



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

"MONTAJE DE LA TECNICA DE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL
DIAGNOSTICO DE PROBLEMAS REPRODUCTIVOS EN
OVINOS DEBIDO A TOXOPLASMA GONDII"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N :
AIDE PATRICIA NUÑEZ MARTINEZ
ALBERTO LOPEZ AGUILERA
LINDA ROSARIO MENDOZA PALATO

DIRECTOR DE TESIS:

M. V. Z. J. ALFREDO CUELLAR ORDAZ.



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.

I N D I C E

	Pag
RESUMEN-----	1
INTRODUCCION-----	3
OBJETIVOS -----	-21
MATERIAL Y METODOS-----	-23
RESULTADOS-----	-54
DISCUSION-----	-59
CONCLUSIONES-----	-64
BIBLIOGRAFIA-----	-65

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron en primer lugar el montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii en ovinos.

Además, en base a la técnica de IFI se determinaron los títulos de anticuerpos en borregas en función a su edad y que presentaron problemas reproductivos.

Para el desarrollo de la técnica de IFI fue utilizada la infraestructura y apoyo de personal especializado del Instituto Nacional de Diagnóstico Epidemiológico "Dr. Manuel Martínez Baez" de la Secretaría de Salud, obteniendo el conjugado en el laboratorio de inmunoparasitología, purificando IgG de borrego marcado con isotiocianato de fluoresceína. Para conocer los títulos de anticuerpos en ovinos se obtuvieron muestras sanguíneas por venopunción yugular de 5 explotaciones ovinas comerciales del Estado de México, con el suero se procedió a la elaboración de la técnica de IFI para el conocimiento de la cantidad de anticuerpos presentes en esos animales.

En el montaje de la técnica de IFI existió poca disponibilidad de material ya que es de importación y alto costo por lo cual el procedimiento y posterior obtención del conjugado resultó dificultoso, ya que se requirió de mucho tiempo y asesoría especializada.

De los 165 sueros de ovinos obtenidos, 94 o sea el 56.9% presentaron anticuerpos contra T. gondii indicando que la presencia de este protozooario es importante en el Estado de México. Los títulos encontrados oscilaron entre 1:8 y 1:8192, de ellos el 41.5% se ubicaron entre las diluciones de 1:8 y 1:16. El título más alto fue de 1:8192 detectado en solo dos ovejas.

En lo referente a los títulos de anticuerpos en función a la edad del ovino se encontró que los animales que mostraron títulos altos de anticuerpos contra T. gondii fueron los que tenían entre tres y mayores de cuatro años de edad (60.6%), encontrando una menor cantidad de animales reactivos cuando tenían dos años o menos.

Existió poca relación entre los títulos de anticuerpos contra T. gondii y los problemas reproductivos en las explotaciones ovinas examinadas. Los títulos de 1:8192 correspondieron a dos borregas, una abortó y la otra parió un cordero débil que murió a los tres días de nacido, lo que hace suponer que una toxoplasmosis aguda pudo estar involucrada en esos problemas reproductivos.

Las otras borregas que abortaron y/o parieron corderos débiles tuvieron títulos de anticuerpos que oscilaron de 1:256 a 1:512, sin embargo, las borregas que tuvieron parto normal mostraron título entre 1:8 y 1:2048, indicando una toxoplasmosis crónica o bien que en las borregas del primer grupo existieron otras causas no diagnosticadas en el presente trabajo que también ocasionaron pérdidas reproductivas.

I N T R O D U C C I O N

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica causada por el Toxoplasma gondii, (parásito intracelular obligado), que--- puede infectar animales herbívoros, omnívoros y carnívoros, -- principalmente mamíferos y algunas aves, que juegan el papel - de hospedadores intermediarios. Siendo sus hospedadores defi nitivos los mamíferos de la familia felidae así como la fuente de infección natural más importante (aganda, et al., 1981; Ble wett, 1983; Carrada, 1983).

La toxoplasmosis es considerada como la causa más común - de aborto infeccioso y pérdida neonatal ovina en varias partes del mundo (Nueva Zelanda, Australia, E.E.U.U. e Inglaterra) - (Alba et al., 1981; Dubey et al., 1984).

Etiología

El Toxoplasma gondii fue descrito primero por Nicolle y - Manceux en 1908 en un roedor llamado "gondi" o "gundi" ---- (Ctenodactylus gundii) en el norte de Africa y años después en el conejo (Oryctolagus cuniculis). Lo denominaron T. gondii tomando en cuenta su forma de arco y el nombre científico del-roedor en el que fue descubierto (Beverly et al., 1961; Souls-by, 1982).

En Nueva Zelanda y Gran Bretaña se ha descrito la asocia-ción de toxoplasma con la muerte prenatal ovina y con la pre-sencia de abortos (Beverly y Watson, 1961; Hartley et al., -- 1968).

En 1939 Wolf y Col., señalan al toxoplasma como agente -- causal de la toxoplasmosis en el hombre y es la primera refe-rencia al respecto de la literatura médica mundial (Villegas - et al., 1977).

Se reconoce solo una especie: Toxoplasma gondii y todas las cepas estudiadas son antigénicamente similares (Carrada, 1983).

Clasificación Taxonómica

Reino: Animal
Subreino: Protozoa
Phylum: Apicomplexa
Clase: Sporozoea
Subclase: Coccidia
Orden: Eucoccidiida
Suborden: Eimeriina
Familia: Sarcocystidae
Subfamilia: Toxoplasmatinae
Genero: Toxoplasma
Especie: T. gondii
(Levine y Col., 1980; citado por Soulsby, 1982).

Características morfológicas

El T. gondii presente tres fases:

a) Trofozoito, tiene forma de media luna y mide de -- cuatro a siete micrómetros de longitud por tres a cinco micrómetros de ancho. En su porción anterior presenta el llamado complejo apical compuesto de una envoltura externa con tubulillos sub-membranosos, anillos polares, microporo, conoide, toxonemas y los órganos pares en forma de masa o roptrias. Tiene un solo núcleo y movilidad aunque carece de cilios o flagelos, son muy sensibles a cualquier medio extracelular, por ello los trofozoitos libres invaden las células nucleadas del hospedador en especial las del sistema retículo endotelial (Cererols, 1988).

b) Ooquistes, son las formas quísticas del parásito - que el gato expulsa junto con sus heces. Tiene una forma - oval, mide de diez a doce micrómetros de diámetro a los dos días de ser expulsados y si existe un grado de humedad y -- temperatura adecuado los ooquistes presentan una división - por esporulación los cuales contienen cuatro esporozoitos - en su interior. Si las condiciones ambientales son favorables pueden permanecer viables durante más de un año (Cere-rols, 1988).

c) Quistes hísticos, su tamaño es muy variable entre diez y cien micrómetros de diámetro, poseen una membrana -- elástica que encierra en su interior a los bradizoitos (for- mas similares a los taquizoitos pero más pequeñas), y los - aísla del medio externo. Se localizan en cualquier tejido del hospedador, de preferencia en los músculos, cerebro y - retina. Los quistes permanecen durante muchos años, proba- blemente durante toda la vida del hospedador sin provocar - ninguna reacción inflamatoria en los tejidos en donde se en- cuentran (Cererols, 1988).

Ciclo biológico

En el ciclo biológico del T. gondii los felinos juegan un papel de suma importancia al ser hospedadores definitivos del parásito (Blewett et al. 1983; Dubey, 1980; Soulsby, 1982). Casi todos los animales de sangre caliente pueden actuar como intermediarios (Cererols, 1988).

En el T. gondii existen dos tipos de desarrollo; el - ciclo enteroepitelial y el ciclo extraintestinal.

1.- Ciclo enteroepitelial, es la denominada fase --- sexual o isospórico se inicia cuando los ooquistes o los --- quistes hísticos llegan al intestino del hospedador definitivo. Los trofozoitos se liberan de las membranas quísticas por la acción de las enzimas digestivas y penetran en - el interior de las células intestinales, donde se llevan a

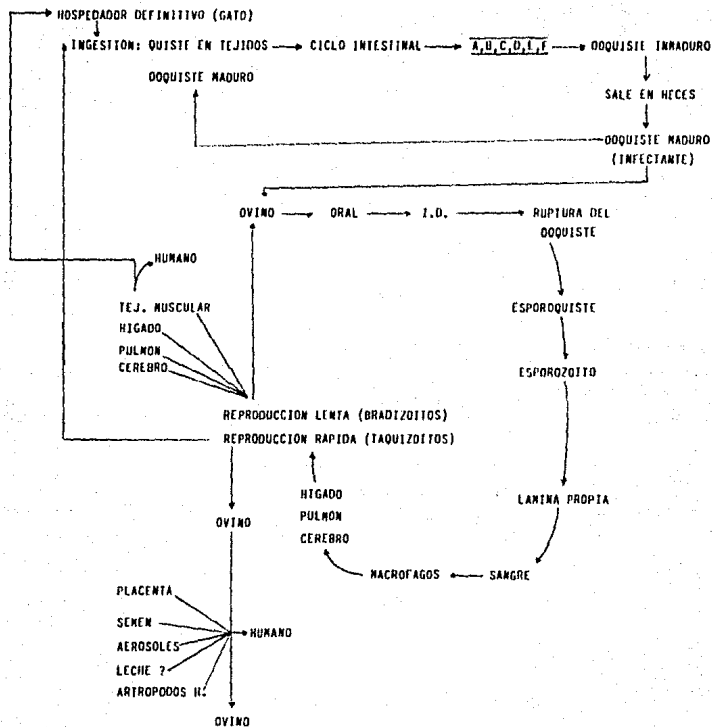
cabo cinco etapas multiplicativas que difieren morfológicamente y se designan A, B, C, D y E. (El tipo A aparece de 12 a 18 horas después de la infección, siendo la etapa más pequeña, es evidente como una colección de dos o tres organismos en el yeyuno. Las divisiones son por endodiogonia (formación de células hijas por injerto interno). El tipo B ocurre de 12 a 54 horas después de la infección y ha sido localizado en el núcleo, se divide por endodiogonia y endopoligonia. El tipo C ocurre de 24 a 54 horas después de la infección y se divide por esquizogonia (merogonia) ellos -- son alargados y tienen un núcleo subterminal. El tipo D -- ocurre de 32 horas a 15 días después de la infección siendo más pequeño que el tipo C, según Frenkel 1973, se divide -- por endodiogonia, esquizogonia y por separación de merozoitos simples de una masa nuclear. El tipo E se divide por -- esquizogonia ocurre de 3 a 15 días después de la infección, y se parece al tipo D), ocurriendo una reproducción ----- asexual que dará lugar a la aparición de los merozoitos. -- Después de varios ciclos reproductivos, que se ha ido extendiendo en la infección por todo el intestino del felino, algunos merozoitos evolucionan hacia microgametocitos (gameto femenino) o macrogametocito (gameto masculino). Entre ---- ellos se realiza una reproducción asexual que dará lugar a la formación de ooquistes, formas resistentes que serán expulsadas por el felino parasitado junto con sus heces. Para que estos ooquistes sean infectantes tienen que presentar una reproducción esporogónica que se produce en el exterior, a los dos o tres días después de ser expulsados (Carrada, 1983; Cererols, 1988; Soulsby, 1982).

