

13  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

Diagnóstico y Estudio Epizootiológico  
de la Toxoplasmosis Ovina en  
Huehuetoca, México

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
PRESENTAN

Alejandro Gerardo Buendía Ruiz  
Enrique Reyes Guevara  
Ignacio Vizuetth Resendiz

Director de Tesis M. V. Z. Alfredo Cuéllar Ordez

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## INDICE

	PAGINA
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
OBJETIVOS .....	27
MATERIAL Y METODOS .....	28
RESULTADOS .....	32
DISCUSION .....	37
CONCLUSIONES .....	40
ANEXO .....	41
BIBLIOGRAFIA .....	60

## RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en diversas explotaciones de traspatio y la paramunicipal Fondo de Fomento Económico para el Desarrollo Regional (FOMECE) ubicados en el municipio de Huehuetoca, México. Se diagnosticó la toxoplasmosis por serología en 279 ovinos de los cuales 249 fueron hembras y 20 sementales.

Se tomaron en cuenta factores que pudieron afectar el diagnóstico serológico, tales como: edad, presencia del hospedero definitivo y de los hospederos intermedios, período preparto y período postparto. Se realizó la prueba serológica de hemaglutinación indirecta, de la cual se obtuvo un 1.21% de positivos, 91.8% de negativos y 6.75% de sospechosos, se encontró además que a mayor edad aumenta el título de anticuerpos, que antes o después del parto no hay diferencias significativas, y que la presencia del hospedero definitivo y de los intermediarios no fue determinante en la toxoplasmosis.

Se aplicó también la técnica de coagulación en la cual los resultados obtenidos se correlacionaron con los obtenidos en la técnica de hemaglutinación indirecta para tomarla como una prueba nueva en el diagnóstico de toxoplasma, pero resultó ser poco sensible  $r = 0.44$ .

## INTRODUCCION

Hoy en día la población ovina mundial ha crecido lentamente, desafortunadamente no es mismo caso en México, en donde la especie ovina ocupa el último lugar de importancia económica dentro de todos los animales domésticos explotados. (Arbiza, 1984).

Las condiciones sanitarias que imperan en las explotaciones ovinas son en la mayoría de los casos mínimas, debido generalmente a que son explotaciones de tipo caseras que son utilizadas simplemente como un complemento en la economía familiar.

El nivel de la tecnología aplicada es muy bajo y esto es efecto de otras causas más profundas de orden: social, económica y política. La eficiencia es baja, la mano de obra en su mayoría casera, las construcciones son rústicas y en general no existe ningún manejo de orden reproductivo, ni nutritivo, ni sanitario; tampoco se practica ningún programa de mejoramiento genético. Por ejemplo en la reproducción, el apareamiento es libre y los corderos nacen en la época menos propicia; la consanguinidad es muy alta, al igual que las enfermedades (Arbiza, 1984), algunas de las cuales son compartidas con el hombre como la toxoplasmosis.

## TOXOPLASMOSIS

### Definición

La toxoplasmosis es una zoonosis que afecta a una gran cantidad de animales causada por el Toxoplasma gondii, parásito intracelular obligado, culpable de invadir a casi todos los tipos de células del cuerpo, con la posible excepción de la red de células no nucleadas de la sangre -- (Aganga et al., 1981; Blewett, 1983; Porchert, 1964; Hunter et al., 1980).

La toxoplasmosis se considera actualmente como la parasitosis más extendida en el mundo, y el hecho de haberle reconocido el carácter antropozóotico la eleva a la categoría de zoonosis universal y al T. gondii como un parásito eurixeno (Roch, 1971).

La toxoplasmosis es la mayor causa de abortos en borregos en varias partes del mundo y causante de pérdidas reproductivas en otros animales (Dubey et al., 1981; Uggla et al., 1987; Wilkins et al., 1987).

### Etiología

Según datos parece que el T. gondii fue observado por Laveran (1900) en Gorriones de Java (Poch, 1971).

En octubre de 1908 Nicolle y Manceaux envían una nota a la Academia de Ciencias de París relacionada con el hallazgo de un parásito nuevo observado en frotis de sangre de bazo e hígado, en dos ejemplares de un pequeño roedor llamado "gondi" o "gundi" (Ctenodactylus gondi) capturados en Matmata, en el sur de Túnez. El parásito fue considerado como un protozoario al que posteriormente por su forma en ar

co y por hallarlo en el gondi, lo denominaron Toxoplasma gondii (Aganga et al., 1981; Beverley et al., 1961; Borcher, 1964; Del Muro, 1982; Roch, 1971).

En 1905 Alfonso Splendore, en Brasil, reporta haber observado en las vísceras de un conejo, un parásito re niforme de 5 a 8 micrómetros de largo por 2.5 a 4 de ancho - que posteriormente denominó Toxoplasma cuniculi (Roch, 1971).

A partir de estas fechas, muchos fueron los - reportes de hallazgos de este género en diversos animales, - incluyendo al hombre, creando muchas especies de toxoplasma, y dando origen a una confusión taxonómica. En un principio se supuso que el toxoplasma comprendía un género con muchas especies, pero un gran grupo de observadores defendieron la teoría unicista, y en la actualidad se acepta unánimemente - que no hay más que una sola especie capaz de infectar al hom bre y a los animales y que es la especie gondi: Toxoplasma gondii (Díaz et al., 1985; Levine, 1980; Roch, 1971).

Clasificación Taxonómica

- Reino: Animal
- Subreino: Protozoos
- Phylum: Apicomplexa
- Clase: Sporozoea
- Subclase: Coccidia
- Orden: Eucoccidiida
- Suborden: Eimeriina
- Familia: Sarcocystidae
- Subfamilia: Toxoplasmatinae
- Género: Toxoplasma
- Especie: T. gondii  
(Soulsby, 1982)

### Características Morfológicas

El T. gondii es semilunar, mide por término medio de 3.5 a 7 micrómetros de largo por 1.5 a 4 micrómetros de ancho, presenta un polo superior fino que termina en forma de cono y el inferior esférico dándole al parásito el aspecto de pera. En el polo superior y en contacto con la pared se distingue una condensación en forma de cono truncado, es el sistema conoide. El vértice está formado por un anillo de 0.15 a 0.25 micrómetros de diámetro que parece comunicarse con el medio exterior: es el anillo polar. De la base del conoide, la cual se encuentra dentro del citoplasma, parten dos sistemas de fibras, unas muy finas submembranosas en número de 8 a 10, llamadas nervaduras radiales, las otras, más gruesas, cilíndricas, ectoplasmáticas, osmófilas, uniformes en su estructura interna, son llamadas toxonemas. El citoplasma es transparente, finamente granuloso, presenta en su interior una serie de estructuras bien organizadas. En primer lugar destaca el núcleo, redondo u oval, mide de 1 a 1.5 micrómetros de diámetro, ocupa la parte media o inferior, en vuelta por una pared de doble membrana. dentro se halla el nucleolo en forma dispersa y gránulos de cromatina uniformemente repartidos, encima del núcleo se encuentra el aparato de Golgi, alrededor del núcleo está el retículo endoplasmático con pequeños cuerpos redondos: los ribosomas. El retículo parece representar al sistema circulatorio en el parásito. Además existen mitocondrias de 1 a 2 micrómetros de largo por 0.1 a 0.2 micrómetros de ancho, y vacuolas esféricas refringentes, las cuales se encuentran repartidas por todo el citoplasma, y que contienen sustancias osmófilas, semejantes a lípidos. (Borchert, 1964; Levine, 1980; Roch, 1971).

El toxoplasma no posee órganos de locomoción, como pseudópodos flagelos o membrana ondulante, pero a pesar de ello su movilidad es bien manifiesta. Los movimientos ob

servados en cultivos de células y en exudado peritoneal del ratón, son lentos. El toxoplasma se desplaza en tres formas: por movimientos ondulatorios de la pared, que se dirigen del extremo inferior al extremo superior o sistema conoide y están bajo el control del sistema de nervaduras radiales submembranosas, por movimientos circulatorios y de tirabuzón -- con el sistema conoide fijo, bien sea en la célula hospedera o sobre alguna partícula, inclusive la membrana del quiste, y un movimiento de impulsión debido al ectoplasma con el resto del cuerpo fijo. La pared celular es un órgano de movilidad que produce movimientos semejantes a los vermiculares -- (Foch, 1971).

En las formas intracelulares (monocitos, linfocitos, etc.) los parásitos presentan algunas modalidades: son más pequeños, su forma es oval o redonda y con frecuencia se ven acoplados de dos en dos y unidos por su parte más o menos plana (Roch, 1971).

Los ooquistes de T. gondii son de forma esférica y ya maduros presentan dos estructuras redondas (esporoquistes) en su interior y dentro de cada una de ellas cuatro esporozoitos vermiformes. Estos ooquistes miden de 10 a 12 micrómetros de diámetro (Soulsby, 1982).

### Ciclo Biológico

Dentro del ciclo biológico del toxoplasma, -- los felinos juegan un papel de suma importancia al ser hospederos definitivos de la enfermedad (Blewett et al., 1983; -- Dubey, 1980; Soulsby, 1982). Mientras que todos los animales de sangre caliente pueden actuar como intermediarios.

El ciclo biológico del T. gondii se divide en

dos partes: una fase entero-epitelial y una fase extraintestinal. La primera fase ocurre en el hospedero definitivo y comienza con la ingestión generalmente de alimento infectado con quistes conteniendo bradizoitos, que son liberados por efecto de las enzimas digestivas y que penetran en las células epiteliales intestinales donde se lleva a cabo una serie de multiplicaciones asexuales de estadíos morfológicos (A, B, C, D y E) que se pueden diferenciar por el tiempo en que ocurren, y por los cambios celulares y tipos de reproducción que en cada uno de ellos acontece, posteriormente y como consecuencia a este tipo de reproducción asexual, ocurre la reproducción sexual, donde la unión por conjugación de macrogametocitos y microgametocitos conllevan a la formación del cigoto, siendo a partir de este momento, cuando se inicia la tercera etapa de reproducción (de tipo asexual) la esporogónica, que nos lleva a la aparición de ooquistes inmaduros que se eliminan en las heces del gato y que por efecto de factores ambientales (temperatura, humedad, etc.) maduran al formarse 4 esporozoitos en el interior de cada uno de los 2 esporoquistes. (Calderón et al., 1985; Soulsby, 1982).

En este estadio es consumido por el animal susceptible donde se desarrolla el ciclo intestinal e incluye a todos los animales de sangre caliente, incluso a los felinos donde puede ocurrir simultáneamente, tanto el ciclo entero-epitelial como el extraintestinal, este último se inicia con el desarrollo de taquizoitos, formas de rápida multiplicación, que son las primeras halladas después de la ingestión de ooquistes esporulados y que son vistas especialmente en infecciones agudas viscerales (Del Muro, 1982; Soulsby, 1982).

