% en gatos, 47% en bovinos, 30% en porcinos y 48% en caprinos (2).

En 1971, otro reporte habla de una incidencia de hasta el 62% en perros y gatos y de 24 a 50% en conejos clínicamente sanos (18).

En 1977 se estudió el índice de anticuerpos en borregos y no se observó ninguna variación estacional en los títulos de la prueba de Sabin-Feldman para Toxoplasma gondii (12).

En 1978 se estudiaron sueros y órganos de borregos clínicamente sanos y se encontraron los siguientes resultados:

- | | |
|--------------------------------|----------------------|
| 1.- Prueba de Sabin - Feldman | 65% positivos |
| 2.- Prueba de Hemoaglutinación | 69% positivos |
| 3.- Inoculación en ratón | 59% positivos (7). |

En 1978, en Colombia usando prueba de hemoaglutinación se muestrearon borregos obteniéndose una positividad de 58% (14).

En 1978 un estudio confirmó la teoría de Cook (1961) y -- Graham y Laison (1969) según la cual el índice de anticuerpos contra Toxoplasma sufre una brusca caída después de 16 a 32 semanas postinfección (19).

Diagnóstico de Toxoplasmosis :

En el diagnóstico de laboratorio para toxoplasmosis pueden usarse dos métodos:

- 1.- Método directo :

Microscópicamente los toxoplasmas pueden observarse median-

te frotis de secreciones o líquidos orgánicos o mediante cortes de diferentes órganos del animal sospechoso. Las tinciones más usadas son: Wright, Giemsa, Hematoxilina- Eosina, Plata amoniacal y May-Grunwald-Giemsa. Una variante de este método consiste en inocular animales de laboratorio por vía intraperitoneal con secreciones o macerados de órganos de animales sospechosos para, posteriormente, tratar de observar al microscópio los toxoplasmas que aparecen en el exudado peritoneal o los órganos de los animales inoculados.

2.- Método indirecto:

Este método se lleva a cabo mediante la detección de anticuerpos específicos o inmunidad celular contra Toxoplasma gondii en sueros sanguíneos, líquido cefaloraquídeo, humor acuoso y piel. Las pruebas más usadas son:

- a) Reacción de Sabin-Feldman
- b) Prueba de hemoaglutinación
- c) Prueba de fijación de complemento
- d) Prueba de intradermoreacción
- e) Prueba de anticuerpos fluorescentes
- f) Prueba de neutralización
- g) Prueba de inmunoelectroforesis

Estas pruebas son poco usadas en medicina veterinaria debido a su alto costo y a las dificultades que representa el realizarlas, dándose preferencia al uso del método directo para trabajos de campo. Estas pruebas quedan casi siempre restringidas a trabajos de investigación, el mayor uso se les da en medicina humana y sus rangos de efectividad son muy elevados (3, 4, 9, 17).

O B J E T I V O S .

- 1.- Determinar la presencia del parásito Toxoplasma gondii en el semen de carneros previamente inoculados con una cepa -- del mismo.

- 2.- Determinar la supervivencia del Toxoplasma gondii en muestras de semen congelado en nitrógeno líquido a diferentes -- intervalos.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Se utilizaron cuatro carneros con una edad de dos a cuatro años y fueron inoculados con exudado peritoneal (1.25 ml. c/u -- aproximadamente) de ratón infectado con una cepa de Toxoplasma gondii, misma que fue proporcionada por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, S.S.A. Los carneros se aislaron en un corral, previamente se les había practicado una prueba de inmunofluorescencia indirecta en el mismo Instituto habiendo resultado negativos a Toxoplasma. Dos carneros fueron inoculados por vía intraperitoneal y dos por vía subcutánea como se muestra en el cuadro No. 1. Los cuatro carneros fueron clínicamente observados durante los primeros diez días postinoculación (d.p.i.).

Cuadro No. 1

"Toxoplasma gondii en semen de carneros y su resistencia al congelar el mismo con fines de inseminación artificial"

Vías usadas para inocular el Toxoplasma gondii

Ovino No.	Vía de inoculación
59	Subcutánea
47	Subcutánea
61	Intraperitoneal
73	Intraperitoneal

Ponce, 1984

Muestras de semen fueron obtenidas de los cuatro carneros con

ayuda de un electroeyaculador a diferentes intervalos. La primera muestra se tomó a los 25 d.p.i. y las siguientes se tomaron a intervalos de 7 días hasta los 60 d.p.i. cuando se tomó la última muestra y los animales fueron sacrificados para realizarles la necropsia.