2.- Ciclo extraintestinal es la denominada fase ----- asexual. (Se inicia cuando las formas quísticas del parásito (ooquistes procedentes de deposiciones de gatos infectados o quistes hísticos presentes en los tejidos de animales parasitados), llegan al intestino de cualquier animal homeotermo. Las enzimas digestivas del mismo destruyen las mem-

branas del quiste produciéndose la liberación de los trofozoitos; éstos penetran de inmediato en las células nucleadas del hospedador, en especial las células del sistema retículo endotelial. En su interior, el trofozoito, que en esta fase recibe el nombre de taquizoito, se divide activamente por endodigonia. Acumulándose de ocho a dieciseis o más organismos en las células hospedadoras. Por lo que pueden llenar por completo la célula parasitada y producir la rotura de la misma. Los parásitos liberados por dicha rotura infectan nuevas células hasta que los mecanismos inmunes del hospedador actúan produciendo la muerte de las formas libres y frenando la multiplicación de las intracelulares.

A partir de este momento, los trofozoitos, que en esta fase se denomina bradizoitos se enquistan en los tejidos del hospedador formando los denominados quistes hísticos. (Cererols, 1988; Soulsby, 1982).

Ciclo biológico del *Toxoplasma gondii*.



(modificado de Dubey et al., 1977; Fayer, 1981; Soulsby, 1982.)

Epidemiología

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial, mucho más frecuentes en las regiones húmedas y cálidas que en las frías y secas (Cereros, 1988).

Los animales más importantes son los gatos. Ellos al igual que el resto de los felinos (gato montes, puma, jaguar, etc.), son los hospedadores definitivos del parásito, ya que en ellos tiene lugar la reproducción sexual del mismo (Blewett et al., 1986; Frenkel et al., 1981).

También es posible que los invertebrados como los insectos coprófagos, artrópodos hematófagos y moluscos jueguen un papel importante en la diseminación de ooquistes -- (Del muro, 1982; Roch, 1971; Soulsby, 1982).

En los ovinos se consideran tres mecanismos de transmisión de la toxoplasmosis:

1. Exposición continua de las ovejas a un medio ambiente contaminado con los ooquistes (alimentación al pastoreo), provocando la infección y la manifestación de los signos clínicos, éstos se presentan principalmente en animales jóvenes y de reemplazo.

2. Exposición discontinua a la infección por ooquistes donde la enfermedad se presenta de manera esporádica -- presentándose en los animales a cualquier edad (Blewett y Watson, 1983).

3. Transmisión de la infección por contacto. La diseminación de la enfermedad se inicia por la mezcla de borregos infectados con animales susceptibles después del emparejamiento. Los problemas clínicos estarán restringidos principalmente a las hembras de reemplazo.

Blewet (1983) considera posible la transmisión venérea al observar las formas infectantes del toxoplasma en el semen de carneros.

La ingestión de pastos, forrajes o alimentos contaminados es uno de los mecanismos de infección natural para los hospedadores intermediarios. El humano se infecta por la ingestión de quistes hísticos presentes en la carne de mamíferos utilizada para su consumo (Cererols, 1988; Carrada, 1983; Villegas et al., 1977)

Patogenia

Se han establecido tres mecanismos de penetración del parásito a las células del hospedador (Villegas et al., --- 1977).

1.- Secreción y actividad enzimática, se han detectado ciertas sustancias producidas por el parásito que de alguna manera alteran la consistencia de la membrana celular principalmente de aquellas células que forman parte del sistema retículo endotelial (Villegas et al., 1977)

2.- Penetración activa: Es aquella que se presenta por movimientos de torsión de todo el cuerpo del parásito, adquiriendo forma de tirabuzón con lo que se favorece para penetrar a la célula (Villegas et al., 1977).

3.- fagocitosis: Se inicia por un acercamiento de la célula al parásito en forma inespecífica con el fin de neutralizarlo, esto se ve favorecido por la activación de la célula que forma parte del sistema fagocítico histiocitario para iniciar la fagocitosis. Este mecanismo involucra inicialmente la emisión de pseudopodos hasta que el parásito queda totalmente rodeado e incluido en una vacuola parasitofora (Villegas et al., 1977).

La infección de T. gondii es subclínica, en la mayoría de las infecciones agudas la ruta de infección es el tracto intestinal. Después de la ingestión de ooquistes, bradizoitos o taquizoitos, la infección entérica se disemina por linfa y sangre con invasión subsecuente de órganos y tejidos

Los parásitos se multiplican en forma de taquizoitos, produciendo muerte celular; se extiende el parasitismo y los animales pueden morir en este período. Durante esta fase los organismos pueden aparecer en secreciones y excreciones como la orina, heces, leche, fluido conjuntival y saliva. Estas formas son incapaces de sobrevivir fuera del hospedador. Es muy pequeña la posibilidad de la diseminación de la toxoplasmosis de un animal a otro en la fase aguda (Soulsby, 1982).

Virulencia

Se ha señalado una 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 enfermedad o murieron de la infección, son usualmente más virulentos que otros obtenidos de un animal que no mostró evidencias clínicas de la enfermedad. La mayoría de las infecciones son avirulentas o de carácter subclínico (Soulsby, 1982).

Cuadro Clínico

La toxoplasmosis en ovinos se clasifica de la siguiente manera:

1. Aguda:
 - a) Adquirida
 - b) Congénita

2. Crónica o latente (Soulsby, 1982).

Muchas de las infecciones son subclínicas y los signos varían dependiendo del órgano afectado (Dubey et al., 1981; Soulsby, 1982).

a) Toxoplasmosis aguda adquirida ocurre esporádicamente y se acompaña de un cuadro clínico que varía desde una linfadenopatía subclínica hasta una neumonía fatal. Las ovejas con este tipo de infección manifiestan signos digestivos como anorexia, diarrea y emaciación progresiva; signos respiratorios como tos y disnea; signos nerviosos; fiebre y trastornos en la gestación con abortos y fetos momificados (Dubey et al., 1981; Soulsby, 1982).

Las lesiones encontradas en este tipo de infección son las siguientes: abomasitis, enteritis, inflamación de ganglios linfáticos mesentéricos, esplenomegalia, hepatomegalia con focos grandes de necrosis de uno a tres milímetros de diámetro, agrandamiento del páncreas, miocarditis, encefalitis, cistitis y cuando ocurre aborto hay necrosis de los cotiledones (Dubey et al., 1990).

b) Toxoplasmosis aguda congénita; sus manifestaciones clínicas varían dependiendo de la etapa de gestación en que ocurrió la infección con I. gondii. 1) cuando la infección ocurre durante una gestación temprana hay repetición de calor por muerte embrionaria y reabsorción; 2) cuando afecta más allá de la mitad de la gestación hay aborto y momificación por muerte fetal; 3) al final de la gestación causa infección fetal ocasionando nacimientos de productos prematuros o débiles que mueren en no menos de tres días (Blewett y Watson, 1984; Carrada, 1983; Soulsby, 1982).

En la patogenia de este tipo de toxoplasmosis los taquizoitos que llegan al aparato reproductor producen una placentitis alternando así el intercambio nutricional y -- oxigenación, ante esto, el producto muere cuando aún es feto o bien nace con trastornos cerebrales o también el parásito puede afectar directamente los órganos del producto - (Soulsby, 1982).

Las lesiones encontradas en la placenta en este tipo de toxoplasmosis consiste en disminución del tamaño de los cotiledones. Las lesiones características son focos redondos de necrosis, de color gris y de uno a dos milímetros de diámetro.

En los pulmones hay nódulos necróticos y exudado pleural, hidrotórax. Otras lesiones son hepatomegalia, esplenomegalia, ascitis y en algunas ocasiones se presenta corioretinitis . (Carrada, 1983; Soulsby, 1983).

Las lesiones encontradas en el producto son: necrosis central en cerebro, cerebelo, médula espinal y cordón espinal. Encefalomiелitis no supurativa con infiltración perivascular, con células mononucleares. Hay presencia de focos de infiltración mononuclear en meninges, lengua, --- músculo esquelético, hígado y vasos sanguíneos (Dubey, --- 1981).

La toxoplasmosis crónica o latente se considera como resultado de una infección aguda siendo subclínica. No -- hay reacción inflamatoria debido a que el toxoplasma se -- cista y enquistado (Carrada, 1983).

Diagnóstico

Diagnóstico clínico; la presencia de cuadros clínicos inespecíficos y la existencia de formas asintomáticas o --

inaparentes que en un momento dado puede 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; existen dos tipos de pruebas para diagnosticar la toxoplasmosis:

- I. Directas (se emplean para la detección del parásito).
- II. Indirectas (se logra detectando o midiendo la respuesta inmune del animal contra el protozoo) Soulby (1982) hace referencia a las técnicas directas e indirectas.
 - I. Directas:
 - a) Observación histológica de cortes
 - b) Inoculación a animales de laboratorio
 - c) Técnica de inmunofluorescencia directa
 - II. Indirectas:
 - 1.- Técnicas serológicas:
 - a) Sabin y Feldman (técnica del colorante)
 - b) Hemaglutinación indirecta o Pasiva
 - c) Fijación del Complemento
 - d) Inmunolectroforesis
 - e) Inmunofluorescencia indirecta

Otras pruebas usadas para el diagnóstico de la toxoplasmosis son citados por: Calderon et al. (1985), Carra da (1983), Roch (1971) y Watson (1972).

- a) ELISA y sus variantes para anticuerpos.
- b) Toxoplasmina
- c) Coaglutinación
- d) Difusión en Gel de Agar
- e) Floculación con partículas inertes.

Diagnóstico Diferencial

El diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis de 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 un grupo de microorganismos (protozoarios y hongos), -- muy semejantes al toxoplasma tanto en su forma de trofozoito como quiste, que infectan al humano y otros animales. En los animales se consideran los géneros Eimeria, Besno--tia, Hexamita, Encephalitozoon, Globidium, Fibrocistis, --- Sarcocystis, etc (Dubey et al., 1980)

En cuanto al diagnóstico clínico hay una serie de enfermedades por su biología y patogenicidad dan cuadros clínicos semejantes a la toxoplasmosis como son: listeriosis, leptospirosis, brucelosis, salmonelosis, clamidiasis y vibriosis (Dubey et al., 1980)

Tainturier en 1980; menciona que el aborto es una forma de presentación de la toxoplasmosis y que debe diferenciarse de varios agentes causantes de aborto como:

1. Abortos infecciosos:

a) Brucella spp; afecta al humano y a los animales, presenta aborto en el último tercio de la gestación, mortinato y debilidad de la madre.

b) Chlamydia Psittaci: este agente también causa conjuntivitis, problemas respiratorios, artritis y abortos en cualquier etapa de la gestación.

c) Rickettsia spp; la enfermedad causada por estos -- agentes cursa además con trastornos respiratorios.

d) Salmonella spp; afecta a todo el hato, tanto adultos como jóvenes los animales jóvenes presentan cuadro entérico y fiebre en cualquier etapa de la gestación.

e) Campylobacter fetus intestinalis; en la enfermedad ocurren abortos al final de la gestación, alto porcentaje de abortos aunado a un cuadro febril muy severo.

f) Listeria monocytogenes; genera 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 -- abortos al final de la gestación (Blood et al., 1982)

2. Abortos parasitarios:

a) Sarcocystis spp; es el parásito que causa abortos en varias especies animales principalmente en bovinos, ovinos, caprinos y suinos.