Los taquizoitos se desarrollan en una vacuola en una gran variedad de células, incluyendo fibroblastos, --

hepatocitos, células reticulares y células del miocardio, se multiplican por endodiogenia y eventualmente de 8 a 16 o más organismos se acumulan en una célula hospedera hasta que la desintegran e infectan nuevas células (Soulsby, 1982).

Posterior a la formación de taquizoitos aparecen los bradizoitos contenidos en quistes y que son característicos de infecciones crónicas hallados generalmente en cerebro, corazón y músculo esquelético. Los bradizoitos se multiplican lentamente, los quistes contienen miles de estas -- formas que persisten por meses o años después de la infección, estos quistes miden aproximadamente 100 micrómetros de diámetro y contienen hasta 60,000 organismos encerrados en una estructura generalmente en forma de lanceta que posee un núcleo terminal (Soulsby, 1982).

### Epizootiología

El gato es el único hospedador capaz de esparcir ooquistes de T. gondii en sus heces y estos ooquistes -- pueden sobrevivir en la tierra por un año o más siendo un importante reservorio de la enfermedad, éstos a su vez se infectan por comer ratones, conejos y pájaros infectados, pero los gatos excretan probablemente sólo una vez y por lo tanto la fuente probable de diseminación continua son las camadas de gatitos no inmunes, además de los ooquistes que permanecen en los tejidos u otros lugares donde viven los horreños (Blewett et al., 1983; Dubey et al., 1986; Frenkel et al., 1981; Huffman et al., 1981; Soulsby, 1982).

Algunos estudios muestran que casi un 90% de gatos (seronegativos) alimentados con tejidos conteniendo -- quistes de T. gondii, esparcen grandes cantidades de ooquistes dentro de los cuatro o cinco días después de la infección, pero sólo un 20% produce heces infectantes, además de

que la excreción de ooquistes dura solamente de 1 a 2 semanas (Blewett et al., 1983; Dubey et al., 1986; Soulsby, -- 1982).

La ingestión de carne infectada por T. gondii es una de las mayores fuentes de infección y ha sido demostrada en carne de carnero, puerco y aves (Dubey, 1980; Dubey et al., 1981; Coutinho et al., 1982; Soulsby, 1982).

El ciclo pájaro-gato puede perpetuar la infección por T. gondii dentro de la granja (Dubey, 1981).

Un gato puede excretar millones de ooquistes de T. gondii después de haber ingerido unos cuantos quistes por comer vísceras o bien carne cruda (Dubey, 1980; Dubey, 1981).

El descubrimiento de Sarcocystis muris en las heces del gato con T. gondii indica que el gato adquiere esa infección por consumir ratones infectados (Dubey et al., -- 1986).

La leche de la gata sólo es infectante cuando esta ha sido infectada experimentalmente con dosis muy altas que no se dan en forma natural (Dubey, 1990).

La contaminación con ooquistes en los alimentos es otra importante fuente de infección. (Aganga et al., - 1981; Calderón et al., 1985; Coutinho et al., 1982; Frenkel et al., 1981).

Las ovejas son muy susceptibles a infectarse con T. gondii y tienden a retener títulos de anticuerpos. - Los anticuerpos formados en estas condiciones por lo general

permanecen con títulos elevados por 1 ó 2 años después del ataque inicial, e incluso pueden mantenerse de por vida aunque a títulos bajos. El parásito a su vez, puede permanecer viable intracelularmente por varios años (Blewett et al., -- 1983; Isita et al., 1984; Hartley et al., 1968; Frenkel et al., 1981).

La toxoplasmosis clínica ovina ocurre cuando una oveja susceptible experimenta su primera infección durante la preñez, es conocido que las ovejas preñadas son susceptibles a infecciones con dosis bajas, mientras que la toxoplasmosis en ovejas no preñadas es típicamente leve e inaparente (Blewett et al., 1983).

Reportes serológicos indican una alta prevalencia de infección por T. gondii en ovejas, pero en términos prácticos es durante la preñez cuando la infección es importante (Blewett et al., 1983).

La prevalencia de anticuerpos contra toxoplasmosis en borregos es generalmente más alta que en otros herbívoros domésticos, el incremento de la prevalencia de anticuerpos tiene una correlación positiva con la edad del animal (Blewett, 1983; Dubey et al., 1985; Calderón et al., - 1985; Medeiros et al., 1985).

Los títulos adquiridos naturalmente, aparentemente son más efectivos que los que se adquieren artificialmente para la prevención de muerte fetal por toxoplasma cuando las borregas fueron infectadas durante la preñez (Beverly et al., 1971).

Sólo un 25% de las ovejas que presentan títulos significativamente desarrollados muestran signos clíni-

cos (Blewett et al., 1983).

Muchas borregas muestran fluctuaciones en su título de anticuerpos sugiriendo una posible reinfección o reactivación de una infección latente (Hartley et al., 1968).

La toxoplasmosis en una infección congénita en corderos es adquirida de madres infectadas, además de que no se conoce que los anticuerpos maternos atraviesen la placenta (Blewett et al., 1983; Dubey et al., 1986; Hartley et al., 1968).

El desarrollo de la inmunidad materna no disminuye el efecto del parásito en el placentoma, pero el resultado es influenciado por la edad de los fetos, siendo generalmente en temprana y mediana preñez la muerte o reabsorción embrionaria, mientras que en una preñez tardía el porcentaje de supervivencia generalmente es alto, puesto que los fetos desarrollan una inmunidad, y ésta se ve acelerada por la estimulación de la infección (Buxton et al., 1986).

La transmisión venérea puede ocurrir experimentalmente por semen de machos infectados con *T. gondii*, pero esta transmisión está limitada a un breve período inmediato después de la infección (Blewett et al., 1983).

No hay evidencia experimental de que ocurra enfermedad por contacto directo (Blewett et al., 1983).

Está demostrado que las ovejas pueden transportar ooquistes esporulados y hasta contaminar áreas de corderos, es posible que los invertebrados, como los insectos coprófagos, artrópodos hematófagos y moluscos, que juegan -

algún papel en la diseminación de ooquistes (Dubey, 1980; Huffman et al., 1981; Soulsby, 1982).

Finalmente, otras formas de transmisión posibles son la picadura de mosquitos, mordedura de ácaros, huevos de gallina infectada y transfusiones entre otras (Del Muro, 1982; Roch, 1971; Soulsby, 1982).

### Patogenia

Administrados por vía oral, los ooquistes son más infectantes que los taquizoitos o los bradizoitos enquistados. Similarmente, los ooquistes son más infectantes que los taquizoitos o los bradizoitos inoculados subcutánea o intraperitonealmente. Siguiendo a la ingestión de ooquistes, bradizoitos o taquizoitos, la infección entérica tiende hacia los nódulos linfáticos regionales, y desde aquí por vía de la circulación portal hacia el hígado o bien por vía del conducto torácico hacia los pulmones. Subsecuentemente, un número variable de organismos se diseminan sistemáticamente hacia otros tejidos. Durante la infección aguda T. gondii puede ser aislado de la sangre, frecuentemente en cantidades altas, pero en infecciones crónicas la parasitemia es esporádica y los números son bajos (Dubey, 1984; Soulsby, 1982).

En las infecciones agudas la vía de infección es el tracto intestinal. Los organismos se diseminan por vía linfática y sanguínea con la subsecuente invasión de varios organismos a diferentes tejidos. La multiplicación del parásito en su forma de taquizoito produce áreas de necrosis, durante el apogeo de esta fase, los organismos pueden aparecer en secreciones y excreciones como la orina, las heces, la leche, el fluido conjuntival y quizá en la saliva, aunque esto es raro. La forma subaguda de la enfermedad se caracteriza por la aparición de anticuerpos que eliminan la

sangre y demás tejidos de los taquizoitos (Soulsby, 1982).

La formación de quistes usualmente coincide con el desarrollo de la inmunidad, si esta inmunidad se ve menguada, los bradizoitos son capaces de iniciar una nueva proliferación de taquizoitos, y quistes adicionales conteniendo bradizoitos se forman a partir de los taquizoitos si la inmunidad retorna (Soulsby, 1982).

Los factores celulares juegan el papel más importante en la resistencia a la reinfección. La inmunidad de linfocitos de animales infectados con toxoplasma, puede activar macrófagos, los cuales pueden intensificar su capacidad de destruir al parásito. Existen varios estudios que indican que si bien la inmunidad humoral controla, hasta cierto punto el inicio de la infección aguda, es la respuesta celular la que desempeña el principal papel en la infección causada por T. gondii (Isita et al., 1984; Soulsby, 1982).

Una característica del toxoplasma es su habilidad para sobrevivir en los macrófagos, además de ser capaz de inducir la fagocitosis en células no ordinariamente fagocíticas, pero también puede inhibir la liberación de constituyentes lisosomales dentro de la vacuola fagocítica en la cual los organismos viven (Soulsby, 1982).

Se menciona un factor inhibidor (IF), una linfocina, la cual es liberada por linfocitos inmunes después de la interacción con el antígeno de toxoplasma. El IF interactúa con una glicoproteína en la superficie del macrófago. El AMPc se eleva y el GMP disminuye, ocurre síntesis de proteínas que resulta en la inhibición de la multiplicación de T. gondii (Soulsby, 1982).

## Virulencia

Se ha señalado variación en la virulencia entre cepas de este organismo. De hecho el criterio para diferenciar cepas es por virulencia y las características de la enfermedad producida, cuando éstos son inyectados a animales de laboratorio. Con cepas de baja virulencia, en general -- ocurre una parasitemia baja, menor invasión tisular y corta persistencia del parásito. Los organismos aislados de animales que tuvieron la enfermedad o murieron de la infección, -- son usualmente más virulentos que otros obtenidos de un animal que no mostró evidencia clínica de la enfermedad. La mayoría de las infecciones son avirulentas o de carácter subclínico (Soulsby, 1982).

## Cuadro Clínico

La toxoplasmosis ovina se presenta de la siguiente manera:

- a) Forma adquirida
- b) Forma congénita

a) La forma adquirida presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, variando desde una linfadenopatía subclínica, hasta una neumonía fatal. Las variantes clínicas están en relación con la virulencia de la cepa la capacidad inmunogénica del hospedador y la localización y extensión de la lesión.

b) La forma congénita es el resultado de una infección con T. gondii durante la preñez, dando paso a la presentación de diversos cuadros clínicos que varían según el tiempo de preñez durante el cual la hembra contrae la enfer-

medad y se transmite al producto (Beverley et al., 1971; -- Blewett et al., 1983; Dubey, 1981; Dubey et al., 1986; -- Huffman et al., 1981).

Los efectos clínicos de la toxoplasmosis ovina incluyen: muerte embrionaria temprana y reabsorción, -- muerte fetal y momificación, aborto, animales nacidos muertos, corderos nacidos débiles y muerte neonatal (Blewett et al., 1986; Soulsby, 1982; Uggla et al., 1987).