Para confirmar la eliminación de toxoplasmas en los animales inoculados se tomaron muestras de semen fresco con objeto de inocular ratones.

Para congelar las muestras de semen se utilizó el siguiente método:

- 1.- Previo a la obtención del semen se preparó el diluyente necesario para poder proceder a la congelación en forma de "pelle-ts". Los componentes del diluyente son:

Lactosa al 11%	_____	37.5 ml.
Yema de huevo	_____	10.0 ml.
Glicerol	_____	2.5 ml.

El diluyente fue puesto en la estufa a 37°C. No se le adicionaron antibióticos para evitar el riesgo de causar algún daño al Toxoplasma.

- 2.- Se procedió a obtener las muestras de semen con ayuda de un electroeyaculador que trabaja en base a descargas graduales de 0 a 12 voltios.

- 3.- Una vez obtenida la muestra se procedió a adicionarle el diluyente a razón de 1:4 (V/v). Las mezclas fueron inmersas en agua y puestas en refrigeración a 4°C durante dos horas para que el proceso de enfriamiento fuera gradual y afectara lo menos posible la supervivencia espermática y la del Toxoplasma gondii.

- 4.- Después de sacar las muestras del refrigerador se hicieron los "pellets" vertiendo 0.5 ml. de semen diluido en perforaciones hechas sobre la superficie de un bloque de bióxido de carbono sólido (hielo seco) que tiene una temperatura de -79°C donde se dejaron por espacio de 1 a 2 minutos hasta que tomaron con sistencia sólida.
- 5.- Para finalizar, los "pellets" fueron guardados por separado y etiquetados con el número de carnero de procedencia y la fecha de congelación para meterlos al termo con nitrógeno líquido a -196°C y dejarlos listos para descongelarlos a diferentes intervalos.

Para la identificación del Toxoplasma gondii en el semen congelado se aplicó el siguiente método:

- 1.- El descongelado del semen se efectuó depositando un "pellet" - dentro de un tubo de ensaye que contenía 0.2 ml. de solución de Hartman a 37°C .
- 2.- Una vez descongelada, cada muestra fue inoculada intraperitonealmente a dos ratones, mismos que fueron debidamente marcados y aislados por espacio de tres o cuatro días.
- 3.- Transcurrido ese tiempo los ratones fueron sacrificados y, -- con muestras de su exudado peritoneal, se procedió a hacer - frotis para teñirlos con colorante de Wright mediante la siguiente técnica especial para Toxoplasma gondii:
 - a) Poner una gota de exudado peritoneal sobre un portaobjetos, esparcirla y secarla.
 - b) Vertir sobre el frotis 10 gotas de alcohol metílico 96°GL y dejarlo así por espacio de 30 segundos.

c) Adicionar lo gotas de colorante de Wright y dejarlo así otros 30 segundos. Inmediatamente lavar el frotis con agua destilada y secarlo.

4.- Una vez hechos los frotis fueron observados al microscópio y, posteriormente, llevados al Laboratorio de Parasitología del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales para que fueran revisados y se confirmara el diagnóstico.

R E S U L T A D O S .

Los signos clínicos observados durante los primeros 10 d.p.i. consistieron en una elevación de la temperatura rectal por arriba de 41°C, que fueron disminuyendo gradualmente hasta estandarizarse en 39°C hacia el séptimo d.p.i.; otros signos observados fueron ligera anorexia, polipnea, emaciación, decaimiento, tembor muscular generalizado y rechinar de dientes. La mayoría de los signos mencionados tendieron a desaparecer después de 7 a 8 d.p.i.

En total se tomaron seis muestras las cuales se enumeraron progresivamente del 1 al 6 y se congelaron pero, al tomar la primera y la última muestra, no sólo se congelaron sino que se inocu- laron ratones con una dosis (0.5 ml.) de semen fresco sin diluir- para tratar de localizar toxoplasmas. Los resultados de esta ino- culación se muestran en el cuadro No. 2

Cuadro No. 2

"Toxoplasma gondii en semen de carneros y su resistencia al conge- lar el mismo con fines de inseminación artificial!"

