

CAPÍTULO 2.9.10.

TOXOPLASMOSIS

RESUMEN

Definición y descripción de la enfermedad: La toxoplasmosis es una infección zoonótica de los animales causada por el protozoo parásito *Toxoplasma gondii*. Puede infectar a todos los animales de sangre caliente y, aunque la infección no causa enfermedad clínica en la mayoría de las especies animales, en algunas de ellas causa una enfermedad aguda potencialmente letal, y en otras, sobre todo en ovejas y cabras, puede manifestarse como enfermedad de la gestación, multiplicándose en la placenta y el feto. En estos animales puede provocar abortos o el nacimiento de corderos/crías débiles, lo que puede ir acompañado de fetos momificados. En estos casos, las características de las membranas intercotiledonarias placentales son normales, pero en los cotiledones pueden verse focos blancos de necrosis, de aproximadamente 2–3 mm de diámetro. Microscópicamente, estos focos aparecen como áreas de necrosis por coagulación que están relativamente libres de inflamación. La inflamación, cuando existe, no es supurativa. Los taquizoítos de *Toxoplasma* se observan solo raramente asociados con estos focos, habitualmente en la periferia de la lesión. El examen del cerebro puede revelar microgliosis focal. Las lesiones a menudo tienen un pequeño foco central de necrosis que se podría mineralizar. Con frecuencia se presenta leucomalacia focal en la sustancia blanca cerebral, debida a la anoxia producida a consecuencia de la patología placentaria. La microgliosis focal es más específica cuando la leucomalacia refleja una patología placentaria, pero puede ocurrir en otras condiciones patológicas en las que se compromete la placenta y que incluyen, aunque con poca frecuencia, la clamidiosis ovina. La infección en cerdos puede causar pérdidas fetales severas en cerdas gestantes pero con más frecuencia es leve e inapreciable. La infección aguda fatal afecta a los monos del Nuevo Mundo, los marsupiales y algunos otros animales.

Identificación del agente: *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado, que tiene un ciclo sexual en los felinos y un ciclo asexual de dos fases en los animales de sangre caliente. Comprende fundamentalmente tres linajes clónicos (I, II y III). En la fase aguda de la infección, los taquizoítos se multiplican en las células causando diversos grados de destrucción de tejidos y, en los casos fatales, pueden demostrarse en líquido ascítico o en frotis de pulmón. Al iniciarse la respuesta inmune, los taquizoítos se transforman en bradizoítos que se multiplican lentamente en las células hasta producir quistes tisulares. En las ovejas, cabras y cerdas que abortan, *T. gondii* es a menudo difícil de encontrar en secciones de tejidos, y es más probable su presencia en secciones de cerebro y placenta. Se puede confirmar su identidad mediante inmunohistoquímica, mientras que se puede emplear la reacción en cadena de la polimerasa para identificar el ADN del parásito en los tejidos. El aislamiento de *T. gondii* a partir de muestras es caro y lento, pero, si es preciso, es mejor llevarlo a cabo inoculando ratones con homogeneizado derivado de cerebro fetal o placenta. El ciclo de vida sexual del parásito tiene lugar de forma exclusiva en las células epiteliales del intestino de los felinos y puede desembocar en la excreción de grandes cantidades de ooquistes en las heces. Los ooquistes pueden permanecer viables en el medio ambiente durante muchos meses.

Pruebas serológicas: La prueba de tinción es el método serológico establecido desde hace más tiempo, y en muchos sentidos representa el “patrón de oro”, al menos en humanos. La prueba de tinción emplea taquizoítos de *Toxoplasma* virulentos vivos, un “factor accesorio” como complemento y suero problema. Cuando el anticuerpo específico actúa sobre los taquizoítos, estos últimos no se tiñen uniformemente con azul de metileno alcalino. La prueba no se puede realizar en algunas especies. Además, como se emplea *Toxoplasma* vivo, la prueba conlleva un riesgo potencial de infección en humanos y, por otra parte, resulta cara su realización. La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es más segura y proporciona títulos comparables a los de la

prueba de tinción y puede utilizarse para diferenciar anticuerpos IgM e IgG. La prueba de aglutinación directa y la de aglutinación con látex son relativamente rápidas y ninguna de las dos requiere instrumental de laboratorio complicado. La técnica del enzoinmunoensayo requiere un equipamiento de laboratorio algo más sofisticado pero permite manejar gran número de muestras y no está sujeta a la interpretación humana de los resultados.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: Se dispone comercialmente de una vacuna compuesta por taquizoítos vivos de *T. gondii* para ser empleada en ovejas en algunos países europeos y en Nueva Zelanda. La vacuna se administra como una suspensión concentrada de taquizoítos con un adecuado diluyente y sistema de presentación. La vacuna se debe mantener y manipular estrictamente de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, puesto que tiene un periodo de validez muy corto.

A. INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado, de tipo zoonótico, que tiene la capacidad de infectar a todos los animales de sangre caliente, y aunque la infección no causa enfermedad clínica en la mayor parte de las especies de animales, en algunas de ellas causa enfermedad aguda potencialmente mortal y, en otras, sobre todo en ovejas y cabras, se manifiesta como enfermedad de la gestación multiplicándose en la placenta y el feto. La infección aguda fatal afecta a los monos del Nuevo Mundo (8), los marsupiales (6) y a otros pocos animales (véase más adelante). En estos casos, la sintomatología puede incluir linfadenopatía, hepatomegalia, neumonía intersticial y síntomas de tipo nervioso. En la necropsia, se observa que los nódulos linfáticos, el bazo y el hígado pueden aumentar de tamaño y el hígado puede tener focos pálidos. Las ovejas, cabras y cerdos contraen una infección primaria durante la gestación que puede provocar infertilidad manifiesta, mortinatos y aborto, dependiendo de la fase de la gestación en la que se contrae la infección. En un caso típico de aborto, una oveja o una gama infectada en la etapa intermedia de gestación produce una cría de cordero/nacida muerta unos pocos días antes de la fecha prevista para el nacimiento. El feto abortado se acompaña a menudo de un hermano débil o de un feto “momificado” (5). La oveja o la gama permanecen asintomáticas. En tales casos, los cotiledones placentarios están típicamente moteados con focos blancos de alrededor de 2–3 mm de diámetro, mientras que las membranas intercotiledonarias se encuentran normales. La infección en la etapa temprana de la gestación, cuando el feto tiene solo un sistema inmune rudimentario, provoca la muerte fetal y la reabsorción. En este caso la madre puede presentarse como estéril, lo que a la larga puede parecer un problema de infertilidad del rebaño. Las madres que resultan infectadas en la última etapa de la gestación previsiblemente producirán descendencia infectada pero clínicamente normal. Después de la infección, ya sea durante la gestación o fuera de ella, no es de esperar que el parásito cause abortos en las siguientes gestaciones. Aunque en investigaciones recientes se ha cuestionado esta conclusión (13, 38), la mayoría de las opiniones sostienen que el recrudecimiento de la infección persistente durante la gestación, que es la causa de abortos sucesivos, no se da con una frecuencia significativa (28). La infección en los cerdos puede provocar graves pérdidas fetales en cerdas gestantes, pero en las condiciones en las que se encuentran las explotaciones ganaderas intensivas modernas, cuando es mínima o inexistente la contaminación de las instalaciones y los alimentos por ooquistes de *T. gondii*, es presumible que en general la infección tenga poco impacto y cause solamente síntomas leves o imperceptibles (24). No obstante, cuando los cerdos se mantienen fuera de las instalaciones en superficies amplias, es mucho más probable que entren en contacto con los ooquistes, por lo que es de esperar una mayor presencia de la infección en tales condiciones (21).

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que tiene un ciclo asexual de dos fases en los animales de sangre caliente y un ciclo sexual en los félidos. El parásito comprende principalmente tres linajes clonales (I, II y III); los tipos II y III se asocian con la enfermedad en animales, mientras que el tipo I es la forma predominante en la enfermedad humana (17, 20). En el ciclo asexual, los dos estadios de desarrollo son el taquizoíto de multiplicación rápida y el bradizoíto de multiplicación lenta. En la infección aguda, los taquizoítos penetran activamente en las células del hospedador donde se multiplican causando la rotura celular y la liberación de los organismos localmente y en el torrente sanguíneo. Cuando el hospedador desarrolla inmunidad, el parásito mantiene su tamaño y forma originales pero se transforma en el estadio de bradizoíto y se multiplica más lentamente en los quistes tisulares hasta establecer una infección persistente. Estos quistes tisulares microscópicos están presentes con mayor frecuencia en el cerebro y en el músculo esquelético y representan la etapa quiescente del parásito dentro del hospedador. Los quistes viables de los tejidos dentro del músculo (carne) son una fuente significativa de infección en humanos. En los animales que sucumben a la infección aguda, los taquizoítos pueden observarse en líquido ascítico o en frotis de pulmón así como en cortes de tejido de hígado y de otros órganos afectados.