La infección durante el primer tercio de la -- preñez provoca muerte embrionaria y/o reabsorción del em--- brión con aparente infertilidad de la borrega, la infección entre los 60 y 120 días de la preñez causa muerte fetal y -- subsecuente aborto, en alguna instancia los fetos permanecen en útero y hay momificación, aunque pueden nacer vivos y sobrevivir por algunas semanas. La presencia de fetos muertos, abortos, animales nacidos muertos y muerte neonatal atribuidos a T. gondii, son considerados como una típica toxoplasmosis ovina clínica y son observados en grado sumo en borregas infectadas a la mitad de la preñez (entre 70 y 90 días). -- Los signos clínicos en brotes de campo, generalmente ocurren aproximadamente 3 semanas antes del comienzo normal del parto, sugiriendo que la infección natural puede adquirirse entre los 51 y 61 días antes del término, es decir, aproximadamente a los 90 días de gestación. Las borregas infectadas -- en preñez tardía (110 días o más) tienen usualmente corderos normales, aunque pueden tener infección congénita (Blewett -- et al., 1983; Dubey et al., 1986; Huffman et al., 1981).

El que un feto muera en el útero o sobreviva, depende de la competencia inmunológica al tiempo de la infección, el feto ovino desarrolla la capacidad de producir anti -- cuerpos después de los 60 - 70 días de gestación y una infec

ción adquirida antes de esto, comúnmente causa muerte embrionaria temprana y reabsorción y una oveja a la vista aparentemente improductiva (Blewett et al., 1983; Dubey et al., - - 1986).

Los corderos son los más susceptibles a la toxoplasmosis, aunque los signos clínicos son leves, y la multiplicación del toxoplasma no es extensivo, la mayor multiplicación ocurre en intestinos y nódulos linfáticos mesentéricos (Dubey, 1984; Jubb and Kennedy, 1973).

Los aspectos patológicos predominantes se localizan en la placenta con zonas multifocales de decoloración blanca de 3 mm. de diámetro aproximadamente, que son áreas necróticas microscópicamente visibles, algunas de ellas mineralizadas, se encuentran taquizoitos de toxoplasma en la placenta e infiltración de leucocitos en cotiledones - que macroscópicamente son convexos, firmes y rojo brillantes, las membranas fetales se tornan edematosas, engrosadas y con áreas de necrosis (Beverley et al., 1971; Dubey et al., - - 1981; Osborne, 1959; Smith, 1961; Soulsby, 1982).

El corazón presenta infiltración con células mononucleares y numerosos quistes de T. gondii se encuentran en el miocardio (Beverley et al., 1971; Dubey, 1981).

En el hígado y bazo se encuentran zonas de infiltración focal con células redondas, hay esplenomegalia y presencia de quistes (Beverley et al., 1961; Dubey, 1981).

En el feto los aspectos patológicos son: edema en tejidos subcutáneos y en los planos faciales, fluidos de las cavidades peritoneal y pleural impregnadas de sangre y nódulos linfáticos y bazo generalmente agrandado, mien-

tras que en el hígado hay infiltraciones focales al igual -- que en el corazón, el cerebro presenta lesiones focales más frecuentes en la materia gris, como son: infiltraciones celulares mononucleares, áreas de gliosis, hasta encefalomielit<sub>i</sub> tis no supurativa o encefalitis con necrosis y mineralización (Beverley et al., 1971; Dubey, 1981; Dubey et al., -- 1986).

### Diagnóstico

Diagnóstico Clínico.- La presencia de cuadros clínicos inespecíficos y la existencia de formas asintomáticas o inaparentes que, en un momento dado pueden dar origen a un cuadro -- agudo, constituyen un grave problema que hace muy difícil el diagnóstico clínico de la toxoplasmosis (Roch, 1971; Soulsby, 1982).

Diagnóstico de Laboratorio.- El diagnóstico de laboratorio de la toxoplasmosis se basa, como en la mayoría de las enfermedades, en dos tipos de métodos o técnicas (Calamel, 1982; Roch, 1971; Soulsby, 1982).

I Directas

II Indirectas

I Método Directo.- Este método consiste en lo siguiente:

- a) Observación de las formas de toxoplasma (trofozoito o -- quiste) con el microscopio ordinario, de fase y con el -- microscopio electrónico, en líquidos orgánicos normales como: heces, orina, leche, lágrimas, etc., y en productos patológicos: exudado conjuntival, bronquial, peritoneal, etc.
- b) Estudios de improntas, de biopsias y cortes histológicos,

de lesiones de órganos como son: músculos, cerebro, placenta, útero, corazón, etc., examinados por microscopio ordinario, de fluorescencia o en contraste de fases.

- c) Aislamiento del parásito por inoculación a animales de laboratorio usando diversas vías (intracerebral, intraperitoneal, etc.) (Roch, 1971).

II Método Indirecto.- Consiste en demostrar la existencia de anticuerpos específicos, contenidos en el suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, etc. (Roch, 1971).

Técnicas inmunológicas más importantes:

- a) Sabin Feldman (DT)
- b) Hemaglutinación indirecta
- c) Inmunofluorescencia indirecta
- d) Fijación de complemento

(Calamel 1982, Calderón et al 1985, Castro 1982, Chiari et al 1985 y Roch 1971).

Otras pruebas usadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis son:

- a) ELISA y sus variantes para anticuerpos
- b) Toxoplasmina
- c) Coaglutinación
- d) Reacción de aglutinación con partículas inertes sensibilizadas

(Calderón et al 1985, Mittal et al 1987 y Roch 1971).

### Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico diferencial de la toxoplasmo--

sis en los ovinos, tropieza con dos serios problemas: el -- morfológico y el clínico (Dubey et al 1980).

Para el diagnóstico morfológico hay que tomar en cuenta que existe un grupo de microorganismos (protozoa-- rios y hongos) muy semejantes al toxoplasma tanto en su forma de trofozoito como de quiste, que infectan al humano y -- otros animales. En los animales se consideran los géneros - Eimeria, Besnoita, Hexamita, Encephalitozoon, Globidium, Mi-- crotus, Fibrocistis, Sarcocystis, etc. (Dubey et al 1980).

En cuanto al diagnóstico, hay una serie de en fermedades que dan cuadros clínicos semejantes a la toxoplas-- mosis como son: brucelosis, listeriosis, leptospirosis, sal monelosis, chlamidiasis y vibriosis, entre otras (Beverley et al 1971, Dubey 1981 y Dubey et al 1987).

- a) Brucella spp: presenta además inflamación de articula-- ciones y cápsula sinovial, higroma y orquitis en machos, provoca placentitis que incluye las regiones intercotili-- dionarias, lesiones que no se ven en la toxoplasmosis -- (Blood and Henderson, 1982).
- b) Chlamydia psittaci: este agente también causa conjuntivitis, problemas respiratorios, artritis y aborto en - cualquier etapa de la gestación.
- c) Rickettsias: la enfermedad causada por este agente cur-- sa además con trastornos respiratorios.
- d) Salmonella spp: afecta a todo el hato, tanto adultos co mo jóvenes, los corderos presentan cuadro entérico. Hay aborto posterior al cuadro entérico en cualquier etapa - de la gestación.
- e) Campylobacter fetus intestinalis: en la enfermedad ocu-- rren abortos al final de la gestación, alto porcentaje -

de abortos aunado a un cuadro febril muy severo.

- f) Listeria monocytogenes: da cuadro de aborto o trastornos nerviosos.
- g) Leptospira spp: en este caso es muy importante considerar el cuadro clínico que se presenta en la madre y que el aborto ocurre en el último tercio de la gestación.
- h) Mycoplasma spp: existe la presentación de otros signos en esta enfermedad como agalactia, cuadro febril severo, conjuntivitis, artritis, problemas respiratorios y hay abortos al final de la gestación.
- i) Sarcocystis spp: es un parásito que causa abortos en varias especies animales, principalmente en bovinos, ovinos, caprinos y suinos.

Finalmente, algunas consideraciones diagnósticas que se deben tomar en cuenta son:

- 1.- Para el diagnóstico de la enfermedad, es conveniente se verifiquen dos o más pruebas diferentes con el mismo suero.
- 2.- Una reacción positiva indica infección mas no enfermedad.
- 3.- No importa el título de una reacción por débil que sea, siempre indica una infección toxoplásmica, que ha podido tener lugar en cualquier momento de la vida del ser y que aunque, en el momento actual, no presente un cuadro patológico manifiesto, en cualquier momento puede desarrollarlo.

- 4.- Una tasa de anticuerpos baja no permite eliminar el diagnóstico de enfermedad; un título alto no justifica un diagnóstico de toxoplasmosis.
- 5.- Los títulos altos, equiparables en dos pruebas diferentes verificados en el mismo suero, los podemos tomar como datos de certeza de toxoplasmosis.
- 6.- Un aumento de anticuerpos en el curso de una evolución clínica, está en favor de toxoplasmosis (Roch 1971).

### Tratamiento

Considerando que la toxoplasmosis ovina clínica, generalmente sólo ocurre cuando una oveja susceptible experimenta su primera infección durante la preñez, que generalmente las infecciones inaparentes son la regla, que es una enfermedad que ocurre en varios animales del hato, y que los costos de los fármacos son altos, no existe un tratamiento satisfactorio contra la toxoplasmosis ovina (Blewett et al 1983, Dubey et al 1981, McCulloch et al 1964).

Más aún, no se conoce una droga o método terapéutico que actúe eficazmente como antiparasitario en todas las fases evolutivas del toxoplasma: hay productos químicos, biológicos, solos o asociados, que tienen acción sobre las formas libres extracelulares y poca o ninguna sobre las formas quísticas (Roch 1971).

Por tratarse de un protozoario, se han probado en la toxoplasmosis todas las drogas utilizadas en estas parasitosis, y la única que tiene acción contra el Toxoplasma es la pirimetamina, un antipalúdico conocido con el nombre de Daraprim. La pirimetamina tiene mayor acción sobre -

las formas libres proliferativas y de reproducción rápida, - que sobre las cepas poco virulentas o de multiplicación lenta, y menos sobre las formas quísticas. El Daraprim es antagónico del ácido fólico y de los ácidos folínicos, interponiéndose entre el ácido p-aminobenzoico y el ácido fólico, e impidiendo así, que el toxoplasma pueda sintetizar las nucleoproteínas necesarias para su desarrollo, a través del -- ARN. Puede provocar trastornos de tipo hematológico: sobre la médula con repercusión sobre los glóbulos rojos, observándose anemia hipocrómica, macrocítica y megaloblástica, con disminución de hemoglobina. Las dosificaciones de 2 mg., -- por kg, de peso al día por vía oral (Del Muro 1982, Roch -- 1971 y Soulsby 1982).

La sulfamidoterapia también se usa en el tratamiento de la toxoplasmosis.