Cuadro de inoculación de semen fresco a ratones a los 25 y - 60 d.p.i.

Carnero No.	Muestra No. 1 (25 d.p.i.)	Muestra No. 6 (60 d.p.i.)
59	-	+
47	+	+
61	-	+
73	-	+

En la inoculación de ratones con semen fresco tomado a los 25 d.p.i. sólo mostró formas de Toxoplasma el carnero No. 47, -- mientras que en la inoculación con semen tomado a los 60 d.p.i. -- todos los carneros mostraron formas de Toxoplasma gondii.

Habiendo obtenido positividad a Toxoplasma gondii en una -- muestra del cuadro No. 2 a los 25 d.p.i. se procedió a hacer ino- -- culaciones con semen de 15 días de congelado. Los resultados se- -- muestran en el cuadro No. 3

Cuadro No. 3

"Toxoplasma gondii en semen de carneros y su resistencia al conge- lar el mismo con fines de inseminación artificial".

Cuadro de inoculación de ratones con semen de 15 días de congelado

Carnero No.	No. de muestra semanal			
	1	2	3	4
59		-		-
47		-	+	+
61	-	-		+
73	-	+	+	-

Ponce, 1984

NOTA.- En los espacios en blanco no hubo resultado por haberse -- hechado a perder la muestra de semen o el frotis.

En esta etapa del trabajo sólo se hicieron inoculaciones -- con semen de las primeras cuatro semanas, habiendose obtenido --

positividad a Toxoplasma para el carnero No. 47 en las muestras de la tercera y cuarta semana; para el No. 61 sólo en la cuarta semana y para el No. 73 en la segunda y tercera semana.

El siguiente paso consistió en descongelar las muestras de la cuarta semana a intervalos de 15, 30, 60 y 90 días postcongelación, para ver si el Toxoplasma gondii es capaz de resistir - esos períodos. Ver cuadro No. 4

Cuadro No. 4

"Toxoplasma gondii en semen de carneros y su resistencia al congelar el mismo con fines de inseminación artificial"

Cuadro de supervivencia del Toxoplasma gondii en semen descongelado a diferentes intervalos.

Tiempo transcurrido				
Carnero No.	15 días	30 días	60 días	90 días
59	-	-	-	+
47	+	+	-	-
61	+	-	+	+
73	-	-	+	-

Ponce, 1984

En el carnero No. 59 hubo positividad en su semen descongelado a los noventa días; en el No. 47 se obtuvo a los quince y treinta días; en el borrego No. 61 hubo resultados positivos a -

los quince, sesenta y noventa días y, por último, el carnero No. 73 que mostró positividad a los sesenta días de congelado su semen.

A los animales se les sacrificó transcurridos 60 d.p.i. y a la necropsia no se les encontró ninguna lesión macroscópica -- aparente.

D I S C U S I O N .

Como se puede ver, los signos clínicos observados en los -- cuatro carneros encajan dentro del síndrome característico de la toxoplasmosis. Al mismo tiempo se puede constatar que no hubo di^uferencia entre las respuestas clínicas de los carneros inocula-- dos por vía subcutánea con respecto a los carneros inoculados -- por vía intraperitoneal; los signos presentados fueron básicamen^ute los mismos y se presentaron al mismo tiempo. Tampoco hubo re^lación directa entre la vía de inoculación y la cantidad de mues^utras de semen positivas; así por ejemplo, en los carneros inocu^lados por vía subcutánea, uno (No. 59) mostró un mínimo de - - muestras de semen positivas, mientras que el otro (No. 47) mos^utró una positividad muy elevada; al mismo tiempo los carneros -- inoculados por vía intraperitoneal (Nos. 61 y 73) mostraron -- una positividad intermedia a la de los dos borregos anteriores.

Los cuatro carneros presentaron formas de Toxoplasma gondii en su semen en un momento dado; sin embargo hubo diferencias en cuanto al número de muestras positivas se refiere. Así pues el - carnero que presentó más muestras de semen con Toxoplasma gondii fue el No. 47, seguido por los borregos Nos. 73, 61 y 59 respec^tivamente.