3. Abortos no infecciosos:

a) Administración de antihelmínticos al final de la gestación (fenotiazina y tetramizol).

b) El consumo de plantas tóxicas.

c) Las anomalías congénitas que pueden ser genéticas o cromosómicas son responsables de la muerte del embrión o de la reabsorción de éste (Blood et al., 1982).

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, se pueden tomar como datos de certeza de toxoplasmosis.
6. Un aumento de anticuerpos en el curso de una evolución clínica está en favor de toxoplasmosis.

Tratamiento

Considerando que la toxoplasmosis ovina clínica, generalmente ocurre cuando una oveja susceptible experimenta su primer 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 farmacos son altos, no existiendo un tratamiento satisfactorio contra la toxoplasmosis ovina (Blewett, et al., 1983; Mc. Culloch et al., 1964)

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 amoníaco 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 portadores y sacrificarse.
4. Los cadáveres de animales infectados y sospechosos deberán destruirse totalmente, o por lo menos hacerse inaccesible a los carnívoros.
5. Eliminación completa de animales en los que surge la enfermedad.
6. Alimentar a los gatos en el hogar con alimentos cocidos.
7. Diagnóstico periódico coprológico y serológico a los gatos de la granja y tratamiento (Blood et al , 1982; Dubey, 1980).

En humanos se pueden aplicar las siguientes medidas de control (Timoney, 1976).

1. Eliminación de las heces de los gatos para evitar contacto con los humanos.
2. Usar el amoníaco como desinfectante en áreas donde el gato defeque accidentalmente
3. Alejar del contacto con los niños las cajas de arena - donde defequen los gatos
4. En las mujeres gestantes no permitir el contacto con gatos cuya fuente de alimentación sea desconocida (Carrada 1983; Grosso et al. 1975; Timoney, 1976).
5. Usar guantes cuando se usan cazuelas de los gatos (Grosso et al., 1975)
6. Cocimiento de las carnes, considerando que los ooquistes se destruyen a temperatura de 90°C. durante 30 segundos y a 50° C durante 2.5 minutos (Carrada, 1983; Grosso - et al., 1975; Timoney, 1976).
7. Evitar el consumo de carne cruda o mal cocida (Carrada 1983; Timoney, 1976).
8. Las frutas y verduras pueden estar contaminadas con ooquistes resistentes, por lo que debe insistirse en el lavado mecánico cuidadoso (Carrada, 1983).
9. Los sujetos seropositivos a Toxoplasma gondii, no deben ser usados como donadores de órganos para trasplantes (Carrada, 1983).
10. En pacientes inmunodeficientes o con terapia inmunosupresora, es importante vigilar las transfusiones de sangre (Carrada, 1983).

11. Control de roedores, cucarachas, moscas y gatos vagabundos (Grosso et al., 1975).

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 esta especie es difícil de aplicarlas (Dubey et al., 1981).

Se ha experimentado la utilización de una vacuna inactivada elaborada con un coccidio no patógeno (Hammondia hammondi) en la prevención del aborto ovino debido a toxoplasmosis, pero no se ha podido prevenir la infección fetal o placentaria (Beverly et al., 1971)

Salud Pública

Los mecanismos de infección del humano son principalmente la contaminación de alimentos con ooquistes provenientes de las heces del gato, la ingestión de carne infectada con quistes de Toxoplasma gondii (Aganga et al., 1981; Dubey, 1980).

La patogenia en el humano es similar a los animales. Se conocen dos formas clínicas de toxoplasmosis humana.

a) Forma adquirida; en lo que se refiere a gineco-obstetricia, los problemas por toxoplasmosis son: partos prematuros, abortos, muerte fetal y placenta molar (Leyva, 1979).

b) Forma congénita; es el resultado de una infección aguda, adquirida por la madre durante la gestación (Villegas et al., 1977).

OBJETIVOS

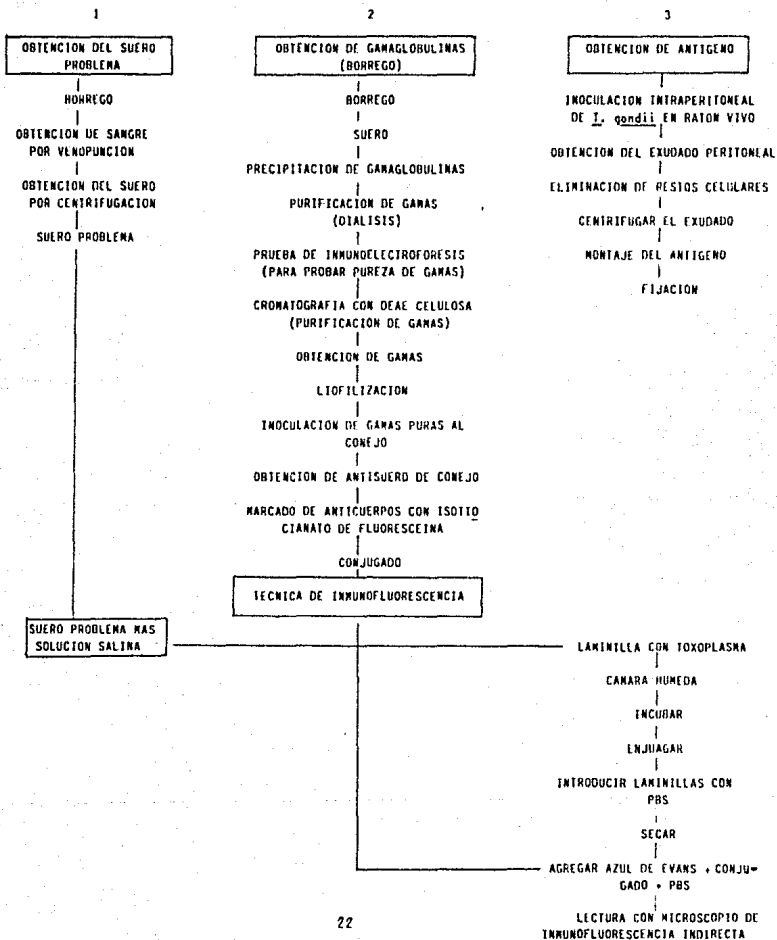
Establecer la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos séricos contra Toxoplasma gondii en ovinos.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra I. gondii en algunos rebaños ovinos del Estado de México.

Conocer la variación de los títulos de anticuerpos -- contra I. gondii en ovinos en función a su edad.

Evaluar los títulos de anticuerpos contra I. gondii - en borregas que presentaron problemas reproductivos.

Diagrama de flujo para la elaboración del conjugado y montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta .



MATERIAL Y METODOS

1. Localización de la explotación

Para la realización de este trabajo se utilizaron animales de cinco explotaciones diferentes (Cuadro 1) (Rancho Santa Elena, El Retoño y El Sacrificio, en el municipio de Teoloyucan; La Palma, municipio de Melchor Ocampo y Las Margaritas, municipio de Ozumba) localizadas en el Estado de México.

(Fig. 1)

2. Animales

El número total de animales muestreados fue de 165 ovinos de las cinco explotaciones antes mencionadas.

3. Diseño Experimental

Para demostrar la presencia de I. gondii se muestrearon animales de las cinco explotaciones, obteniendo los sueros necesarios para realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Para determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra I. gondii se muestreó del 10 al 50% de cada una de las explotaciones ovinas ya citadas.

Para conocer la variación de anticuerpos contra I. gondii se formaron grupos de ovinos de diferentes edades, las cuales variaron desde animales menores de un año, hasta borregas adultas, con el fin de determinar a que edad son más susceptibles.

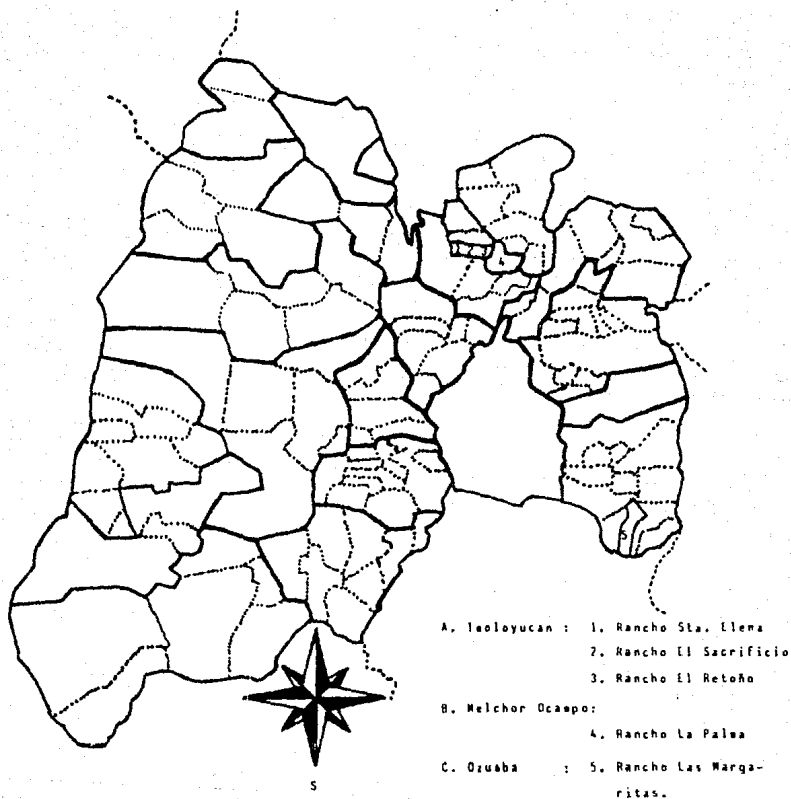
Para evaluar los problemas reproductivos en los títu-

los de anticuerpos contra I. gondii se eligieron 21 borregos de diferentes explotaciones que presentaron abortos, inanición y hembras que parieron corderos muertos.

CUADRO 1. Características de las cinco explotaciones ovinas en las que se realizaron muestreos para el presente trabajo.

RANCHO	TIPO RACIAL	No. ANIMALES	TIPO DE ALIMENTACION	TIPO DE EXPLOTACION
Santa Elena	criollo encastado con suffolk y - raoubillet.	650	pastoreo (pastizal natural).	pastoreo diurno, encierro nocturno, hacinamiento, - mala higiene.
La Palma	criollo encastado con suffolk	120	pastoreo (repelo de- alfalfa)	pastoreo diurno, encierro nocturno, instalaciones - adecuadas.
El Sacrificio	suffolk	80	en corral (alfalfa - achicalada, grano, - rastrajo de safr.	intensivo, instalaciones - adecuadas.
Las Margaritas	corriedale	110	pastoreo (pastizal natural).	pastoreo diurno, encierro nocturno, instalaciones - adecuadas.
El Ratoño	criollo encastado	60	en corral (alfalfa, - rastrajo y cerdaza)	intensivo, hacinamiento, - comederos y bebederos adecuados.

Fig.1. Localización de las explotaciones ovinas del Edo. de México en las que se realizaron nuestros para conocer la presencia de anticuerpos contra Isooplaxa gondii.



4. Muestreo

La obtención de la muestra se realizó por venopunción de la yugular con sistema vacutainer, obteniendo 5 ml. de sangre por animal, identificando cada muestra y marcando a los animales estudiados.