El ciclo sexual ocurre en células enteroepiteliales del huésped felino permanente y desemboca en la producción de ooquistes de *Toxoplasma*. Tras la infección primaria de un gato, los ooquistes pueden extenderse por las heces durante varios días. Los ooquistes esporulan en el medio ambiente durante los siguientes 1–5 días

(dependiendo de la aireación, la humedad y la temperatura), tras lo cual se convierten en infectivos. Son muy resistentes a las condiciones medioambientales y pueden permanecer infectivos durante un año o más. Los ooquistes esporulados tienen un diámetro de $11 \times 13 \mu\text{m}$ y cada uno de ellos contiene cuatro esporozoitos en cada uno de los dos esporoquistes (11). Cuando un animal susceptible ingiere ooquistes esporulados, se liberan los esporozoitos que penetran el recubrimiento intestinal, se convierten en taquizoitos y establecen la infección.

En ovejas, cabras, cerdos, caballos y hombre, los quistes de tejidos pueden permanecer durante el resto de la vida del individuo (11). Habitualmente no produce enfermedad clínica en el ganado vacuno, ni en camélidos o ciervos, pero, tal como se ha observado, pueden causar la muerte de monos del Nuevo Mundo, marsupiales, y algunos otros animales como las liebres (*Lepus europaeus*; *L. timidus*) (16), el gato de Pallas (2), el zorro del ártico (32), algunas aves (12) y mamíferos marinos (15). Se sugiere que estos y otros animales afectados de forma semejante han estado mínimamente expuestos a *T. gondii* en su hábitat natural durante periodos de tiempo muy largos, lo que les convierte en especialmente vulnerables al parásito.

El aborto de ovejas y cabras causado por *T. gondii* debe diferenciarse del provocado por otros agentes infecciosos, incluyendo las infecciones por *Chlamydomphila abortus* (véase el capítulo 2.7.7. Aborto enzoótico de ovejas), *Coxiella burnetii* (véase el capítulo 2.1.12. Fiebre Q), *Brucella melitensis* (véase el capítulo 2.7.2. Brucelosis caprina y ovina [excluyendo *Brucella ovis*]), *Campylobacter fetus* (véase el capítulo 2.4.5. Campilobacteriosis genital bovina), *Salmonella* spp. (véase el capítulo 2.7.2), Enfermedad de la Frontera (véase el capítulo 2.7.1), y los virus que causan la Lengua Azul, la enfermedad de Wesselsbron y la enfermedad de Akabane. En cerdos, *Brucella suis* (véase el capítulo 2.8.5.) puede causar también muerte fetal, momificación y aborto.

• Riesgos para la salud humana

Toxoplasma gondii infecta fácilmente a los seres humanos y, mientras la infección es relativamente común (aproximadamente el 30% de la población, dependiendo de la edad y del ambiente), la enfermedad clínica es relativamente inusual. Quienes de forma especial corren el riesgo de desarrollar la enfermedad clínica son las mujeres embarazadas, ya que el parásito puede plantear una seria amenaza para el feto si la madre resulta infectada por primera vez durante la gestación, y los individuos en estado de inmunosupresión, tales como los pacientes con trasplantes de tejidos, pacientes de SIDA, pacientes con ciertos tipos de cáncer y los que reciben ciertas formas de terapia contra el cáncer. Estos individuos corren el riesgo de desarrollar una infección aguda letal de no ser tratados. También pueden ser más susceptibles los niños y ancianos. En ocasiones, las personas sin inmunodeficiencia aparente pueden desarrollar una enfermedad caracterizada por un malestar general, fiebre y linfadenopatía. Las principales fuentes de infección humana son la ingestión de carne poco cocinada o cruda que contiene quistes tisulares de *T. gondii* vivos, la ingestión de verduras crudas o poco cocidas contaminadas con ooquistes o la exposición a ooquistes procedentes de heces de gato, que pueden encontrarse en jardines y en hoyos de arena de parques infantiles. A la toxoplasmosis también se la reconoce actualmente como zoonosis transmitida por el agua (10). Este método de transmisión ocurre allí donde el tratamiento del agua es ineficaz o inexistente y existe una cantidad apreciable de población local de felinos que contamina el agua de las superficies con ooquistes (1, 10). Ligado a lo anterior también se sabe actualmente que los mamíferos marinos se están infectando con aguas de terrenos contaminados y con aguas sucias urbanas sin tratar (15).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

a) Aislamiento

La mejor forma de aislar *T. gondii* procedente de fetos abortados ovinos y caprinos y de membranas fetales se realiza inoculando ratones de laboratorio. Los mejores tejidos para la inoculación son cerebro fetal y cotiledones placentarios, y los resultados óptimos se obtienen con muestras frescas libres de contaminación. Las muestras no deben congelarse en ningún momento puesto que el parásito moriría.