Como se puede constatar observando los cuadros No. 2 y No.3 las muestras marcadas como positivas no siguen un órden repetiti^uvo, es decir, que el semen de un carnero pudo haber sido negati^uvo a Toxoplasma gondii en una semana y a la siguiente pudo resul^utar positivo. Esto puede explicarse de tres maneras:

- 1.- Como sucedió en el trabajo de Spence y col en 1978, a veces el Toxoplasma gondii no se elimina en forma inin^uterrupta en el semen, sino que se deja de detectar - por cierto número de días para posteriormente encon--- trarse de nuevo (20).

- 2.- A veces la cantidad de Toxoplasmas eliminados en el semen es muy pequeña, si a esto aunamos que el semen debe ser diluido para su congelación, tendremos muy pocas posibilidades de observar los parásitos en el exudado peritoneal de ratón a menos que se hagan varios - pases a otros ratones para dar tiempo a que se multiplique la cepa. Esto no pudo realizarse en el presente trabajo.

- 3.- El diagnóstico de toxoplasmosis usando la técnica de - inocular ratones no es 100% efectivo, lo que representa una desventaja con respecto a otros métodos más sofisticados (7). Sin embargo, debido a su bajo costo, es el que mejor se adaptó a las condiciones bajo las - cuales se realizó el presente trabajo.

La falta de hallazgos aparentes a la necropsia de los carneros también había sido reportada por Spence y col. En 1978, aún cuando los borregos en esa ocasión presentaron formas de Toxoplasma gondii en su semen y mostraron ser seropositivos al mismo - - (20).

CONCLUSIONES.

El Toxoplasma gondii es un parásito que representa un peligro potencial para el hombre y los animales por los daños que a estos o a sus hijos puede causarle, sin embargo la importancia - que al parásito se había dado en medicina veterinaria era, hasta hace unos años, muy poca. Afortunadamente y gracias a nuevas investigaciones y métodos de diagnóstico, el estudio del Toxoplasma gondii va en aumento y, aunque no se conoce del todo, ya se cuenta con armas suficientes para enfrentarlo con amplias posibilidades de éxito (2,3,9,17).

En la práctica profesional no debe nunca descartarse la posibilidad de hallarse frente a un caso de toxoplasmosis cuando - se observen problemas de neumonías, gastroenteritis, abortos, de formaciones fetales y muertes perinatales, así como problemas de tipo nervioso. Debe hacerse hincapié en que todo plan encaminado al control de la toxoplasmosis debe siempre incluir como punto - fundamental una serie de medidas dirigidas a controlar la población felina de la zona afectada (1,2,3,8,9,17).

En el presente estudio pudo comprobarse que el Toxoplasma gondii se elimina a través del semen de carnero y que puede resistir la congelación en el mismo por lo menos durante tres meses. Si esta es una vía frecuente de infección o si el Toxoplasma gondii pierde virulencia al ser congelado, son incógnitas que deben aclararse por separado y ser motivo de otros estudios.

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Acosta A.J. y Márques L.C. (1983)
EXPERIMENTAL OVINE TOXOPLASMOSIS. I. CLINICAL
AND LABORATORIAL ASPECTS.
Memorias del 9º Congreso de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Trabajo # 103; Maracay, Venezuela.
- 2.- Blood D.C. y Henderson J.A. (1976)
MEDICINA VETERINARIA
Editorial Interamericana; 4ª Edición; México, D.F.
Pags. 617-620
- 3.- Borchert A. (1975)
PARASITOLOGIA VETERINARIA
Editorial Acribia; 3 Edición; Zaragoza, España.
Pags. 656-663
- 4.- Castro M.J.L. (1982)
DETECCION DE TOXOPLASMA gondii EN SEMEN DE BOVINOS PREVIA--
MENTE INOCULADOS EN LA CUENCA LECHERA DE CUAUTITLAN, EDO. -
DE MEX. Tesis; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,
U.N.A.M.
- 5.- Dubey J.P. and Schimitz S.P. (1981)
ABORTION ASSOCIATED WITH TOXOPLASMOSIS IN SHEEP IN OREGON.
Journal of American Veterinary Medical Asoc. vol. 178 # 7
pags. 675-678.
- 6.- Dubey J.P. and Sharma S.P. (1980)
PARASITEMIA AND TISSUE INFECTION IND SHEEP FED TOXOPLASMA -
GONDII OOCYSTS.
Journal of Parasitology; vol. 66: pags. 111-114.