(Fig. 2)

La muestra sanguínea se dejó reposar al ambiente ---- transportándose desde la explotación hasta el laboratorio de parasitología de la FES-Cuautitlán en una hielera con refrigerantes. Una vez en el laboratorio se procedió a -- desprender el coágulo del suero y se sometió a centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos, una vez obtenido el -- suero se conservó en congelación a -20° C hasta su procesamiento.

5. DIAGNOSTICO De Laboratorio

Para la detección de anticuerpos contra T. gondii se usaron las siguientes técnicas:

I. Precipitación de gama globulinas con sulfato de amonio.

(Fig.3)

Reactivos

a) Solución Saturada de Sulfato de Amonio (NH₄)₂SO₄. En un vaso de precipitado (1000 ml) poner 550 ml. de agua destilada mas 550 g. de (NH₄)₂SO₄, revolver con agitador-magnético hasta que la sal este totalmente disuelta. Ajustar el pH a 7.2 agregando ácido clorhídrico o hidroxí-

Fig. 2. OBTENCION DEL SUERO PROBLEMA

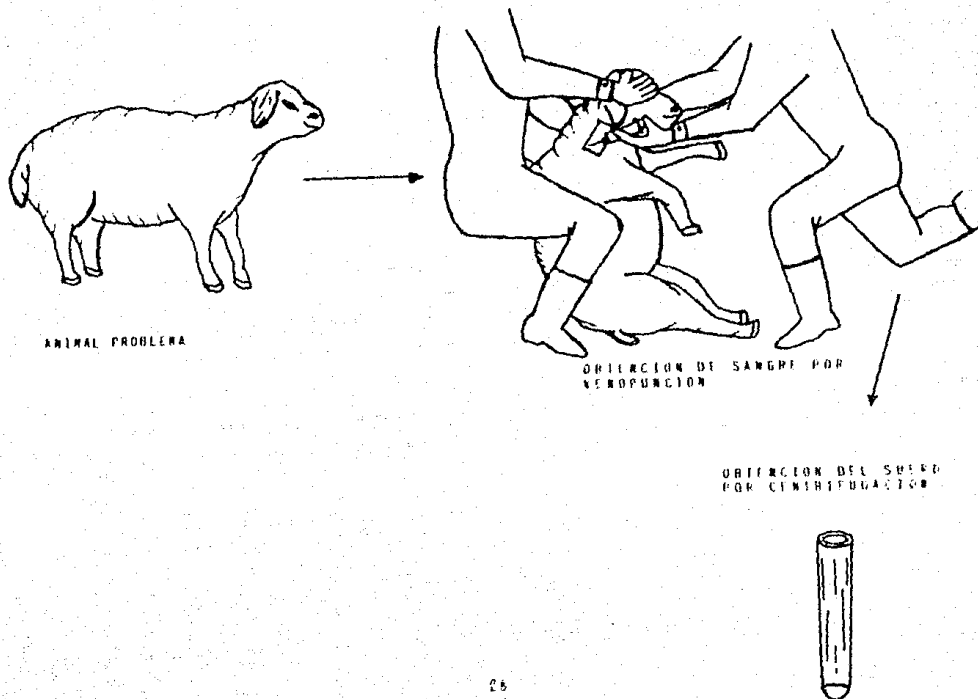
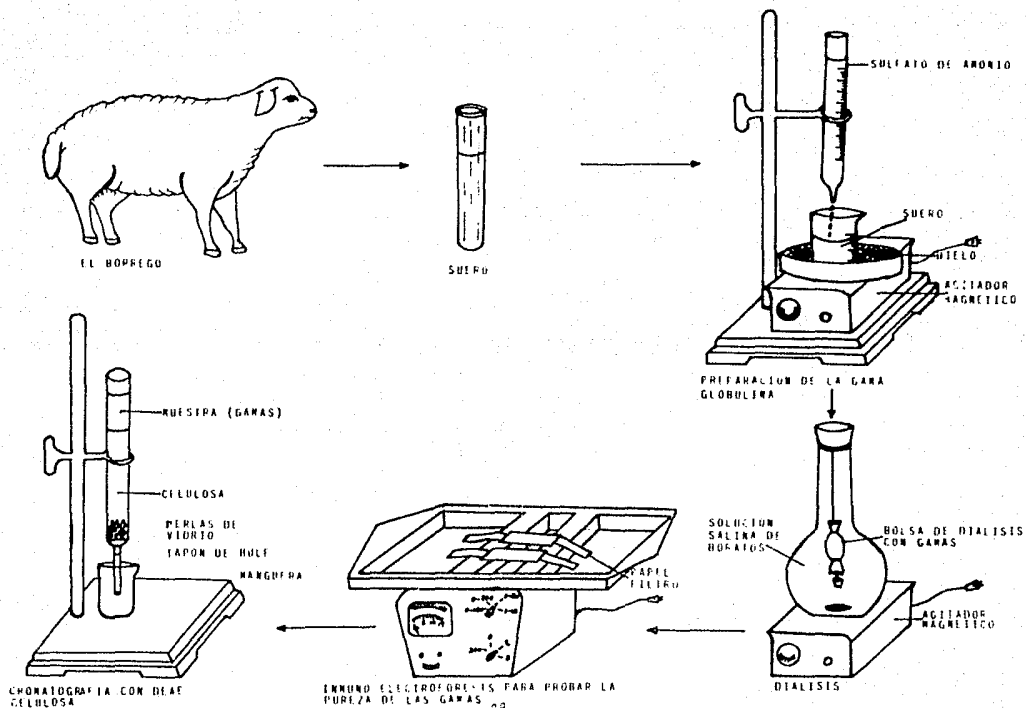


Fig. 3. OBTENCION DE ANTIGENNA GLOBULINA



do de sodio, con ayuda del potenciómetro y conservar a 4°C.

b) Solución Salina Amortiguadora de Boratos con pH de

8.5. Para preparar 1000 ml. se requiere:

- Acido Bórico (H_3BO_3)	6.18 g
- Tetraborato de Sodio ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)	9.53 g
- Cloruro de Sodio Cristal ($NaCl$)	4.38 g

c) Antisuero (suero de borrego-antialbumina sérica de conejo).

Método

1. En un vaso de precipitado colocar un volúmen conocido - de suero de borrego (150 ml) poner el vaso en baño de - hielo.
2. Mezclar con agitador magnético y agregar el sulfato de amonio gota a gota por medio de una bureta.
 - Primera precipitación volúmen a volúmen (150 ml de - suero con 150 ml de sulfato de amonio) evitar hacer - burbujas.
 - Segunda precipitación, medio volúmen de sulfato (150- ml de suero con 75 ml de sulfato de amonio).
 - Tercera precipitación, una tercera parte tanto de sul- fato como solución salina o amortiguador de boratos - (150 ml de suero con 150 de sulfato de amonio más 50- ml de solución salina amortiguadora de boratos).
3. Continuar agitando durante una hora para que precipite- la gama globulina.
4. Centrifugar en frío a 10 000 rpm durante 30 minutos --- (eliminar el sobrenadante).
5. Redisolver el precipitado con solución salina amortigua- dora de boratos completando el volúmen original (150 ml)
6. Reprecipitar la gama globulina, seguir los pasos 1, 2,- 4 y 5.
7. Repetir el proceso de precipitación siguiendo los pasos 1,2 y 4. El precipitado obtenido se disuelve con solu- ción salina amortiguadora de boratos completando un ter- cio del volúmen original (50 ml).

8. Dializar con solución salina amortiguadora de boratos.- Se utiliza una bolsa para diálisis lavada previamente - con solución salina amortiguadora de boratos, colocando en su interior el resultado de la última precipitación, amarrar sus extremos e introducirla en un matraz con solución salina amortiguadora de boratos, donde permanece rá durante varios días cambiando dicha solución dos veces al día manteniéndola con agitador magnético y dejan do reposar 60 minutos. Guardar en cuarto frío.

Probar la diálisis con solución de cloruro de bario, si no presenta precipitado significa que ya esta lista.

9. Una vez completada la diálisis, centrifugar el contenido de la bolsa a 3 000 rpm durante 30 minutos en frío.- Esto es con el fin de eliminar precipitados formados durante la diálisis.
10. Comprobar la pureza del producto por inmunoelectroforesis. Esta muestra se puede conservar liofilizada, con gelada o refrigerada, en este último caso agregar un -- preservador como la azida de sodio o merthiolate.

11. Inmunoelectroforesis

Es una técnica de doble difusión que permite obtener la separación electroforética con gel, de una mezcla de - proteínas y la difusión de un antisuero polivalente correspondiente. Al encontrarse cada anticuerpo con su antígeno correspondiente, se forma un arco de precipitación permitiendo distinguirse entre las diferentes proteínas del - suero normal.

Material

- Aparato de Electroforesis
- Agar (debe emplearse un agar libre de impurezas)
- Amortiguador: puede utilizarse cualquiera de los siguientes:

a) Barbituratos 0.05 M, pH 8.4

Barbiturato de Sodio 0.1 M	385 ml
Acido clorhídrico 0.1 M	115 ml
Agua destilada	500 ml

b) Tris 0.05 M, pH 8.04

Tris (Hidroximetil) Aminometano 0.2 M	250.0 ml
Acido clorhídrico 0.2 M	82.5 ml
Agua destilada	667.5 ml

c) Glicina Na OH 0.1 M, pH 8.6

Glicina 0.1 M	942 ml
Hidróxido de Sodio 0.1 M	58 ml

- Antisuero, debe ser potente y probar su especificidad antes de ser usado.
- Antígeno debe ser soluble para que no se interfiera su migración y tener una concentración adecuada.

Método

1. Preparación de las placas con agar

1.1 Desengrasar previamente los portaobjetos con etanol --- eter etílico (1:1)

1.2 Se prepara una solución de agar al 0.5% con agua destilada, calentar hasta que se haya disuelto y estando aun caliente la solución se cubren los portaobjetos con una

capa delgada.

- 1.3 Se prepara una solución de agar al 1.5% con amortiguador, se disuelve con ayuda de calor y debe reponerse el volúmen perdido por evaporación con agua destilada.
 - 1.4 Se colocan las placas barnizadas sobre una superficie - perfectamente horizontal y se cubren con un volúmen adecuado de agar para formar una capa de 1.5 mm de altura.
 - 1.5 El agar se deja gelificar a temperatura ambiente y se - guarda a 4°C durante 30 minutos para acelerar su endurecimiento. Si no se van a utilizar el mismo día pueden conservarse en cámara húmeda a 4° C sumergidas en el -- amortiguador.
 - 1.6 Marcar en las placs de agar los pozos y canales necesarios.
2. Electroforesis del antígeno
- 2.1 Remover el agar de los pozos previamente marcados en la placa.
 - 2.2 Colocar las placas dentro de la cámara de electrofore--sis. Asegurar que se establezca un buen contacto entre el agar y las tiras de papel filtro que sirve a modo de puentes.
 - 2.3 Encender la fuente de poder y ajustarla a 30 m.A. Esto es si se emplea la unidad integrada de electroferesis o a 8 m.A. por laminilla si se usa la cámara independien--te. Se deja correr durante 15 minutos.
 - 2.4 Desconectar la fuente de poder y con la ayuda de una micropipeta se aplican las muestras de los antígenos en -

los pozos correspondientes. Uno de los pozos debe llenarse con un suero teñido con azul de bromo fenol el cual se une a la albumina y la migración de esta servirá de testigo del avance de las muestras en el agar.