- i) Con precauciones asépticas, se recogen 2–5 g de cotiledón placentario o tejido cerebral del feto abortado.
- ii) Se homogeneiza el tejido en un volumen igual de 0,3 M de tampón salino fosfato estéril (PBS), pH 7,4, con adición de antibióticos (100 Unidades Internacionales [UI]/ml de penicilina y 745 UI/ml estreptomycin) en un homogeneizador “stomacher” (Seward Laboratory, Londres) u otro equipo de maceración adecuado. El tejido cerebral puede ser homogeneizado correctamente pasándolo diez veces a través de una aguja del calibre 16 mediante una jeringa.
- iii) Se inoculan por vía intraperitoneal tres ratones libres de *Toxoplasma* con 0,5 ml del tejido homogeneizado.

- iv) Se sacrifican los ratones 6–8 semanas después de la inoculación y se extraen sus cerebros. También debe conservarse la sangre en esta etapa y el suero se separa y congela a -20°C . Asimismo, deben recogerse los cerebros de los ratones que mueran antes de las 6–8 semanas.
- v) Se homogeniza cada cerebro de ratón con un volumen igual de PBS estéril pasándolo diez veces a través de una aguja del calibre 16 mediante una jeringa.
- vi) Se extiende una gota (5 μl) de una suspensión dada en cinco portas.
- vii) Se seca y se tiñe con Giemsa, se deshidrata y se monta bajo un cubreobjetos.
- viii) Los portas se examinan al microscopio. Los quistes tisulares aparecen como estructuras circulares que miden 5–50 μm rellenos de bradizoítos en forma de cuarto creciente y teñidos de azul.

Un método alternativo para examinar el cerebro de ratón consiste en tomar una pequeña porción de la parte delantera del cerebro (aproximadamente del tamaño de la cabeza de una cerilla) y aplastarla con un cubreobjetos. Los quistes tisulares se detectarán fácilmente con el microscopio.

Si los tejidos inoculados están fuertemente infectados con *T. gondii*, los ratones pueden morir al cabo de 1–2 semanas.

La ausencia de quistes tisulares no implica que se descarte un posible diagnóstico positivo. Se debe analizar el suero de los ratones para detectar la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma* (p. ej. utilizando una prueba de inmunofluorescencia indirecta [IFI]); si este análisis es también negativo, es improbable la infección por *Toxoplasma*.

b) Secciones de tejidos

En los animales que mueren de toxoplasmosis grave, se puede observar inflamación mononuclear focal, con o sin necrosis focal, en varios tejidos, como el hígado, el corazón y los pulmones. Estos últimos pueden estar edematosos. Los nódulos linfáticos pueden haberse expandido y puede que se produzca o no necrosis focal con o sin hemorragia. Lo típico es que los taquizoítos de *Toxoplasma* puedan observarse asociados con necrosis e inflamación.

En casos de aborto y de mortinatos en cabras y ovejas, es típico que los cotiledones placentales afectados contengan grandes focos de necrosis por coagulación, que pueden mineralizarse con el tiempo. También es típico que cualquier inflamación asociada sea moderada y no supurativa. Las muestras bien preservadas de cotiledones placentarios pueden mostrar un edema moderado del mesénquima de las vellosidades fetales con una hiper celularidad difusa debida a la presencia de grandes células mononucleares. A veces son visibles pequeñas cantidades de toxoplasmas intra- y extracelulares, normalmente en la periferia del área necrótica o en una vellosidad que está en las etapas tempranas de la infección. Los taquizoítos de *Toxoplasma* son ovoides, de 2–6 μm de largo, con núcleos moderadamente basófilos y localizados en el centro o hacia el extremo posterior.