- 7.- Hagiwara F., Fatsube Y., Kamiyama E. (1978)
LATENT INFECCION OF TOXOPLASMA IN SHEEP AND GOATS.
Japanese Journal of Veterinary Science. vol. 40; # 4
pags. 455-457.
- 8.- Jubb K.V.F. y Kennedy C.K. (1973)
PATOLOGIA DE LOS ANIMALES DOMESTICOS. Tomos I y II.
Editorial Labor, España.
- 9.- Lapage G. (1981)
PARASITOLOGIA VETERINARIA.
Edit. Continental; 6^a Impresión; México, D.F.; pags. 689-692
- 10.- Levine N.D. (1980)
A NEWLY REVISED CLASIFICACION OF PROTOZOA.
Journal of Protozoology: vol. 27; # 1; pags. 37-58
- 11.- Llorante L.V. (1979)
CONGELACION DE TOXOPLASMA GONDII EN NITROGENO LIQUIDO.
Revista Ibérica de Parasitología; vol. 30; pags. 353-360.
- 12.- Owen D. and Chessum D.S. (1977)
OBSERVATION OF DYE TEST (DT) TITRES TO TOXOPLASMA IN A NON
BREEDING FLOCK OF SHEEP.
Veterinary Record; vol. 10; # 20; 402-404
- 13.- Peña V.M. y Melésio A.F. (1984)
COMPARACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y ANORMALIDADES DE -
LOS ESPERMATOZOIDES DE CARNERO DE LA RAZA MERINO AUSTRALIA-
NO, ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PELLETS EN TRES DI
FERENTES DILUENTES.
Tesis; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; U.N.A.M.

- 14.- Perry B.D.; Grieve A.S.; Mogollon J.D.; de Galvis A.L.H. -
(1978).
SEROLOGICAL STUDY OF OVINE TOXOPLASMOSIS IN COLOMBIA: PREVA
LENCE OF HAEMOAGGLUTINATING ANTIBODIES TO TOXOPLASMA IN SHEEP.
Veterinary Record; vol. 103; # 26/27; pags. 584-585.
- 15.- Pokorný J.; Fruhbauer Z.; Curík B.; Zástera M. (1972)
A TWEEN-ETHER PREPARATION OF TOXOPLASMA gondii ANTIGEN FOR
THE COMPLEMENT FIXATION TEST.
Bull. Org. Mond. Santé; vol. 46; pags. 127-130.
- 16.- Rieman H.P.; Willadsen C.M.; Berry L.J.; Bahymer D.E.;
García Z.V.; Frante C.E.; Ruppner R. (1977)
SURVEY FOR TOXOPLASMA ANTIBODIES AMONG SHEEP IN WESTERN
UNITED STATES.
Journal of American Veterinary Medical Assoc.
vol. 171; # 12; pags. 1260-1264.
- 17.- Roch E. (1971)
COMPENDIO DE TOXOPLASMOSIS.
Editorial Patria; 1^a Edición; México, D.F. pp 242
- 18.- Shaddock J.A. and Pakes S.P. (1971)
ENCEPHALITOOZONOSIS (NOSEMATOSIS) AND TOXOPLASMOSIS.
American Journal of Pathology; vol. 64; # 3; pags. 657-674
- 19.- Sharma S.P. and Gautam O.P. (1978)
ESTUDIES OF SOME ASPECTS OF PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL
TOXOPLASMOSIS IN SHEEP.
Archiva Veterinaria; vol. 13; pags. 117-126.
- 20.- Spence J.B.; Beattie C.P.; Faulkner J.; Henry L.;
Watson W.A. (1978)
TOXOPLASMA gondii IN SEMEN OF RAMS.
Veterinary Record; vol. 102; pags. 38-39

21.- Tizard I.R.; Carrington M. and Lai Ch. (1977)

TOXOPLASMOSIS IN GOATS IN SOUTHERN ONTARIO.

¿ A PUBLIC HEALTH HAZARD ?

Canadian Veterinary Journal; vol. 13; # 10; pags. 274-277

22.- Varela G. (1972)

TOXOPLASMOSIS. ESTUDIO EN SUEROS HUMANOS EN LOS ULTIMOS CUATRO AÑOS. COMPARACION ENTRE LA SEROLOGIA DE LA TOXOPLASMOSIS Y DE LA INFECCION POR SARCOSISTIS EN BOVINOS.

Editado por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales S.S.A. y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. México, D.F.