2.5 Se vuelve a conectar la fuente de poder y se ajusta a la intensidad ya mencionada en el punto 2.3, se prosigue la electroforesis hasta que el testigo haya emigrado 3 ó 4 cm. en dirección del polo positivo.

3. Difusión del antisuero

3.1 Una vez finalizada la electroforesis, se desconecta la fuente de poder y se retira la placa.

3.2 Se remueve cuidadosamente el agar contenido dentro de los canales previamente marcados.

3.3 Llenar el canal con el antisuero, siempre se debe emplear un volumen conocido del antisuero (aproximadamente 0.1 a 0.5 ml).

3.4 La difusión y la precipitación se lleva a cabo en una cámara húmeda a 4° C durante 24 horas o mas.

III. Obtención de IgG por Cromatografía con DEAE celuiosa.

Material

Solución normal o inmune que va a ser fraccionada (suero precipitado).

- Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.1M, pH 7.5	
NaHPO4 (Fosfato disódico de sodio)	1.2 g
NaH2PO4 (Fosfato monobásico de sodio)	0.2 g
Agua destilada	aforar a 1000 ml.

- | | |
|-------------------------------------|----------------|
| - Solución Amortiguadora de Boratos | |
| Acido bórico (H3 BO3) | 6.18 g |
| Tetraborato de Sodio Na2 B4O7 10H2O | 9.53 g |
| Cloruro de Sodio Cristal | 4.38 g |
| - DEAE CELULOSA | |
| | 0.6 - 0.9 mg/g |

Método

1. Preparación de la DEAE Celulosa

- 1.1 Calcular la cantidad de DEAE Celulosa que se necesita, - tomando en cuenta que se requiere un gramo por cada 30-40 mg de proteína (100 g de Celulosa)
- 1.2 Suspender la Celulosa en un vaso que contenga 1000 ml - de NaOH 0.5 N agitar durante una hora con agitador magnético y dejar reposar durante 60 minutos (40 g de NaOH/2000 ml de agua destilada).
- 1.3 Agregar un volumen considerado de agua destilada, agitar vigorosamente la suspensión con agitador magnético durante 10 minutos. Dejar sedimentar un día y eliminar el sobrenadante.
- 1.4 Continuar lavando de la misma forma, hasta que el pH -- del sobrenadante sea igual al de el agua de lavado.

Nota: Se puede centrifugar y eliminar el sobrenadante, red solviendo la celulosa precipitada en agua destilada - para acelerar el lavado de la misma.

- 1.5 Una vez que se ha eliminado todo el alcali, agregar -- 2000 ml de HCl 0.5 N y agitar durante 15 minutos con - agitador magnético, dejar reposar 30 minutos y eliminar

el sobrenadante (83.6g de HCl para 2000 ml de agua destilada).

1.6 Repetir los pasos 1.3 y 1.4

1.7 Pasar la celulosa a un vaso de precipitados y resuspenderla en 3000 ml de amortiguador de boratos, agitar con agitador magnético, dejar reposar en refrigeración durante 24 horas.

1.8 Eliminar el sobrenadante y agregar 1000 ml de amortiguador de boratos y refrigerar durante 24 horas.

2. Preparación de la Columna de Cromatografía

2.1 Preparar una columna de cromatografía de 2x50 cm. El extremo inferior de la columna se tapa con un tapón de hule con una horadación provista de un tubo de salida - al que se le adapta un trozo de tubería de hule. El flujo de salida del líquido se controla con una pinza - Mohr.

2.2 Colocar la columna en posición totalmente vertical, colocar en el fondo una capa de fibra de vidrio pre-remojada con solución de boratos y 2 mm de diámetro de perlas de vidrio hasta una altura de 1 cm. La columna se llena de amortiguador de boratos.

2.3 Resuspender la DEAE celulosa en un volumen igual de -- amortiguador de boratos y quitar todas las burbujas por medio de vacío.

2.4 De una manera lenta pero continua, llenar la columna de celulosa. Al mismo tiempo dejar salir el líquido de la columna por medio de un goteo lento pero continuo.

2.5 Dejar a que sedimente y empaquete la columna (evitar burbujas).

2.6 Hacer pasar por la columna unos 200 a 300 ml de amortiguador (cuidar que no se seque la columna).

3. Preparación de la muestra por fraccionar

3.1 Se puede utilizar suero total o bien obtener la gama globulina por precipitación con sulfato de amonio.

3.2 En cualquier caso dializar la preparación con 10 volúmenes de boratos.

3.3 Con mucho cuidado agregar la muestra por fraccionar sobre el tope de la columna de la celulosa (gammas).

4. Fraccionamiento

4.1 Dejar que la muestra pase a través de la celulosa (no dejar secar la columna e ir agregando 20 ml de boratos, -- (3 veces) y por último agregar 500 ml de amortiguador de boratos, dejándolo correr).

4.2 Al mismo tiempo ir recolectando la muestra que va saliendo de la columna (recolección en matraces de 100 ml).

Nota: el volumen que se va recolectando también se puede obtener por medio de la siguiente fórmula: $11 \times 2x$

4.3 Marcar los tubos conforme van saliendo, guardar en congelación.

4.4 Una vez que el último volumen de amortiguador de boratos haya llegado un centímetro arriba del tope de la DEAE --

Celulosa, llenarlo nuevamente con el mismo amortiguador-hasta el tope.

4.5 Tapar la columna y cerrar la manguera.

4.6 Quitar la columna y poner la celulosa en un matraz.

4.7 Lavar nuevamente la celulosa. Primer lavado con Cloruro de Sodio 75 g/1000 ml, ponerle 2000 ml, agitar en agitador magnético y dejar reposar. Esto tiene como finalidad separar proteínas que hayan quedado en la celulosa.

- Tirar el sobrenadante, llenar con agua destilada, agitar y dejar reposar.
- Continuar lavando hasta que el pH del sobrenadante sea igual al pH del agua de lavado.
- Volver a lavar con NaOH igual que en el punto 1.2 y - continuar con los puntos 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6.

4.8 Liofilizar la muestra

- Poner la solución que salió de la columna (gamas) en frascos pequeños, aproximadamente 15 ml en cada uno.
- En un molde colocar trozos de hielo seco y un chorro de alcohol de 96°. Tapar los frascos con un tapón provisto de una manguera e ir girando sobre el hielo hasta que la solución se haya adherido a las paredes del frasco por medio de congelación, marcar los frascos y guardarlos en congelación a -20 a -70°C .
- Una vez congelados ponerlos en la liofilizadora. Conectar el aparato en refrigeración hasta que la aguja marque 40 , 50 y 60°C , conectar la compresora para lograr vacío en todas las mangueritas, colocar los frascos y dejarlos hasta que la solución haya perdido humedad y se haya hecho polvo. Una vez obtenido todo el polvo juntarlo y llevarlo a un volúmen conocido con so

lución salina (15 ml) y volver a dializar para eliminar sales.

- Centrifugar el contenido de la diálisis, utilizar el sobrenadante y liofilizarlo.
- Pesar el polvo que resulto de la diálisis y llevarlo al 1% de proteína (1g de proteína para 100 ml de solución salina fisiológica esteril).
- Poner en un matraz las gamas (125 ml) y agregar 68 ml de solución salina en medio esteril.
- Determinar la pureza de la muestra por medio de electroforesis.
- Esta solución servirá para inocular a nuestros 4 conejos.

IV. Inoculación de Conejos.

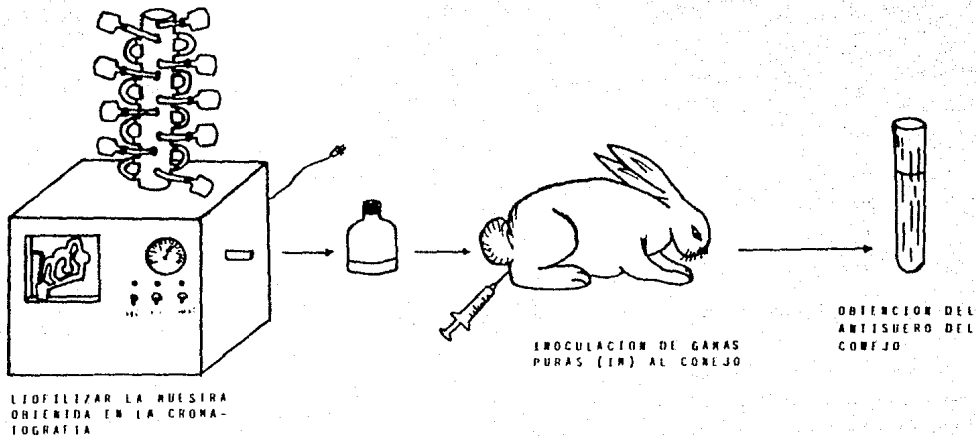
Objetivo: producir anticuerpos en contra de un suero específico (ovino) inocular 1 ml. por cada 3 kg de peso vivo.

(Figura 4)

A 3 ml de suero ovino agregar 3 ml de adyuvante de Freud incompleto, mezclar (n) veces en medio esteril.

- Primera inoculación: 1 ml. intramuscular dividiendo dicha cantidad en ambas piernas (0.5 ml. en cada pierna)
- Segunda inoculación: 3 ml. de suero ovino + 3 ml. de Adyuvante de Freud completo (contiene Mycobacterium bovinum), inocular 0.5 ml. en cada pierna y 0.2 ml. en peritoneo.
- 3a, 4a, 5a y 6a inoculación repartirlas durante una semana (cada tercer día) 0.24 ml. en cada pierna. 0.5 ml=1/2 de la primera inoculación.

Fig. 4. ORIENTACION DEL ANTISUERO DE CONEJO



- 7a, 8a, 9a y 10a inoculación durante una semana (cada tercer día) 0.37 ml en cada pierna.
0.75 ml = 3/4 partes de la primera inoculación.
- 11a, 12a, 13a y 14a inoculación durante una semana - (cada tercer día) 0.40 ml en cada pierna.
0.80 ml = 4/5 partes de la primera inoculación.
- 15a y 16a inoculación 0.5 ml en cada pierna (1 ml) - durante dos días y dejar descansar dos semanas.

Sangrar 20 ml a cada conejo de la vena auricular e inocular nuevamente 0.5 ml de suero de ovino en cada pierna para reforzar.

La sangre se mete en estufa a 37°C durante 30 minutos, - desprender el coágulo, centrifugar el suero a 25 000 rpm durante 10 minutos. Guardar el suero en congelación (antisuero) y probarlo por titulación capilar. Seguir inoculando a los conejos para reforzarlos y lograr un aumento de anticuerpos.