Experimentalmente Frenkel (1973) encontró una reducción de oocistos infectantes de toxoplasma con la utilización de una combinación de sulfadiazina (120 mg/kg) y pirimetamina (1 mg/kg) mientras que Sheffield y Melton (1976) inhibieron la liberación de oocistos con una combinación intramuscular de sulfadiazina (100 mg/kg) y pirimetamina (2 -- mg/kg).

Los derivados de la pirimidina como la sulfadiazina, sulfameracina, sulfametacina, sulfatiazol, se recomiendan porque dichos productos tienen poder de difusión en el interior de las células; en cambio la sulfapiridina, sulfisoxazol, sulfadimetina, sulfafurasole, presentan difusión más lenta; son poco solubles en agua y su solubilidad aumenta con la alcalinidad. Ambas puede dar lugar a una anemia hemolítica con agranulocitosis y púrpura trombocitopénica. (Roch 1971).

Todos los antibióticos conocidos han sido ensayados experimentalmente en animales en padecimientos causados por el toxoplasma, los que han dado buen resultado son: la tetraciclina, el cloranfenicol y la espiramicina (Roch -- 1971).

La tetraciclina tiene un efecto similar al -- sulfatiazol, según estudios realizados aminora algunos siglos, pero no destruye los quistes y, en ocasiones, las reacciones serológicas se tornan negativas por algún tiempo después del tratamiento, volviendo a hacerse positivas a los 2 ó 3 meses, y con frecuencia predispone a reincidencias (Roch 1971).

La espiramicina tiene una gran afinidad tisular, encontrándose altas concentraciones en los tejidos pulmonar, hepático, esplénico y renal. Tiene una acción indiscutible en la toxoplasmosis experimental del ratón y del conejo, cuando se administra por inyección subcutánea a razón de 200 mg/kg por día, y siempre que se aplique el mismo día de la inoculación (Roch, 1971).

Todos los tratamientos mencionados anteriormente son aplicables solamente al humano debido a las razones ya mencionadas.

### Control

Es difícil debido a la presencia constante -- del hospedador definitivo (OPS, 1980) y a la dificultad de -- diferenciar la enfermedad de otras enfermedades que dan cuadros similares y que son aparentemente más comunes.

En los casos de infección congénita, se debe determinar la presencia de anticuerpos en la hembra mientras que en los casos de infección adquirida debe investigarse si

el animal estuvo en contacto con animales infectados de la misma y otras especies.

Algunos puntos que se pueden considerar para el control de la enfermedad son:

- 1.- El uso de amoniaco como desinfectante para áreas en donde el gato defeque accidentalmente.
- 2.- Hacer el muestreo de animales sospechosos, con eliminación de animales positivos.
- 3.- Las hembras que abortan o expulsan fetos muertos deben considerarse como posibles portadoras y sacrificarse.
- 4.- Los cadáveres de animales infectados y sospechosos deberán destruirse totalmente, o por lo menos hacerse inaccesibles a los carnívoros.
- 5.- Eliminación completa de grupos de animales en los que surge la enfermedad.
- 6.- Alimentar a los gatos en el hogar con alimentos cocidos y evitar que se vayan de caza.
- 7.- Diagnóstico periódico coprológico y serológico a los gatos de la granja y tratamiento (Blood and Henderson, -- 1982 y Dubey, 1980).

### Prevención

No hay medidas de prevención efectivas contra Toxoplasma gondii en los ovinos, ya que por las características del medio en el que se encuentra a esta especie es difícil de aplicarlas (Dubey et al., 1981).

Se ha experimentado la utilización de una va-

cuna inactivada en la prevención del aborto ovino debido a toxoplasmosis, pero no se ha podido prevenir la infección fetal o placentaria (Beverley et al 1971).

### Salud Pública

Los mecanismos de infección del humano son -- principalmente la contaminación de alimentos con ooquistes -- provenientes de las heces fecales del gato, y la ingestión -- de carne infectada con quistes de Toxoplasma gondii que no -- recibe un buen cocimiento (Aganga et al 1981 y Dubey 1980).

La patogenia en el humano es similar a los -- animales.

Se conocen dos formas clínicas de toxoplasmosis humana:

- a) Forma adquirida
- b) Forma congénita

#### Cuadros Clínicos de Toxoplasmosis:

ADQUIRIDA	{ Cuadros agudos con síntomas neurológicos  Cuadros agudos con síntomas viscerales }	{ Encefalitis  Neumonía Exantema Enteritis }

## CONGENITA

Cuadros agudos y crónicos  
con síntomas neurológicos

Encefalitis  
Hidrocefalia  
Convulsiones  
Coriorretinitis  
Calcificaciones  
cerebrales  
Microcefalia  
Anencefalia  
Microftalmia

Cuadros agudos con lesio-  
nes y síntomas viscerales

Neumonía  
Miocarditis  
Hepatomegalia  
Esplenomegalia  
Ictericia

## OBJETIVOS

Determinar la presencia de anticuerpos contra T. gondii por medio de la técnica de hemaglutinación indirecta y coaglutinación en ovinos en Huehuetoca, México.

Analizar y describir algunos factores que - - afecten la presencia de la toxoplasmosis ovina en los animales de Huehuetoca, México, como edad, sexo, períodos pre y - postparto, número de partos y presencia de otras especies.

Relacionar los niveles de anticuerpos con los factores mencionados anteriormente.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Localización de las explotaciones

Este trabajo se realizó después de establecer contacto con pequeños propietarios de ganado ovino, de los cuales se seleccionaron cuatro de ellos, que tenían antecedentes de aborto e infertilidad. Estos rebaños estuvieron en contacto con el hospedero definitivo (gato), así como con los intermediarios (bovino, equino y perro).

También se muestreó una industria paramunicipal (FOMEC), la cual cuenta con un número mayor de animales, con antecedentes de aborto e infertilidad y se encontraban en contacto con el hospedero definitivo.

Dichas explotaciones se encuentran localizadas a la altura del kilómetro 48 de la autopista México-Querétaro en las comunidades de: Puente Grande, Jorobas, Salitrillo y la cabecera municipal de Huehuetoca, México.

### 2. Animales

De los 900 ovinos que se encontraban en las explotaciones, 520 eran de la raza Suffolk y 380 eran criollos, sólo se muestrearon 249 hembras y 20 sementales, cuyas edades variaron entre 1 y los 4 años.

La función zootécnica de las explotaciones de los pequeños propietarios es destinada principalmente al consumo de carne, mientras que la explotación estatal es la producción de pie de cría.

La alimentación de las explotaciones pequeñas varía desde rastrojos, maíz y pastos nativos hasta en algunos casos un poco de concentrado, en tanto en la explotación estatal los animales son alimentados a base de concentrados y alfalfa.

Las instalaciones son rústicas sin ninguna -- planificación, hechas a base de piedra, alambre y madera en el caso de los pequeños rebaños, en el rebaño municipal --- (FOMEC) sus instalaciones están mejor planificadas y más tec-- nificadas, cuentan con corrales individuales, corrales para hembras por edades, corrales para machos, baño de inmersión y está cercada en su totalidad.

### 3. Diseño experimental

Para el diagnóstico de Toxoplasma gondii el - número de muestras fue de 420 tomando en cuenta los siguien-- tes criterios: hembras preparto, hembras postparto, número de partos y hembras con problemas reproductivos, las mues--- tras fueron tomadas uno o dos días antes del parto y uno o - dos días después del mismo. Se tomaron 249 muestras antes - del parto y postparto 150 muestras, también se muestrearon - 20 sementales trabajando.

### 4. Muestreo

La obtención de la muestra sanguínea se reali-- zó por venopunción en la yugular utilizando agujas y tubos - al vacío tipo vacutainer sin anticoagulante, se obtuvieron - aproximadamente 5 ml de sangre por animal, los cuales esta-- ban marcados e identificados.

Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente para favorecer su coagulación durante el transcurso al laboratorio de Parasitología Veterinaria F.E.S. - Cuautitlán.

### 5. Laboratorio

Una vez en el laboratorio las muestras fueron colocadas en baño maría a 30°C hasta observar la separación completa de suero, posteriormente se centrifugaron a 2000 --rpm durante 10 minutos obteniendo el suero y posteriormente volviéndolas a centrifugar durante el mismo tiempo las mismas revoluciones, el suero se guarda en frascos perfectamente sellados y rotulados sometiéndolos a congelación (-4°C).

Se obtuvo antígeno a partir de ratones infectados con toxoplasma humano (Roch, 1971).

Para la obtención de controles positivos se hiperinmunizaron cinco conejos en dicha prueba deben conjungarse diversos factores para lograr el resultado deseado. Entre dichos factores se encuentra la calidad del antígeno, su forma física y grado de contaminación con otros componentes, el esquema de inmunización, el uso de adyuvantes, la especie animal y en ocasiones en que sólo se dispone de un solo animal su capacidad de respuesta inmune, entre otros. Por otro lado, en la preparación de antisueros debe decidirse --contra qué componente del antígeno es deseable obtener el anticuerpo.

Una vez obtenidas las muestras sanguíneas de los conejos hiperinmunizados se procedió a correr la prueba de inmunodifusión radiada para cuantificar el nivel de anticuerpos. Esta técnica consiste en incorporar el anticuerpo específico en el agar y colocar el antígeno en pozos horada-

dos en la misma placa. El antígeno se difunde en forma radial dentro del antisuero teniendo en cuenta las diluciones del anticuerpo (Morilla, 1986).

Al encontrar la dilución óptima de antígeno - para controles positivos se le determinó la proteína al antígeno por medio de la prueba de Folin-Ciocalten, la cual consiste en determinar proteína por medios colorimétricos, midiendo el color azul que se produce al agregar el reactivo - fenol de Folin-Ciocalten a una solución alcalina de aquellas. La intensidad del color depende de su cantidad de tirosina y triptofano (Kabat, 1968).

Para el diagnóstico se corrió la prueba de -- hemaglutinación indirecta, en la que se adsorbe antígeno soluble a una partícula grande e insoluble y es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpo 0.02 a 0.04  $\mu\text{g}$  de proteína de anticuerpo (Boyden, 1951).

Se utilizó también una prueba relativamente nueva para el diagnóstico de toxoplasmosis, la CoAglutinación, la cual utiliza al Staphylococcus aureus cepa HG14 que produce una alta concentración de proteína A y se produjeron antisueros en conejos, fueron usados los reactivos de CoAglutinación. Un destilado de CoAglutinación mezclado en un vidrio resbalado con igual volumen de suspensión de bacterias. La reacción de la CoAglutinación se lee en 4 minutos con un promedio de 0 a 4 dependiendo de la rapidez y de la intensidad de la reacción. (Mittal et al., 1987).

Los procedimientos en las distintas técnicas y pruebas se encuentran detallados en el Anexo.

## RESULTADOS

Para conocer el estado serológico de anticuerpos contra T. gondii, y además tratar de conocer algunos factores (edad, número de partos, período pre y postparto) que pueden hacer variar dicho estado serológico, se emplearon -- dos técnicas serológicas, la hemaglutinación indirecta y la coaglutinación, mismas que al final con los resultados obtenidos se compararon entre sí.

Los resultados obtenidos en la detección serológica de la de T. gondii fueron los siguientes:

Con la prueba de hemaglutinación indirecta, -- se obtuvo un total positivo de 1.21%, un porcentaje de reactivos sospechosos de 6.75%, y un total negativo de 91.8%. -- Más del 90% de las ovejas cuyo título resultó positivo o sospechoso, fueron animales de 3 o más años de edad. En el título serológico según la edad de los animales sí se observó variación estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) resultando que a mayor edad, mayor aumento de títulos serológicos. (Cuadro 1).

En los resultados serológicos obtenidos en un mismo grupo de borregas antes y después del parto, se encontró que no hubo una variación significativa ( $P < 0.05$ ) entre ambas tasas serológicas en ambos períodos. El título serológico según el número de partos del animal no mostró variación significativa ( $P < 0.05$ ). Cuadro 2.

Los títulos serológicos de los sementales estuvieron en su totalidad dentro del rango de negativos.

La presencia de otros hospederos intermedios no influyó en la variación del estado serológico a toxoplasma de las ovejas

La presencia del hospedero definitivo no contribuyó en la variación del estado serológico a toxoplasma de las ovejas.

Los títulos serológicos obtenidos en la industria paramunicipal (FOMECA) fueron significativamente más elevados que en los rebaños de los pequeños propietarios.

Mientras que en el prueba de hemaglutinación indirecta el título serológico obtenido en el conejo hiperinmunizado fue de 1/256, en la prueba de Coaglutinación fue de 1/8.

El mayor título de anticuerpos hallado en los animales muestreados usando la prueba de hemaglutinación indirecta fue de 1/64 mientras que el mayor título obtenido en la prueba de coaglutinación fue de 1/4.

La correlación entre ambas pruebas fue de ---  
 $r = 0.44$ .

Cuadro 1. Títulos obtenidos en la prueba de HAI a Toxoplasma en función de la edad de las ovejas

Edad <sup>1</sup>	Dilución No. de muestras	Negativas <sup>2</sup>					Sospechosos <sup>3</sup>			Positivos <sup>4</sup>		Total	
		1/2	1/4	1/8	%	1/16	1/32	%	1/64	%		%	
2	57	41	14	1	1	13.9	0	0	0	0	0	57	13.9
4	100	30	51	9	7	23.6	2	0	0.4	1	0.2	100	24.3
6	187	46	52	46	17	39.2	16	6	5.3	4	0.9	187	45.4
8 ó +	66	16	27	13	6	15.1	3	1	0.9	0	0	66	16.0
%					91.9			6.8			1.2		
Total	410	133	144	69	31	91.8	21	7	6.7	5	1.2	410	99.7

<sup>1</sup> La edad está dada por las piezas dentales, 2 dientes es aproximadamente 1 año, 4, 2 años y así consecutivamente.

<sup>2</sup> Según Huffman et al 1981

<sup>3</sup> Según Hunter et al 1990

<sup>4</sup> Según Aganga et al 1981 y Huffman et al 1981

Cuadro 2. Resultados obtenidos en la prueba de hemaglutinación indirecta en un grupo de ovejas antes y después del parto en función a la edad de los animales.

Antes parto Edad <sup>1</sup>	Dilución No. de Muestras	Negativas			Sospechosas		+	%	Total
		-	1/2	1/4	1/8	1/16			
2		18	9	1	0	0	0	17	28
4		23	23	1	1	2	0	30.3	50
6		21	22	11	3	6	1	38.7	64
8 ó +		7	12	2	1	1	0	13.9	23
‡			93.9					0	99.9
Total		69	66	15	5	9	1	0	165

<sup>1</sup> La edad está dada por las piezas dentales, 2 dientes es aproximadamente 1 año, 4, 2 años y así consecutivamente.

Post parto Edad <sup>1</sup>	Dilución No. de Muestras	Negativas			Sospechosas		+	%	Total	
		-	1/2	1/4	1/8	1/16				1/32
2		22	5	0	1	0	0	0	18.4	28
4		13	26	4	2	0	0	0	25.6	39
6		17	21	14	4	5	2	0	41.4	63
8 ó +		10	8	2	1	0	1	0	14.5	22
‡			94.7			5.2		0	99.9	
Total		62	54	20	8	5	3	0	152	

Cuadro J. Resultados obtenidos en la prueba de Coaglutinación a Toxoplasma en función de la edad.

Edad <sup>1</sup>	Dilución No. de Muestras	-	1/2	1/4	1/8	1/16	%	Total
2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6	4	2	0	0	0	4.7	6
6	95	43	45	7	0	0	75.4	95
8 ó +	25	18	6	1	0	0	19.8	25
Total	126	65	53	8	0	0	99.9	126

<sup>1</sup> La edad está dada por las piezas dentales, 2 dientes es aproximadamente 1 año, 4, 2 años y así consecutivamente.

## DISCUSION

Los datos obtenidos para la detección de anticuerpos contra T. gondii en el Municipio de Huehuetoca, México se discuten a continuación.

Para la detección de anticuerpos contra T. gondii se empleó la técnica de hemaglutinación indirecta, la cual ha sido utilizada en diversos trabajos en ovinos (Aganga et al 1981; Huffman et al 1981; Hunter et al 1980).

Aunque si bien el número de positivos obtenidos en la prueba de hemaglutinación indirecta fue de 1.21%, y la de sospechosos de 6.82%, mientras que la de negativos fue de 91.9% hay que tener en cuenta que la prueba tiene algunas limitantes para el diagnóstico de infección aguda adquirida y que los títulos pueden variar en infección crónica (Calderón y León, 1985).

Hay que considerar que no importa el título de una reacción por débil que sea casi siempre indica una infección toxoplásmica, que ha podido tener lugar en cualquier momento de la vida y que aunque, en un momento actual no presente cuadro patológico manifiesto, en cualquier momento puede desarrollarse (Roch, 1971).

Adicionalmente muchas borregas muestran fluctuaciones en su título sugiriendo una posible reactivación de una infección latente (Hartley et al 1968).

Si bien la tasa de anticuerpos fue baja, no se puede eliminar el diagnóstico de la enfermedad.

El resultado estadístico obtenido por varios autores (Blewett, 1983; Ganley et al 1980; Medeiros, 1985) de que el título serológico tiende a aumentar según la edad de los animales se corroboró con el presente trabajo.

Por otra parte, el no haberse encontrado variación serológica a toxoplasma por la presencia tanto del hospedador definitivo como de hospedadores intermediarios, corrobora los resultados de varios autores que han trabajado sobre el tema, aunque hay que considerar que algunos otros autores si han encontrado una relación positiva (Canlew et al., 1980), y que esto sería tema de futuros trabajos, para tratar de conocer si existe o no alguna relación.

Se utilizó también una prueba relativamente nueva para el diagnóstico de toxoplasmosis, la coaglutinación, aunque resultó ser menos sensible que la prueba de hemaglutinación indirecta, siendo la correlación entre ambas pruebas al final baja ( $r = 0.44$ ).

De cualquier forma no se puede descartar la utilización de la prueba de coaglutinación para la detección de anticuerpos contra T. gondii ya sea en ovinos u otras especies, puesto que su sensibilidad resultó ser menor, hay que tener en cuenta que es una prueba que no se ha usado para el diagnóstico de toxoplasma, y que no hay un esquema o procedimiento tan detallado como lo hay para la prueba de hemaglutinación indirecta, y que sería necesario afinar poco a poco el procedimiento para saber con certeza el valor diagnóstico de esta prueba.

Hay que notar que al igual que la prueba de hemaglutinación indirecta presenta limitantes, también la prueba de coaglutinación para el diagnóstico de toxoplasmo-

sis en ovinos las tiene, puesto que la proteína A del Staphylococcus aureus fija únicamente a la IgG<sub>2</sub> del borrego y ocasionalmente a la IgG; cuando ya se han formado complejos antígeno anticuerpo.

## CONCLUSIONES

- 1.- Hubo un 1.21% de animales que reaccionaron positivamente a T. gondii y un 6.82% que se incluyeron dentro del grupo de los animales sospechosos.
- 2.- Se observó que a mayor edad de los animales, mayor título serológico de anticuerpos.
- 3.- Algunos factores, como son: hospederos intermediarios, hospedero definitivo, número de partos, período preparto y período postparto no influyen estadísticamente en la variación del estado serológico a toxoplasma de las ovejas.
- 4.- Se piensa que la toxoplasmosis es importante como causante de pérdidas reproductivas en ovinos, aunque es necesario profundizar en el estudio de esta parasitosis en los ovinos de México.
- 5.- Se aconseja ahondar en el estudio de pruebas diagnósticas prácticas y confiables para el diagnóstico de la toxoplasmosis.
- 6.- Se considera conveniente investigar más a fondo en el estudio de las diversas causas de pérdidas reproductivas de los ovinos en México.
- 7.- Se deben hacer más trabajos para tomar en cuenta la técnica de coagulación como una prueba de diagnóstico confiable para toxoplasma.

## ANEXO

Método de Hiperinmunización

Se debe tomar el tiempo en que se sangra el animal para obtener el suero. Los anticuerpos tempranos obtenidos entre 2 y 3 semanas después de la inmunización, aunque en ocasiones tienen títulos bajos, tienden a cruzar con otros antígenos; en cambio los antisueros obtenidos tardíamente, por ejemplo cuando se inmuniza repetidamente durante uno y dos meses y el animal se sangra al tercer mes, pueden tener títulos de anticuerpos elevados, pero tienden a cruzar con otros antígenos (Morilla, 1986).

Esto es particularmente importante en caso de bacterias, parásitos, u otros microorganismos que poseen antígenos superficiales ligeramente diferentes entre especies y que pueden ser reconocidos por anticuerpos tempranos, pero cuando se usan los tardíos entonces esto no reconoce la diferencia. En los casos de anticuerpos de algunos antígenos solubles como toxina tetánica en que sólo se desea obtener niveles elevados de anticuerpos, entonces se inmuniza a los animales por períodos largos (Morilla, 1986).

Para ser inmunogénicos a los antígenos y obtener títulos elevados de anticuerpos, es recomendable la utilización de adyuvante compuesto que generalmente se agrega al antígeno haciéndolo más inmunogénico e induce la respuesta inflamatoria que atrae células inmunocompetentes que procesan adecuadamente al antígeno, y dependiendo del adyuvante, estimulan a las células para liberar factores que activan la respuesta inmune. Como es el caso de adyuvante oleoso.