V. Precipitación cualitativa y cuantitativa

Material

- Suero de conejo anti-albumina sérica ovina
- Albumina sérica al 1% en solución salina de boratos
- Amortiguador de boratos pH 8.5
- Hidróxido de sodio 0.5 N

Preparación de diluciones del antígeno

- Colocar en una gradilla 10 tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Numerarlos del uno al diez y llenarlos de acuerdo con las siguientes instrucciones:

Tubo	Sol. Salina de Boratos		Dilución
1	0.5 ml	Agregar 0.5 ml de sol. de albumina sérica ovina, mezclar bien.	1:2000.
2	0.5 ml	Con una pipete limpia tomar 0.5 ml del tubo 1 y pasarlo al tubo 2, mezclar bien.	1:4000
3	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 2 y pasarlo al tubo 3, mezclar bien.	1:8000
4	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 3 y pasarlo al tubo 4, mezclar bien.	1:16000
5	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 4 y pasarlo al tubo 5, mezclar bien.	1:32000
6	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 5 y pasarlo al tubo 6, mezclar bien.	1:64000
7	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 6 y pasarlo al tubo 7, mezclar bien.	1:128000

8	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 7 y pasarlo al tubo 8, mezclar bien.	1:256000
9	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 8 y pasarlo al tubo 9, mezclar bien.	1:512000
10	0.5 ml	Con una pipeta limpia tomar 0.5 ml del tubo 9 y pasarlo al tubo 10, mezclar bien. Desechar 0.5 ml.	1:1024000

VI. Precipitación cualitativa en tubo capilar.

1. Tomar 12 tubos capilares de 75 mm de longitud y 12 mm de diámetro interno.
2. Con tinta hacer dos marcas a los capilares, la primera a 2.5 cm de altura y la segunda a los 5 cm de altura.
3. Tomar el antisuero del conejo y llenar por capilaridad uno de los tubos hasta alcanzar la primera marca. Con papel absorbente limpiar la parte externa del capilar.
4. Desde el mismo extremo del capilar y sin que quede ninguna burbuja de aire, absorber la dilución del antígeno contenida en el tubo 1, hasta alcanzar la segunda marca del capilar. Mezclar ambas soluciones por inversión.
5. Dejar el nivel inferior de la mezcla a 1 cm por arriba de uno de los extremos del capilar. Impedir la salida del

- contenido presionando el extremo opuesto del capilar con la yema del dedo índice. Clavar el capilar en posición vertical en una gradilla de plástico.
6. Repetir los pasos 3, 4 y 5 con la dilución del antígeno contenido en el tubo 2. Continuar de la misma forma con el resto de las diluciones.
 7. En un tubo capilar tomar la solución del antígeno del tubo 1 hasta la primera marca y completar con solución de boratos hasta la segunda marca. Este es el testigo del antígeno.
 8. Preparar otro capilar que contenga el antisuero y solución-salina de boratos. Este corresponde al testigo del antígeno.
 9. Incubar la gradilla a 37°C durante 60 minutos.
 10. Guardar la gradilla a 4°C hasta el día siguiente.
 11. Buscar la precipitación en los capilares y comprobar que -- los testigos no tengan precipitado alguno. De modo grueso puede determinarse el punto óptimo de precipitación, el -- cual corresponde a la dilución del antígeno en que haya mayor precipitado.
- El título del antisuero será igual a la mayor dilución -- del antígeno que aún presente precipitado.
- Probar el antisuero y gamas por inmunolectroforesis.

En el resultado debe ser unicamente con bandas correspondientes a la proteína gama, si esto no sucede, pasar las gamas por columna de GEAE Celulosa para purificarla.

VII. Marcado de anticuerpos con isotiocianato de fluoresceína.

(Fig. 5)

Los anticuerpos marcados con fluoresceína, ha proporcionado uno de los métodos de mayor importancia para la localización de antígenos en cortes de tejidos, frotis o preparaciones microbianas, ya que la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo permite identificar antígenos "in situ" sin necesidad de aislarlo de sus componentes.

Reactivos:

1. Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos 0.01 M, pH - 7.5

- Na ₂ HPO ₄	1.18 g
- NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.22 g
- NaCl	8.5 g
- Agua destilada, aforar a 1000 ml.	

2. Amortiguador de Carbonatos 0.5 M, pH 9.0

Solución A:

- Na ₂ CO ₃	5.3 g
- Agua destilada, aforar a 100 ml.	

Solución B:

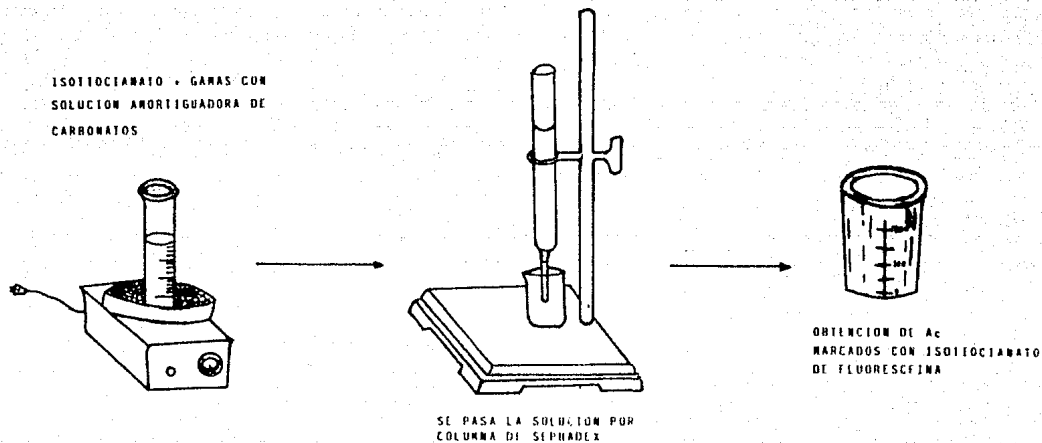
- NaH CO ₃	4.2 g
- Agua destilada, aforar a 100 ml.	

Colocar 100 ml de la solución B y agregar suficiente volumen de la solución A, hasta que el pH de la solución sea 9.0.

3. Isotiocianato de fluoresceína

4. Columna de Sephadex G-25. El Sephadex se sumerge en-

Fig. 5. MARCADO DE ANTICUEROS CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCENCIA



agua destilada, lavar hasta que se eliminen las partículas que no sedimentan en 15 minutos. Los tres últimos lavados se hacen con solución salina amortiguadora. Con el Sephadex lavado se prepara una columna de 2 por 3 cm.

Método:

a) Determinar la concentración de proteínas de la gama - globulina.

b) Ajustar la concentración de proteínas al 1% diluyendo con solución amortiguadora o concentrar la solución.

c) Transferir la globulina a una probeta graduada.

d) De acuerdo con el volumen de solución, se agrega el 10% de amortiguador de carbonatos a un pH 9.0 frío.

e) Sumergir la probeta en baño de hielo, introducir una barra magnética y agregar a baja velocidad.

f) Agregar lentamente 0.5 mg de isotiocianato de fluore - sceína en polvo por cada mililitro de solución.

g) Continuar agitando en frío durante dos horas y se deja toda la noche en refrigeración.

h) Colocar la gama globulina en solución dentro de la columna de Sephadex G-25.

i) Se abre la llave de la columna hasta que penetre la solución al gel. Se cierra la llave nuevamente.

j) Agregar suficiente solución salina amortiguadora a la columna, se abre la llave hasta que salga la proteína conjugada. El isotiocianato no conjugado permanecerá en el tope de

la columna.

k) Medir el volumen de la gama globulina marcada y agregar 0.01 ml de merthiolate (es un conservador) al 1% por ml de solución. Repartir en frascos pequeños y conservar en refrigeración a 4°C.

VIII. Técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta.

Esta técnica se utiliza para la identificación y localización de antígenos toxoplásmicos con anticuerpos específicos -- conjugados con los compuestos fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, naranja de acridina, auramina o amarillo de acridina), que al añadirlos a las células o a los tejidos se fijan a los antígenos formando un complejo inmunitario estable que emite una luz verde brillante en la periferia del parásito -- cuando es positivo y rojo cuando es negativo.

Las etapas involucradas en la inmunofluorescencia incluyen: la preparación del antisuero inmunizante o de gama globulina purificada, conjugación con el colorante fluorescente y finalmente el procedimiento de tinción (Munday et al., 1979).

Dicha técnica se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico Epidemiológico. "Dr. Manuel Martínez Baez" de la Secretaría de Salud.

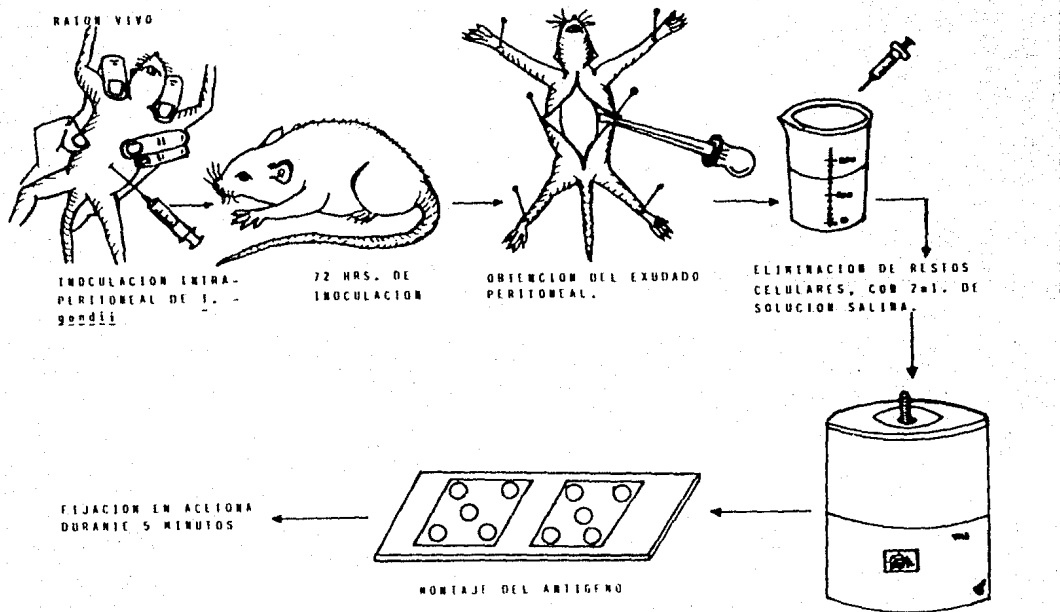
Procedimiento de la técnica

Consta de dos partes:

A) Técnica para la preparación y fijación del antígeno de Toxoplasma gondii.

(Fig. 6)

Fig. 6. OBTENCION DEL ANTIGENO (TOXOPLASMA)



1. Obtención del exudado peritoneal de un ratón infectado 72 horas antes con Toxoplasma gondii.

2. Del exudado obtenido se coloca una pequeña gota en un portaobjetos dejando secar para proceder a teñir con el colorante Wright. Observando en microscopio con objetivo de inmersión y de esta manera evaluar la calidad del exudado obtenido, teniendo en cuenta que el mínimo aceptado es de 40 toxoplasmas por campo para que sea útil como antígeno.

3. Es importante observar la cantidad de células y restos celulares contenidos en el exudado, si hay una gran cantidad se procede a destruirlas mediante el paso del exudado con 2 ml de solución salina (isotónica pH 7.0 a 7.2) por una aguja calibre 27 repitiendo la operación de 10 a 15 veces. Se centrifuga el exudado a 2500 rpm durante 20 minutos. Se elimina el sobrenadante y se rehidrata el sedimento con solución salina. Se procede a teñir el exudado como el paso número 2 para evaluar el grado de limpieza del mismo.