Uno de los adyuvantes más usados, el adyuvante incompleto de Freund (FIA) que es aceite mineral con un emulsificante para que los antígenos que se encuentren en fase acuosa se integren a fase oleosa. Una mejor respuesta se obtiene con este adyuvante cuando se le añaden bacterias muertas denominándose entonces (FAC). También se usa como adyuvante el gel hidróxido de aluminio que estimula la respuesta inmune en grado menor que los adyuvantes oleosos pero es relativamente inocuo y no provoca inflamación (Morilla, 1986).

#### a) Procedimiento

- 1.- Día 1. Inoculación intranodular en ambos brazos de un ml. de gel hidróxido de aluminio.
- 2.- Día 7. Inoculación de antígeno-hidróxido de aluminio - 0.5 ml. de cada uno intranodularmente en ambos brazos.
- 3.- Día 15. Inoculación de antígeno-hidróxido de aluminio 0.5 ml. de cada uno intranodularmente en ambos brazos.
- 4.- Día 21. Inoculación de antígeno-hidróxido de aluminio 0.5 ml. de cada uno intranodularmente en ambos brazos.
- 5.- Día 28. Sangrado total del conejo y obtención del suero congelándolo a  $-4^{\circ}\text{C}$  (Morilla, 1986).

### Inmunodifusión Radial

Con el objeto de cuantificar antígenos adecuadamente, en 1965 Mancini introdujo la técnica de inmunodifusión radial, utilizando la difusión simple. Este método consiste en incorporar el anticuerpo específico en el agar y colocar el antígeno en pozos horadados en la misma placa. El antígeno se difunde en forma radial dentro del anticuerpo gelificado dando lugar a la formación de un anillo de precipitación. Conforme se difunde el antígeno, el halo de precipitación se disuelve en un exceso de antígeno y vuelve a aparecer a mayor distancia del pozo. El diámetro del anillo de precipitación continúa creciendo hasta que las concentraciones de antígeno y anticuerpo se encuentran en equilibrio (Morilla, 1986).

Existe una relación cuantitativa entre la concentración de antígeno y el resultante anillo de precipitación. En el método descrito por Mancini, el área circunscrita por el anillo de precipitación es proporcional a la concentración del antígeno; éste es el método de tiempo indefinido y requiere que los anillos de precipitación alcancen el máximo tamaño posible, lo que puede ocurrir a los dos o a veces a los cinco días de difusión. Alternativamente existe el método de tiempo limitado, que permite la medición del halo antes de su desarrollo completo (Morilla, 1986, Tizard, 1979).

La sensibilidad de este método es de 1 a 3 --  
ug/ml de antígeno. Para lograr mayor sensibilidad, una vez obtenidos los anillos de precipitación, es posible efectuar

autoradiografías que también pueden ser medidas (Morilla, 1986).

Mediante esta técnica es posible cuantificar también los anticuerpos, incorporando el antígeno en el agar y colocando los anticuerpos en los pozos (Morilla, 1986).

La técnica de inmunodifusión radial es utilizada en la cuantificación de antígeno soluble y tienen gran valor en la cuantificación de inmunoglobulinas en el suero. Su desarrollo no requiere de equipo costoso, además de que es un método fácil de implementar en el laboratorio (Morilla, 1986).

#### a) Procedimiento

- 1.- Colocar 0.2 g de agar noble en un matraz de 50 ml. Añadir 10 ml., de SSAF. Fundir el agar noble al 2% en una platina caliente. Añadir 0.2 ml., de azida de sodio 0.1 M, para tener una concentración del 2%. Mantener el matraz en un baño de agua a 56°C en el cual se coloca también una pipeta serológica y 3 tubos.
- 2.- Preparar diluciones de antisuero (1:20, 1:40 y 1:80) en SSAF en un volumen total de 4 ml. Dejar en el tubo correspondiente la pipeta usada para cada dilución. Colocar los tubos con diluciones en el baño a 56°C.
- 3.- Cuando los reactivos estén a 56°C, pipetear 2 ml., de agar fundido en cada uno de los 3 tubos calentados previamente, utilizando la pipeta precalentada.
- 4.- Añadir 2 ml., de cada dilución de antisuero a los 2 ml., de agar fundido; mezclar, evitando la formación de bur

- bujas. Dejar la mezcla agar-antisuero en el baño de agua a 56°C con la pipeta usada para cada dilución.
- 5.- Colocar los portaobjetos en una superficie plana (utilizar un nivel). Añadir a cada laminilla 3 ml., de la mezcla antisuero-agar.
  - 6.- Dejar solidificar. Colocar la laminilla sobre un patrón, marcar los pozos y eliminar el agar por medio de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
  - 7.- Hacer diluciones dobles del antígeno en SSAF.
  - 8.- Con cada dilución, llenar los pozos usando una pipeta Pasteur. Para determinaciones cuantitativas se puede usar una microjeringa.
  - 9.- Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente.
  - 10.- Revisar durante 5 días. Medir el diámetro del anillo de precipitación a las 24 y 48 horas y a los 5 días de incubación (Morilla, 1986).

### Determinación de Proteína con el Reactivo de Fenol de - Folin-Ciocalten

Las proteínas pueden determinarse por medios colorimétricos midiendo el color azul que se produce al agregar el reactivo de fenol de Folin-Ciocalten a una solución alcalina de aquellas. La intensidad del color depende de su contenido de tirosina y triptofano, pero otros factores también influyen, como el tiempo que la proteína está expuesta al álcali antes de agregar el reactivo de fenol, y la presencia de SH u otros grupos reductores. El análisis se lleva a cabo directamente en una solución de proteína sin limitación previa. Sin embargo, la utilidad del método es limitada, -- porque se analizan solamente las proteínas solubles, y porque el valor de la coloración dada por las diferentes proteínas varía mucho y sólo es posible obtener resultados adecuados con proteínas simples, bien definidas (Kabat, 1968).

#### a) Procedimiento

Se miden 9.0 ml. de una muestra en duplicado, en tubos de centrifuga, de boca ancha, de 50 ml., o en un pequeño matraz Erlenmeyer. Lentamente se agregan 5.0 ml., de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%, mezclando con agitación constante. Se añade 1 ml., del reactivo de Folin gota a gota, agitando con energía. Se coloca en un baño maría a  $37^\circ\text{C}$  durante cinco minutos. Se deja reposar a la temperatura ambiente durante 30 minutos y se lee a 7,500 A. con un blanco de reactivo que -- contenga 9 ml., de agua en lugar de la muestra (Kabat, 1968)

### Prueba de Hemaglutinación Indirecta o Pasiva

en base a que las pruebas de aglutinación para detectar anticuerpos son muy sensibles, es algunas veces deseable convertir los sistemas de precipitación en sistemas de aglutinación. A esto se le llama aglutinación pasiva y consiste en adsorber antígenos solubles a una partícula grande e insoluble, como por ejemplo: poliestireno, latex, bentonita o eritrocitos. Cuando se utilizan glóbulos rojos, la técnica se denomina hemaglutinación pasiva o indirecta y es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos (de 0.02 a 0.04  $\mu$ g. de proteína de anticuerpo) (Boyden, 1951).

Al tratar los eritrocitos del carnero con una solución diluida de ácido tánico, adquieren la propiedad de adsorber proteínas sobre su superficie. De tal manera que dichos eritrocitos cubiertos con proteína son aglutinados en presencia de antisuero específico contra la proteína adsorbida. La ventaja principal de esta técnica es su sensibilidad, además de que se puede probar un gran número de sueros al utilizar métodos de microtitulación. En esta prueba se debe tener cuidado para controlar las reacciones inespecíficas, por lo cual es necesario utilizar los controles adecuados.

Los sueros a probar primero se descomplementan y luego se adsorben con un volumen igual de eritrocitos con objeto de eliminar anticuerpos heterófilos. Para obtener resultados reproducibles, la concentración de eritrocitos a sensibilizar con antígeno, debe estandarizarse, puesto que hay una relación inversa entre la concentración de células y el título de anticuerpos. El título de aglutinación -

se duplica cuando la concentración de células se disminuye a la mitad (Boyden, 1951, Kabat, 1968).

Para conocer el título de anticuerpos en suero, se efectúan diluciones seriadas de éste en un diluyente apropiado (suero normal de conejo, al 1% en PBS pH 7.2) y luego se añaden cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con antígeno específico. La dilución más alta de suero que provoque una clara aglutinación se considera como punto final de la reactividad y representa el título de anticuerpos del suero (Boyden, 1951).

Diluyente: Suero Normal de Conejo al 1%

Inactivar suero de conejo normal a 56°C por 30 minutos. Absorber con glóbulos rojos de carnero, (0.1 ml. de G.K. + 0.9 ml. de suero). El suero inactivado puede guardarse congelado y debe ser reactivado a 56°C por 10 minutos antes de ser usado (Boyden, 1951).

Mezcle 1 ml. de suero en 99 ml. de PBS, pH 7.2, si el diluyente reacciona con glóbulos rojos sensibilizados, se debe descartar y se utiliza otro suero de un conejo que no reaccione (Boyden, 1951).

Preparación de las Diluciones de Ácido Tánico, 1:1,000 y 1:20,000

Inmediatamente antes de usarse, prepare una solución fresca de una solución de 1:1,000 de ácido tánico, disolviendo 20 mg. de ácido tánico en 20 ml. de PBS, pH 7.2. Diluya la solución 1:1,000 a 1:20 para obtener la dilución 1:20,000 que se usa en la prueba (2.0 ml. de 1:1,000 + 38.0 ml. de PBS, pH 7.2). Si las células no tienen el efecto de tanizado o si hay una aglutinación espontánea, se deben pro-

bar diferentes concentraciones de ácido tánico para determinar la dilución óptima para el tanizado (Boyden, 1951).

#### a) Tanizado de Glóbulos Rojos

- 1.- Lavar los glóbulos rojos tres veces en PBS, pH 7.2 --- 800 x g x 5 minutos dos veces y por diez minutos una vez (Boyden, 1951, Kabat, 1968).
- 2.- Poner 1 ml. del paquete de glóbulos rojos en 39 ml. de PBS, pH 7.2 para obtener una suspensión al 2.5%.
- 3.- Añadir un volumen igual (40 ml.) de solución de ácido tánico 1:20,000; mezclar e incubar en un baño maría a 37°C por diez minutos (Boyden, 1951).
- 4.- Sacar los G.R. del baño maría y centrifugar por 5 minutos a 800 x g. Descartar el sobrenadante, lavar con PBS, pH 7.2, centrifugar a 800 x g x 10 minutos y resuspender los G.R. en PBS, pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5% (1 ml. de G.R. + 39 ml. de PBS).

#### b) Sensibilización de Glóbulos Rojos

- 1.- Sensibilizar los G.R. tanizados agregando un volumen igual de una dilución óptima de antígeno en PBS, pH 6.4 a la suspensión de células (Boyden, 1951).
- 2.- Incubar la mezcla en un baño maría a 37°C por 15 minutos. La dilución óptima debe ser predeterminada para cada lote de antígeno por medio de la titulación de éste con el antisuero conocido (Boyden, 1951).

- 3.- Centrifugar a 800 x g por cinco minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar las células dos veces con suero normal de conejo al 1% en PBS, pH 7.2.- la primera a 800 x g por cinco minutos y la última a 800 x g por diez minutos (Boyden, 1951).
- 4.- Ajustar los G.R. a una suspensión al 1.5% en suero normal de conejo al 1% (por ejemplo: .15 ml. del paquete de G.R. más 9.85 ml. de suero normal de conejo al 1%).

#### c) Determinación de la Concentración Óptima de Antígeno

- 1.- Preparar cuatro diluciones de antígeno PBS, pH 6.4, por ejemplo: 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 (Boyden, 1951).
- 2.- Sensibilizar los G.R.
- 3.- Utilizar un suero negativo y otro positivo por cada dilución. La dilución más baja de antígeno que da el mayor título con el suero inmune y no reaccione con el suero negativo es considerado como óptimo (Boyden, 1951).

#### d) Procedimiento de la Prueba

- 1.- Inactivar los sueros por 30 minutos a 56°C. Absorber los sueros con glóbulos rojos (0.1 ml. de G.R. más .9 ml. de suero e incubar por 30 min. a 37°C) (Kabat, 1968).
- 2.- En placas de microtitulación transfiera 0.05 ml. de suero normal de conejo al 1% con una pipeta a los hoyos en donde se vayan a hacer las diluciones (Kabat, 1968).

- 3.- Transfiera 0.05 ml. de suero que se vaya a probar con un microdilutor al primer hoyo que contenga 0.05 ml. de suero normal de conejo al 1% (Kabat, 1968).
- 4.- Mezcle y haga 12 diluciones de suero pasando 0.05 ml. a cada hoyo y elimine los 0.05 ml. del último hoyo.
- 5.- Mezcle las diluciones poniendo la placa en un vibrador. Con una pipeta agregue 0.025 ml. de la solución sensibilizada de G.R. al 1.5% a cada dilución de suero.
- 6.- Mezcle con el vibrador y deje la placa en reposo a temperatura ambiente por 2 a 3 horas (o incube a 4°C por 12 horas) (Kabat, 1968).
- 7.- Lea la placa por medio de los patrones en el fondo de los hoyos (Kabat, 1968).

#### e) Controles

- 1.- Control del diluyente: transfiera 0.05 ml. de suero normal de conejo al 1% a varios hoyos y agregue 0.025 ml. de los G.R. sensibilizados al 1.5%. Esta reacción debe ser negativa (Kabat, 1968).
- 2.- Control de suero: prepare una suspensión al 1.5% de glóbulos rojos tanizados no sensibilizados en suero normal de conejo al 1%. Prepare una placa por duplicado con diluciones seriadas del suero a ser probado, 6 hoyos de cada suero en vez de 12. A cada hoyo, añada 0.025 ml. de glóbulos rojos tanizados no sensibilizados al 1.5%. Se debe obtener una reacción negativa con cada suero; si el suero reacciona se debe absorber con glóbulos rojos (Kabat, 1968).

## Prueba de coagulación

### a) Obtención del antígeno Staphylococcus aureus

- 1.- A partir de un aislamiento de paciente del Hospital General se obtuvo la cepa Staphylococcus aureus HG-14 que es una cepa hiperproductora de proteína A, ya que el objetivo era obtener la mayor cantidad de proteína A.

Se hizo una resiembra de Staphylococcus aureus para obtener su purificación en un período de 15 horas en cajas de petri con medio de cultivo EHI en estufa bacteriológica; ya obtenido el crecimiento se realizó la -- tinción bacteriana para observar su estado de pureza y proseguir a su crecimiento.

Para el crecimiento bacteriano utilizamos caldo soya -- tripticasa disuelta en agua destilada en matraces Erlenmeyer de 500 ml (2) y esterilizados a 15 minutos 121 libras de presión y se dejó enfriar, se sacaron las cajas de petri y en forma estéril se le colocó PBS PH 7.2 para hacer un lavado bacteriano y depositarlo en el caldo soya tripticasa, se agitó lentamente y se colocó en el agitador orbital para su posterior crecimiento en un período de 15 a 18 horas.

### b) Inactivación y teñido de la cepa de Staphylococcus aureus

Pasadas las 15 horas de siembra de la bacteria se centrifuga dos veces y se lava con PBS 7.2, se resuspende a una concentración del 10% en PBS VAC, se deja a temperatura ambiente por 10 minutos y se lava dos veces con PBS 7.2, se ajusta a una concentración de 4.5% en PBS 7.2 y se mezcla con un volumen igual de formalina al 1%, se deja por 20 minu

tos a temperatura ambiente agitando ocasionalmente, se centrifuga retirando el sobrenadante, y se lava dos veces con PBS 7.2. Hasta aquí la bacteria está agitada e inactivada.

Para el teñido de la bacteria se pesa el paquete y se le agrega 22.5 ml por gramo de célula de una solución acuosa al 0.85% de cloruro de sodio y 0.05% de fenol -- (estéril). A esa suspensión se le agrega un ml de rosa de bengala por cada 35 ml de suspensión de bacteria, se deja en agitación por dos horas con mariposa estéril, posteriormente se filtra la solución con algodón estéril, se centrifuga y se desecha el sobrenadante, se pesa en paquete y se le agrega 2 ml de PBS 7.2 por gramo de célula y se deja en agitación orbital por 2 horas más. A esta suspensión se le agrega 14 ml más de PBS 7.2 y se agita con mariposa por 2 horas más, se filtra nuevamente con algodón estéril y se vuelve a agitar dos horas más con mariposa, después se saca una muestra por medio de centrifugación para ver el peso de bacteria en relación al diluyente y así saber la concentración. Finalmente se le agrega timerozal a una dilución de 1/10,000.

#### Procedimiento de la Técnica

- 1.- En placas de microtitulación transfiera 0.05 ml de albúmina sérica bovina con una pipeta a los hoyos en donde se vaya a hacer la dilución.
- 2.- Transfiera 0.05 ml de antígeno de Toxoplasma gondii al 1/20 con una pipeta a los hoyos en donde se vayan a hacer las diluciones.
- 3.- Transfiera 0.05 ml de suero que se vaya a probar con un microdilutor al primer hoyo.
- 4.- Mezcle y haga las diluciones de suero pasando 0.05 ml a

cada hoyo y elimine los 0.05 ml del último hoyo.

- 5.- Mezcle las diluciones poniendo la placa en un vibrador y deje a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 6.- Añada 0.05 ml de Staphylococcus aureus teñido al 1/20 a cada uno de los hoyos de la placa de microtitulación.
- 7.- Deje por 24 horas las placas de microtitulación en la estufa bacteriológica y proceda a la lectura.

**MATERIAL****Material usado en la toma de la muestra**

1. Material de cristalería  
400 tubos vacutainer
2. Soluciones  
Sol. Alsever o de Citrato de Sodio al 3.8%
3. Aparatos  
Baño María  
Centrífuga
4. Otros materiales  
400 tapones para tubos vacutainer  
400 agujas para vacutainer  
3 gradillas  
1 rollo de tela adhesiva o "masking tape"  
1 marcador para ganado  
2 bombilla de caucho

**Material utilizado en la prueba de hiperinmunización**

1. Material de cristalería  
1 vaso de precipitado
2. Reactivos  
Hidróxido de Aluminio (Melox)  
6 ml. de antígeno (toxoplasma)

3. Material biológico  
2 conejos
4. Otros materiales  
5 jeringas insulínicas

Material utilizado para la prueba de determinación de proteínas (Lowry)

1. Material de cristalería  
30 tubos de ensayo  
3 matraces Erlenmeyer  
3 pipetas de 5 ml.
2. Reactivos  
Reactivo de Folin-Ciocalten  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%  
Albumina bovina
3. Aparatos  
Potenciómetro
4. Otros materiales  
Baño María  
Gradilla

Material utilizado en la prueba de hemaglutinación indirecta

1. Material de cristalería  
Pipetas serológicas  
Matraces  
Vasos de precipitados  
Tubos de ensayo de 10 x 75 ml.  
Equipo de microtitulación:  
Pipetas de 0.05 ml. y 0.025 ml.

Microdilutores de 0.05 ml.

Placas U

Vibrador

2. Reactivos

Solución de Alsever o de Citrato de Sodio al 3.8%

Solución salina buferada (PBS pH 7.2 y pH 6.4)

Suero normal de conejo

Acido tánico

Antígeno

Suero positivo de título conocido y suero control negativo.

Eritrocitos de carnero o de humano tipo "O" (añejar las células cuando menos 3 días a 4°C antes de usarlas)

3. Aparatos

Centrífuga

Baño María

Tubos de centrífuga cónicos graduados de 12 ml.

Material utilizado en la obtención de la cepa de S. aureus

1. Material de cristalería

Matraces Erlenmeyer de 100 y 500 ml.

Pipetas

Vaso de precipitado

Cajas de petri

Portaobjetos

2. Reactivos

Caldo soya tripticasa

Medio de cultivo BHI

Agua destilada

Aceite de inmersión

Azul de metileno

Alcohol cetona

Lugol

Safranina

PBS PH 7.2

3. Aparatos

Agitador orbital

Estufa bacteriológica

Centrífuga

Autoclave

Microscopio compuesto

4. Otros materiales

Asa de platino

Mechero

Masking tape indicador

Material utilizado en la inactivación y teñido del S. aureus

1. Material de cristalería

Matraces Erlenmeyer

Pipetas

2. Reactivos

Cloruro de Sodio

Formalina al 1%

Fenol

PBS 7.2

PBS-VAT

Rosa de bengala

Timerozal

3. Aparatos

Agitador orbital

Agitador magnético

Balanza granataria

Centrífuga

4. Otros materiales

Algodón estéril

Material utilizado en la prueba de coagulación

1. Material de cristalería

Matraces Erlenmeyer

Pipetas

Tubos de ensaye

2. Reactivos

Antígeno de Toxoplasma gondii al 1/20

Staphylococcus aureus teñido al 1/20

Albúmina sérica bovina

3. Otros materiales

Equipo de microtitulación:

Pipetas de 0.05 ml y 0.25 ml

Microdilutores de 0.05 ml

Placas U

Vibrador

## REFERENCIAS

- 1.- Aganga, A. O., Belino, E. D., Adegboro, D. S., Ilemobade, A. A. 1981. A serological survey of toxoplasmosis in food animals (cattle sheep, goats and swine) in two northern states of Nigeria. *Int. J. Zoon.* 8:57-62.
- 2.- Arbiza S. A. 1984. Estudio actual de la ovinocultura en México, Perspectivas. *Memorias del curso Bases de la cría ovina Toluca, Méx.* 11-35.
- 3.- Beverley, J. K. A. and Watson W. A. 1961. Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. *Vet. Rec.* 73:6-10
- 4.- Beverley J. K. A., Archer, J. F., Watson, W. A., Fawcett A. R., 1971. Trial of killed vaccine in the prevention of ovine abortion due to toxoplasmosis. *Br. Vet. J.* 127:529-535.
- 5.- Beverley, J. K. A., Watson, W. A., Payne, J. M.. 1971. The pathology of the placenta in ovine abortion due to toxoplasmosis. *Vet. Rec.* 88:124-128.
- 6.- Beverley, J. K. A., Watson, W. A., Spence, J. B., 1971. The pathology of the foetus in ovine abortion due to toxoplasmosis. *Vet. Rec.* 88:174-178.
- 7.- Blewett, O. A. 1983. The epidemiology of ovine toxoplasmosis I. The interpretation of data for the prevalence of antibody in sheep and other host species. *Br. Vet. J.* 139:537-545.
- 8.- Blewett, D. A. and Watson, W. A., 1983. The epidemiology of ovine toxoplasmosis II. Possible sources of infection in outbreaks of clinical disease. *Br. Vet. J.* 139:546-555.