4. Si el exudado está limpio de células y restos celulares se procede al montaje y fijación.

5. Se preparan los portaobjetos haciéndole pozos con lápiz de punta de diamante para el depósito de exudado.

6. En cada pozo se coloca una pequeña gota, lo suficiente para cubrirlo.

7. Se deja secar al ambiente.

8. La fijación se realiza mediante la inmersión del portaobjetos (con el antígeno ya seco) en acetona durante 5 minutos.

9. Una vez seco se almacena y se guarda en congelación --

hasta su uso. El antígeno dura en congelación hasta 6 meses.

B) Montaje de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii.

(Fig. 7)

Colocar tubos de ensayo para hacer 11 diluciones de cada suero problema, en el primer tubo poner 300 mcl de PBS con pH de 7.6 y en los demás tubos colocar 150 mcl de PBS. Al primer tubo agregar 20 mcl del suero problema homogeneizar, tomar 150 mcl del primer tubo y pasarlos al segundo tubo, homogeneizar y tomar 150 mcl del segundo tubo y pasarlos al tercero hasta llegar a la dilución 1:8192.

Colocar una gota de cada dilución en cada uno de los pozos del portaobjetos.

Incubar a 37°C durante 30 minutos dentro de una cámara húmeda.

Enjuagar a chorro con PBS.

Meterlo en PBS durante 5 minutos.

Secar con papel filtro a presión (no tallarlos)

Agregar una gota de azul de Evans más conjugado más PBS.

Colocar en cámara húmeda e incubar 30 minutos a 37°C.

Enjuagar a chorro con PBS.

Meterlo en PBS durante 5 minutos.

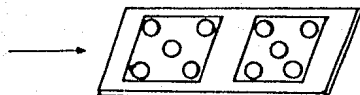
Secar con papel filtro a presión (no tallarlos).

Se coloca una gota de glicerina y se cubren los pozos con un cubreobjetos.

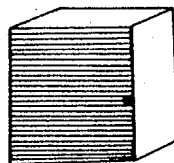
Se procede a la lectura en el microscopio de inmunofluorescencia.

Fig. 7. TÉCNICA DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA

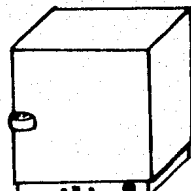
SOLUCION SUERO
SALINA . PROBLEMA



AGREGAR UNA GOTTA EN CADA
POZO DE CADA DILUCION



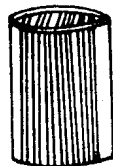
PLER EN CAMARA
HUMEDA



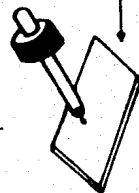
INCUBAR



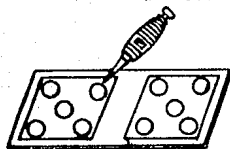
SECAR CON PAPEL FILTRO
A PRESION



INTRODUCIRLO EN PBS
5 MINUTOS

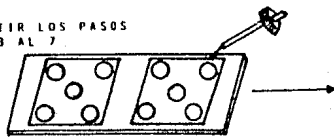


ENJUAGAR A CHORRO



EN CADA POZO AGREGAR 1
GOTTA DE AZUL DE EVANS +
CONJUGADO + PBS

REPETIR LOS PASOS
DEL 3 AL 7



SE COLOCA UNA GOTTA DE
GLICERINA EN CADA POZO
Y CUBRIORBJETOS.

R E S U L T A D O S

El montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), según los pasos ya descritos en el capítulo de material y métodos del presente trabajo, se realizó en el laboratorio de parasitología del Instituto Nacional de Diagnóstico Epidemiológico "Dr. Manuel Martínez Baez" de la Secretaría de Salud. Existió poca disponibilidad de material y substancias para la elaboración del conjugado, ya que en su mayoría son productos de importación y de alto costo, otro punto importante de mencionar aquí es el gran tiempo invertido (tres meses) para la obtención de todos los reactivos para llevar a cabo la técnica de IFI.

Esta última sin embargo, ya con todos los elementos necesarios (suero problema, antígeno y conjugado), se desarrolló sin contratiempos.

La presencia de anticuerpos contra Ixoplasma gondii fue detectada en 94 ovinos de 165 muestreados en 5 explotaciones del Estado de México (Cuadro 2), lo que representa un 56.9%. Los títulos se detectaron entre las diluciones 1:8 y 1:8192, encontrándose que el 41.5% o sea 39 animales están entre las diluciones 1:8 y 1:16. El título más alto fue observado en dos borregos en la dilución 1:8192.

En el cuadro 3 se observa que entre las primeras cuatro explotaciones ovinas muestreadas (Santa Elena, La Palma, Las Margaritas y El Retoño), existió poca diferencia ya que se encontró alrededor del 50% de reactores a la presencia de anticuerpos contra I. gondii. En el quinto rancho "El Sacrificio" presentó el 25% de animales que reaccionaron positivamente a IFI.

En cuanto a los títulos de anticuerpos contra I. gondii

de acuerdo a la edad considerada está en base a la dentición del ovino, fueron muestreados animales desde menores de un año hasta mayores de cuatro años, observando que el mayor porcentaje de animales a los que se lesa detectó algún título de anticuerpos contra I. gondii se encontró entre los de tres y mayores de cuatro años de edad, que presentan un 60.0%. El menor porcentaje se observó entre las borregas menores de uno a dos años de edad significando el 39.3% de los animales evaluados (Cuadro 2).

Los títulos de anticuerpos contra I. gondii de borregas que presentaron problemas reproductivos se muestran en el cuadro 4. Se observa que los dos animales con el mayor título de anticuerpos (1:8192) correspondió a una borrega que abortó y a otra que parió un cordero débil que murió dentro de los tres a primeros días post-nacimiento. Las otras ovejas con problemas reproductivos ya sea aborto o nacimiento de cordero débil, tuvieron títulos que variaron de 1:8 a 1:512. Es importante hacer notar que las borregas anotadas en el mismo cuadro 4 que parieron aparentemente normal mostraron títulos de 1:8 a 1:128 en 50% de los casos y de 1:256 a 1:2048 en el 27%.

CUADRO 2 RESULTADOS: Presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* por medio de IFl en cinco rebaños ovinos del Estado de México.

E D A D	No. DE SUEROS TRABAJADOS	NEGATIVOS		POSITIVOS		T I T U L O D E A N T I C U E R P O S																								
		NO	%	NO	%	1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512		1:1024		1:2048		1:4096		1:8192				
						NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	NO	%	
1	29	17	58.6	17	41.3	3	25	3	25	2	16	-	-	-	-	2	16	1	8.4	1	8.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	33	21	63.6	17	36.3	4	33.4	7	16	7	16	-	-	1	8.4	-	-	2	16	1	8.4	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	17	4	23.5	13	76.4	4	30.7	2	15.4	-	-	-	-	1	7.7	2	15.4	3	23	-	-	-	-	-	-	-	1	7.7		
3	24	11	45.8	13	54.2	3	23	-	-	1	7.7	1	7.7	4	30.7	1	7.7	3	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	30	8	26.6	27	73.4	9	9.1	1	4.5	3	13.6	7	9.1	1	4.5	4	18.1	-	-	-	-	1	4.5	-	-	-	1	4.5		
4	32	10	31.2	27	68.7	9	20.9	6	27.3	1	4.5	2	9.1	1	4.5	1	4.5	1	4.5	1	4.5	1	4.5	-	-	-	-	-		
TOTAL	165 100%	71	43	94	56.9	25	26.6	14	14.9	9	9.6	5	5.3	8	8.5	10	10.6	10	10.6	3	3.1	1	1	-	-	-	2	2.1		

CUADRO 3. Titulos de anticuerpos contra Ixoplasma gondii en 5 explotaciones ovinas del estado de México. (técnica de inmunofluorescencia indirecta).

RANCHOS	No. DE SUJOS	NEGATIVOS	POSITIVOS	T I T U L O S											TOTALES
				1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:517	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	
PALMA	22	7	15	3.2%	4.2%	1-6.6%	1-6.6%	-	3.20%	-	1-6.6%	1-6.6%	-	1-6.6%	15 - 15.9%
STA. ELENA	125	55	70	28-40%	9-12.8%	8-11%	3-4%	5-7.1%	5-7.1%	10-14%	1-1.4%	-	-	1-1.4%	70 - 74.4%
MARGARITAS	9	4	5	-	1.20%	-	1.20%	1.20%	2.40%	-	-	-	-	-	5 - 5.31%
REIÑO	5	2	3	-	-	-	-	2.66%	-	-	1.33%	-	-	-	3 - 3.19%
SACRIFICIO	4	3	1	1-100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 - 1.06%
														94 - 100%	

CUADRO 4. Titulo de Anticuerpos contra Toxoplasma gondii en borregas que presentaron problemas reproductivos.

TITULO	ABORTO 1	CORDERO MUERTO 2	PARTO NORMAL 3	TOTAL
1:8	-	3	29	32
1:16	-	6	8	14
1:32	-	3	6	9
1:64	-	1	4	5
1:128	2	-	6	8
1:256	-	2	6	10
1:512	-	2	8	10
1:1024	-	-	3	3
1:2048	-	-	1	1
1:4096	-	-	-	-
1:8192	1	1	-	2

TOTAL 94

- 1 - TECNICA DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA
- 2 - BORREGAS QUE PARIERON CORDEROS VIVOS Y MURIERON EN LOS TRES PRIMEROS DIAS DE VIDA
- 3 - BORREGAS QUE PARIERON CORDEROS VIVOS Y QUE SE DESTETARON

D I S C U S I O N

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria muy importante para la ovinocultura mundial por los efectos adversos que tiene, basicamente, por las perdidas reproductivas que ocasiona (Alba et al., 1981; Dubey et al., 1984). En México sin embargo, la información que se posee de ese protozoario es muy escasa, limitandose casi exclusivamente a dos trabajos de seroprevalencia (Buendía et al., 1988; Cruz et al., 1989).

El presente trabajo se abocó en primer lugar, al montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii en ovinos siendo esta de mucha utilidad, confiable y que ha sido utilizada en muchos trabajos ovinos (Munday, 1979; Dubey et al., 1980; Dubey, 1981). Además la técnica de IFI es altamente específica y sensible (Kellen et al., 1962; Munday, 1979).

Otra finalidad del trabajo fue conocer los títulos de anticuerpos contra T. gondii (Cuadro 2), encontrando que de 165 sueros de ovino del estado de México 94 (56.9%) reaccionaron a la técnica de IFI, esto coincide con otros países (Cuadro 5) donde mencionan que alrededor del 50% de animales tienen respuesta inmune contra T. gondii y consideran a la toxoplasmosis como la causa más común de aborto infeccioso y perdida neonatal ovina (Dubey et al., 1984).

De acuerdo al trabajo realizado por Harold (1987), a partir de la dilución 1:16 el animal debe considerarse como reactor positivo. En este trabajo se encontró que aunque 94 sueros reaccionaron a la técnica de IFI entre los títulos de 1:8 a 1:8192 solo se considera como positivo (1:16) El 57.7%.

En el cuadro 2 se observa que el mayor porcentaje en cuanto al título de anticuerpos se encontró en borregas de tres a mayores de cuatro años de edad, estos resultados comparados con los de otros autores (Blewett, 1983; Medeiros, 1985), indican que la prevalencia de anticuerpos tiene relación con la edad de los animales o sea a mayor edad más elevados se encontraron los títulos de anticuerpos, esto puede deberse a la acumulación de anticuerpos, a exposiciones continuas de las ovejas a un ambiente contaminado con los ooquistes, o por transmisión de la infección por contacto y cuando se da una mezcla de borregos infectados con animales susceptibles (Blewett y Watson, 1983).