- 9.- Blewett, D. A. and Watson, W. A., 1984. The epidemiology of ovine toxoplasmosis III. Observations on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission. Br. Vet. J. 140:54-63.
- 10.- Blood, D. F. and Henderson, J. A., 1982. Medicina Veterinaria, Ed. Interamericana, 4a. edición, México, D. F. 522-540 y 790-792.
- 11.- Borchert, A., 1975. Parasitología Veterinaria, Editorial Acriba, 3a. edición, Zaragoza España. 656-663.
- 12.- Boyden, S. A., 1951. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein serum J, Exp. Med. 93:107-120.
- 13.- Buxton, D. and Finlayson J., 1986. Experimental infection of pregnant sheep with Toxoplasma gondii: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. J. Comp. Path. 96:319-333.
- 14.- Calamel, M., 1982. Epidemiologie de la toxoplasmose abortive chez les petits ruminants. Revue Med. Vet. - - 133:115-120.
- 15.- Calderón, E. J. y León, G. D., 1985. Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para diagnóstico de toxoplasmosis. Infectología 10:258-264.
- 16.- Canlew, J. P., and Comstack, G. W., 1980. Association of cats and toxoplasmosis. Am. J. Epidemiol 11:233-246.
- 17.- Castro, M. J. L., 1982. Detección de Toxoplasma gondii en semen de bovinos previamente inoculados en la Cuenca lechera de Cuautitlán. Edo. de México, Tesis de Licenciatura F. E. S. Cuautitlán.

- 18.- Coutinho, S. G., Leite, M. A., Amendoeira, M. R., Marzochi, M. C., 1982. Concomitant cases of acquired - - toxoplasmosis in children of a single family: evidence of reinfection. J. Infect. Dis. 146: 30-33.
- 19.- Chiari, C. A., Lima, J. D., Antunes, C. M. 1985 Reacoes de Imunofluorescencia indirecta e de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos Anti-Toxoplasma gondii em saros de caprinos. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 37: 121--129.
- 20.- Delgado, G. G. 1979. Toxoplasmosis y enfermedades mentales. Rev. Cub. Med. Trop. 31:127-131.
- 21.- Del Muro, R. D. 1982. Toxoplasmosis en humanos. Memorias del curso Zoonosis Parasitarias F.M.V.Z., U.N.A.M. 24-41.
- 22.- Díaz, O. J. y Vaca, M. N. 1985. Evaluación y epidemiología de la toxoplasmosis. Infectología. 5:146-152.
- 23.- Dubey, J. P. 1980. Persistence of encysted Toxoplasma gondii in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. JAVMA. 177:1203-1207.
- 24.- Dubey, J. P. 1981. Epizootic Toxoplasmosis associated with abortion in dairy goats in Montana. JAVMA. 178: 661-670.
- 25.- Dubey, J. P. 1981. Toxoplasma induced abortion in dairy goats. JAVMA. 178:671-674.

- 26.- Dubey, J. P. and Schmitz, J. A. 1981. Abortion associated with toxoplasmosis. JAVMA. 178:675-678.
- 27.- Dubey, J. P. 1984. Experimental toxoplasmosis in sheep fed Toxoplasma gondii oocysts. Int. Goat and sheep red. 2:93-104.
- 28.- Dubey, J. P. 1985. Serologic prevalence of toxoplasmosis in cattle, sheep, goats, pigs, bison and elk in Montana. JAVMA. 186:969-970.
- 29.- Dubey, J. P., Desmonts, G., Antunes, F., McDonald, C. 1985. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in experimentally infected pregnant goats and transplacentally infected kids. Am. J. Vet. Res. 46:1137-1140.
- 30.- Dubey, J. P. and Livingston, C. W. 1986. Sarcocystis capracanis and Toxoplasma gondii infections in range goats from Texas. Am. J. Vet. Res. 47:523-524.
- 31.- Dubey, J. P., Miller, S., Powell, E. C., Anderson, W. R. 1986. Epizooticologic investigations on a sheep farm with Toxoplasma gondii induced abortions. JAVMA. 189:155-158.
- 32.- Dubey, J. P. 1987. Toxoplasma gondii cysts in placentas of experimentally infected sheep. Am. J. Vet. Res. 48:352-353.
- 33.- Dubey, J. P., Hughes, H. P. A., Lillehoj, H. S., Gamble, P. P., Munday, E. L. 1987. Placental transfer of specific antibodies during ovine congenital toxoplasmosis. Am. J. Vet. Res. 48:474-476.

- 34.- Faust, C. E., Rusell, F. P., Rodney, C. J. 1974. Parasitología clínica, Ed. Salvat, 1a. edición. México, D. F. 230-231.
- 35.- Fletcher, S. 1965. Indirect fluorescent antibody technique in the serology of toxoplasma gondii. J. Clin. Path. 18:193-199.
- 36.- Frenkel, J. K. 1973. Toxoplasmosis parasite life cycle, pathology and immunology in the coccidia. Ed. -- The A. Hammand. P. L. Long, Baltimore, University Dark Press. 343-410.
- 37.- Frenkel, J. K. and Ruiz, A. 1981. Endemicity of toxoplasmosis in Costa Rica. Am. J. Epidemiol. 113:254-259
- 38.- Goding, J. W. 1978. Use of staphylococcal protein A - as an immunological reagent. J. of immunol. Met. 20: 241-253.
- 39.- González, H. A., López, R. R. 1980. Proteína A en Staphylococcus aureus. Cuantificación por microaglutinación. Archivos de investigación médica. 1:497-506.
- 40.- González, S. N. 1984. Infectología clínica. Ed. Trillas, 2a. edición, México, D. F. 510-520.
- 41.- Hartley, W. J. and Moyle, G. 1968. Observations on an outbreak of ovine congenital toxoplasmosis. Aust. Vet J. 44:105-107.
- 42.- Huffman, E. M., Kirk, J. H., Winward, L., Gorham, J. - R. 1981. Relationship of neonatal mortality in lambs to serologic status of the ewe for Toxoplasma gondii. JAVMA. 178:679-682.

- 43.- Hunter, D., Chadwick, P., Balfour, A. H., Bridges, J. B. 1980. An assessment of a commercially available -- haemagglutination test for detecting Toxoplasma antibodies in ovine sera. Br. Vet. J. 136:339-342.
- 44.- Isita, L. S., Sosa, M. J., Sosa, R. M. 1984. Respuesta inmune en la toxoplasmosis. Infectología. 4:37-39.
- 45.- Jubb, K. V. F. y Kennedy, C. K. 1973. Patología de -- los animales domésticos, Tomo I, Ed. Labor, España. - 628.
- 46.- Kabat, E. A. 1968. Inmunología experimental, Ed. Fournier, 1a. edición. 498-500.
- 47.- Levine, N. D. 1978. Textbook of Veterinary Parasitology Burgess Publishing Company Minneapolis Minnesota. 33-34.
- 48.- Llorente, V. L. 1979. Congelación de Toxoplasma gondii en nitrógeno líquido. Rec. Iber. Parasitol. 43: 353-360.
- 49.- McCulloch, W. F., Billy, G. F., John, L. B. 1964. Serologic survey of toxoplasmosis in Iowa domestic animals. JAVMA. 144:272-275.
- 50.- Medeiros, M. M. 1985. Frecuencia de anticorpos anti-Toxoplasma gondii en caprinos criados sob diferentes - formas de exploracao no Estado de Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 37:73-79.
- 51.- Mittal, K. P., Higgins, P., Lariviere, S. 1987. An -- evaluation of agglutination and coagglutination techniques for serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae -- isolates. Am. J. Vet. Res. 48:219-226.

- 52.- Morilla, A., Bautista, C. R. 1986. Manual de técnicas de Inmunología Veterinaria. INIP. Ed. Diana. 1a. edición. 48-50.
- 53.- Munday, B. L. 1972. Serological evidence of Toxoplasma infection in isolated groups of sheep. Rest. Vet. 13: 100-102.
- 54.- Osborne, H. G. 1959. Abortion in sheep associated - - with Toxoplasma. Aust. Vet. J. 424-425.
- 55.- Pfefferkorn, E. R., Guyre, P. M. 1984. Inhibition of growth of Toxoplasma gondii in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. Infect. Immun. - 44:211-216.
- 56.- Organización Panamericana de la Salud, 1980. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre, - 13a. edición. 397-400.
- 57.- Roch, E. V. 1971. Compendio de toxoplasmosis. Ed. Patria. 1a. edición. México, D. F. 7-144.
- 58.- Sheffield, H. G., Melton, M. L. 1976. Effect of pyrimethamine and sulfadiazine on the intestinal development of Toxoplasma gondii in cats. Am. J. Trop. Med. Hyg. 25:389-383.
- 59.- Sikes, K. R. 1982. Toxoplasmosis. JAVMA. 180:857-859.
- 60.- Smith, I. D. 1961. Ovine toxoplasmosis as a cause of reproductive wastage preliminary observations. Aust. Vet. J. 18-23.

- 61.- Sosa, J. M., Isita, L. S., Sosa, R. M., Guzmán, H. C. 1983. Reproducción de Toxoplasma gondii en cultivos - de tejidos. Infectología. 9:425-434.
- 62.- Soulsby, E. J. L. 1982. Helminths, Arthropods and Protozoa, Ed. Academic Press. 7a. edición. 670-682.
- 63.- Tizard, R. I. 1979. Inmunología veterinaria. Ed. Interamericana, 1a. edición, México, D. F. 141-142.
- 64.- Wilkins, M. F., Connell, E. O., Te Punga, W. A., 1987. Toxoplasmosis in sheep I. Effect of a killed vaccine on lambing losses caused by experimental challenge - - with Toxoplasma gondii. N. Z. Vet. J. 35:31-34.