En cuanto al título de anticuerpos contra I. gondii en borregas que presentaron problemas reproductivos se encontraron que éstas los poseían en las diluciones 1:128, 1:256, 1:512, 1:8192 (cuadro 4), los dos títulos más altos detectados en este trabajo (1:8192) correspondieron a dos borregas de las cuales, una abortó y la otra parió un cordero débil que murió a los tres días de nacido. Lo anterior indica que esas ovejas posiblemente presentaron una infección activa o están en la fase aguda de la enfermedad (Alba, 1981). Aunque los títulos sean altos no necesariamente las borregas tienden a presentar problemas reproductivos, esto es debido a que la infección puede afectar a diferentes etapas de la gestación. Cuando la infección se presenta durante los dos primeros meses de la preñez puede ocasionar muerte y reabsorción embrionaria. Si las ovejas se infectan durante los dos y cuatro meses de gestación puede causar muerte fetal con aborto o retención y piometra con momificación del producto. Los corderos que nacen vivos mueren a los pocos días y si sobreviven padecen un retraso en su desarrollo general (Alba et al., 1981). Las borregas que presentaron parto normal reaccionaron a la técnica de IFI entre las diluciones 1:8 y 1:2048, quizá mostrando una toxoplasmo

sis crónica, esto pudo ser consecuencia de una infección en el último tercio de la gestación por lo que usualmente tienen corderos normales aunque pueden tener infección congénita (Alba et al., 1981; Blewett et al., 1983), o bien a que padecían un cuadro subclínico crónico de la enfermedad.

CUADRO 5. Porcentaje de Toxoplasma gondii en ovinos diagnosticados en algunos lugares del mundo.

LUGAR	NUMERO	POSITIVO %	AUTOR
NUEVA YORK (E.U.A.)	65	43.0	FELDMAN (1956)
TURQUIA	171	51.0	WEILAND (1970)
EGIPTO	234	47.4	MARONPOT (1972)
SUR DE ONTARIO (CANADA)	399	63.1	TIZARD Y QUINN (1972)
SUR DE ONTARIO (CANADA)	17	52.9	TIZARD Y QUINN (1972)

FUENTE: MUNDAY (1979) Y DUBEY (1980)

Costo para el montaje de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

1) ELABORACION DEL CONJUGADO EN EL LABORATORIO

REACTIVOS DE IMPORTACION:

A) CELULOSA	COSTO DE 5 g SE USARON 100 g	159.300.00 3'186.000.00
D) SEPHADEX	COSTO DE 10 g SE USARON 100g	92.700.00 648.900.00
C) ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA	COSTO DE 250 ml SE USARON 34.5 ml	157.200.00 21.693.00

NOTA: ESTOS TRES PRODUCTOS DEBEN SOLICITARSE CON UN MES DE ANTICIPACION.

OTROS REACTIVOS HECHOS EN EL PAIS	COSTO APROXIMADO	850.000.00
INFRAESTRUCTURA HUMANA Y DE LABORATORIO (45 DIAS)		1'000.000.00
	TOTAL	= 5'242.100.00 + IVA
COSTO DEL CONJUGADO OBTENIDO PARA LA TECNICA		3'997.100.00/2% ml DE CONJUGADO
SE OCUPARON 2 ml DE CONJUGADO		39.368.00/165 ANIMALES
COSTO POR ANIMAL		24.194.50 + IVA
COSTO DEL CONJUGADO COMERCIAL POR 2 ml		713.000.00/165 ANIMALES
COSTO POR ANIMAL		4'321.20 + IVA

CONCLUSIONES

La técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra Toxoplasma gondii, es altamente específica y sencilla si se emplean conjugados comerciales ya que su obtención es laboriosa y costosa, también es necesario implementar con un método directo para dar un diagnóstico definitivo de la enfermedad.

La presencia de toxoplasmosis es importante en el Estado de México ya que más del 50% de los ovinos presentaron anticuerpos contra T. gondii, considerándose el 57.7% como positivos por tener títulos entre 1:16 a 1:8192.

Se encontró que el título serológico tiende a aumentar según la edad de los animales, esto posiblemente se deba a la acumulación de anticuerpos a continuas reinfecciones no significando que una tasa de anticuerpos baja permita eliminar el diagnóstico de enfermedad, ya que pueden estar cursando la infección o saliendo de ella.

Las hembras que presentaron problemas reproductivos tienen altos títulos de anticuerpos por lo que se recomienda el estudio de otras enfermedades que produzcan aborto y si efectivamente Toxoplasma es la causante de estos problemas.

Se debe continuar con el diagnóstico de Toxoplasma a corderos recién nacidos de borregas que reaccionaron a IFI y que presentaron parto normal.

Es necesario profundizar en el estudio de la relación existente entre la Toxoplasmosis, con el tipo de explotación, alimentación y presencia de hospedadores definitivos e intermedarios.

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

1. Aganga, A.O., Belino, E.D., Adegboye, 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. Beverley, J.K.A. and Watson, W.A. 1961. Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire.
Vet. Rec. 73:6-10
3. Beverley J.K.A.; Watson W.A. (1971). The pathology of de - placenta in ovine abortion due to toxoplasmosis.
Vet. Rec. 88: 124-128
4. Beverley J.K.A. (1971). The pathology of the foetus in ovine abortion due to toxoplasmosis.
Vet. Rec. 88: 174-178.
5. Blewett, D.A. (1983). The epidemiology of ovine toxoplasmosis. III Observation on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission.
Br. Vet. J. 139:537-545.
6. Blewett, D.A. (1984). The epidemiology of ovine toxoplasmosis. IV Observation on outbreaks of clinical toxoplasmosis in relation to possible mechanisms of transmission.
Br. Vet. J. 140:54-63.
7. Blewett, D.A.; Miller, J.K. (1982). Repose of immune and - susceptible ewes to infection with Toxoplasma gondii.
Vet. Rec. 111:175-177.

8. Blewett, D.A.; Bryson, C.E.; Miller, J.K. (1983). Studies of antibody titres in experimentally induced ovine toxoplasmosis.
Res. Vet. Sci. 34:163-166
9. Blood, D.C.; Henderson, J.A.; Radostits, O.M.; Arundel, J. (1982). Medicina Veterinaria 5a, edición. Nueva Editorial Interamericana. México; 522-540,790-792.
10. Buendia, R.A.G., Reyes, G.E., Bizueth, R.I., 1988. Diagnóstico y estudio epizootiológico de la toxoplasmosis ovina en Huehuetoca México.
11. Buxton, D.; Miller, H.R.; Finlayson and Wallace, G.R. --- (1981). Toxoplasma gondii its effect on the ovine popliteal Lymph node. 14:435-441.
12. Calderon, E.J. y León, G.D. 1985. Interpretación de las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de toxoplasmosis. Infectología 10:258-264.
13. Carrada, B.T. (1983). La toxoplasmosis problema de salud pública, avances y perspectivas.
Boletín Médico del Hospital Infantil de México 40:353-362.
14. Carpenter, P.L. (1972). Inmunología y Serología. +a. impresión. Prensa Médica Mexicana 253-264.
15. Cererols, M.D.; (1988). Toxoplasmosis. Tratados de Medicina Práctica 38:43-55.
16. Cruz, B.C., García, V.Z., Rosario, R.C., Solorzano, S.M., - 1989. Epidemiología de la toxoplasmosis ovina en el municipio de Huitzilac Cerit.
Macrobiología, ILIFAP-FARH., Jilotepec Morelos.

17. Dubey, J.P., Desmont, G., Antunes, F., Mc Donald, C. 1985 Serologic diagnosis of toxoplasmosis in experimentally -- infected pregnant goats and trasplacentally infected kids. Am. J. Vet. Res. 46:1137-1140.
18. Del Muro, R.D. 1982. Toxoplasmosis en humanos. Memorias -- del curso Zoonosis Parasitarias. P.M.V.Z., U.N.A.M. 24-41.
19. Dubey, J.P.; Shmitz, J.A. (1981). Abortion associate with toxoplasmosis in sheep in Oregon. J.A.V.M.A. 178:675-678.
20. Dubey, J.P. (1987). Placental trasfer of specific antybo dies during ovine congenital toxoplasmosis. Am. J. Vet. Rec. 48:474-476.
21. Dubey, J.P. (1981). Toxoplasmosis associated with abortion in goats and sheep in connecticut. Am. J. Vet. Rec. 42:1624-1626.
22. Dubey, J.P.; Sharma, S.P. (1980). Parasitemia and tissue - infection in sheep fed Toxoplasma gondii oocysts. J. Parasitol 66:111-114.
23. Dubey, J.P. (1981). Epizootic toxoplasmosis associated -- with abortion in dairy goats in Montana. J.A.V.M.A. 178:661-670.
24. Frenkel, J.K. and Ruiz, A. 1981. Endemicity of toxoplasmo- sis in Costa Rica. Am. J. Epidemiol 113:254-259.
25. Frenkel, J.K.; Smith, D. (1982). Immunization of cats -- against shedding of toxoplasma oocysts. J. Parasitol. 68:744-748.

26. Hughes, H.P.; Knapen, F.V.; Atkinson, H.J.; Baulfour A.H.; Lee, L. (1982). Anew soluble antigen preparation of Toxoplasma gondii and its use in serological diagnosis. Exp. Immunol. 49:239-246.
27. Lapage, G.; Gibson, T.E.; Beesley, W.H. (1981). Parasitología Veterinaria 7a. impresión. Compañía Editorial Continental. México 689-692.
28. Leyva, C.A. (1979). Toxoplasmosis. Rev. Cub. Med. Trop. 31:141-158.
29. Munday, B.L.; Mason, R.W. (1979). Toxoplasmosis as a cause of perinatal death in goats. Aus. Vet. J. 55:485-487.
30. Reinhwbuxton D. et al (1982). Inmunosupresaión in toxoplasmosis. 92:181-189.
31. Rhyan, J.C.; Dubey, J.P. (1984). Ovine abortion and neonatal death due to toxoplasmosis in Montana. J.A.V.M.A. 184:661-664.
32. Roch, E.V. 1971. Compendio de toxoplasmosis. Editorial Patria. 1a. edición. México, D.F., 7-145
33. Smith, I.D.; et al. (1965). Pathogenicity to pregnant ewes of to strains of Toxoplasma gondii. A. Vet. J. 41:282-284.
34. Soulsby, E.J. (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7a. Edition of Monnings. Veterinary Helminthology and Entomology, Lea and Febiger, U.S.A.; 670-682.

35. Tainturier, M. Franc, Ph. Dorchies, J. Ducas de lair lte.
Toxoplasmose et pathologie de la reproduction chez les ru-
minants et truie, 1980.
Rev. Med. Vet. 131:3-223-235.
36. Timoney, J.F. (1976). Toxoplasmosis
Vet. Clin. North America. 6:379-383.
37. Villegas, G.J.; Fastag, A.; Villegas, S.R. (1977). Toxoplas-
mosis. Características anatomoclínicas e identificación -
morfológica del parásito mediante técnicas de impregnación
argéntica.
Vol. Med. Hosp. Infant. 34:473-486.
38. Watson, W.A. (1972). Toxoplasmosis in human and veterinary
medicine.
Vet. Rec. 91:254-258.