En el cerebro fetal se pueden desarrollar lesiones primarias y secundarias. Los focos microgliales, típicamente con un centro necrótico y a veces mineralizado y frecuentemente asociado con una meningitis linfoidea focal leve, representan una respuesta inmune fetal después de un daño directo por la multiplicación local del parásito. Los quistes tisulares de *Toxoplasma* se encuentran solo raramente, casi siempre en la periferia de estas lesiones. También es frecuente la leucomalacia focal y se considera que es debida a la anoxia fetal en la etapa última de la gestación causada por las lesiones avanzadas en el placentoma que impiden la transferencia de suficiente oxígeno entre la madre y el feto. Estos focos se producen más comúnmente en los centros de sustancia blanca cerebral, pero a veces también en la sustancia blanca cerebelar. Esta leucomalacia focal sugiere por sí sola la enfermedad placentaria o la insuficiencia aguda, pero los dos tipos de cambios neuropatológicos, cuando se ven juntos, son típicos de la infección por *Toxoplasma*. La confirmación de la identidad de estructuras tipo *T. gondii* en secciones de tejido procedentes de tales casos, así como de ejemplos de toxoplasmosis grave puede llevarse a cabo por inmunohistoquímica que marca *T. gondii* intactos o restos antigénicos. El método es fácil y sensible y se emplea con tejidos fijados (incluyendo tejidos de archivo) que pueden también exhibir cierto grado de descomposición, de modo que en este caso el aislamiento no sería apropiado o posible. Son igualmente adecuados el método ABC indirecto de la inmunoperoxidasa y la técnica peroxidasa–antiperoxidasa (PAP) (34).

c) Métodos de reconocimiento del ácido nucleico

Se han desarrollado varias técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el ADN de *T. gondii*. Las regiones diana principales son la secuencia repetitiva B1 (3), el gen P30 (SAG1) (31) o el ARN ribosómico (ARNr) 18S (14). La sensibilidad de la PCR depende del número de copias de la secuencia diana (P30: 1 copia; B1: 35 copias; ARNr: 110 unidades repetidas). Se dispone comercialmente

de oligonucleótidos sintéticos de ADN personalizados (ej. www.sigma-genosys.co.uk). Recientemente, se ha utilizado el método de amplificación de la secuencia repetitiva B1 para analizar aspirados de lentes de pacientes humanos con cataratas infectados de forma congénita (25) y se halló que ese método es más sensible que el método convencional utilizado (enzimoinmunoensayo [ELISA]). No obstante, aunque la PCR es extremadamente sensible, en caso de ser ese el único método disponible, se obtendrá un diagnóstico más fiable si se utiliza en combinación con otros datos de diagnóstico,

Recientemente se ha elaborado una PCR en tiempo real para la cuantificación y amplificación de ADN. Es muy parecida a otros métodos PCR en uso y puede realizarse en placas de microtitulación de 96 pocillos. Tras cada ronda de amplificación, los tintes fluorogénicos se intercalan con el ADN bicatenario y los resultados, mostrados en una representación gráfica de la amplificación, permiten la cuantificación del ADN del parásito de la muestra. Se ha utilizado la PCR en tiempo real para amplificar y cuantificar el ADN del gen B1 de *T. gondii* (7, 23). Esta cuantificación del ADN del parásito puede utilizarse para establecer el número de parásitos en los tejidos y los líquidos, tales como el líquido amniótico de pacientes sospechosos de infección congénita por *T. gondii*. (27). La PCR en tiempo real es un método muy sensible y específico; no obstante es caro y requiere sistemas de detección especializados, por lo que la relación precio/coste solo se justifica si se utiliza en laboratorios en los que se analizan grandes cantidades de muestras.

El método siguiente es una forma combinada de la PCR, que amplifica la secuencia de ADN repetitiva B1 (36). El ADN del parásito puede extraerse y purificarse a partir de varios tejidos, incluyendo la placenta, el sistema nervioso central, el corazón y el músculo esquelético.

Se retiran los glóbulos rojos contaminantes de los tejidos lavando en tampón de lisis Tris/NH₄ Cl 10 mM, pH 7,6, y a continuación se centrifugan a 2.000 *g* durante 15 minutos. Entonces se extrae el ADN a partir del sedimento resultante y se resuspende en Tris 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM que contenga 100 µg/ml de proteinasa K y Tween 20 al 0,5%.

Las muestras se incuban a 55°C durante al menos 1 hora; entonces se inactiva la proteinasa K mediante ebullición. El procedimiento de la PCR se realiza en volúmenes de 50 µl. La amplificación del gen B1 se lleva a cabo según una modificación del procedimiento descrito en la ref. 1. La mezcla de reacción contiene Tris 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 2,5 mM, KCl 40 mM, gelatina al 0,01%, dNTPs 0,1 mM, 0,2 µM de cada cebador (los oligonucleótidos cebadores se describen en la ref. 1), dos cebadores sentido P1 y P2 y dos antisentido P3 y P4) y 2,5 unidades de polimerasa Taq.

La amplificación primaria se realiza con los cebadores 1 y 4 dando un producto de 193 pb después de 25 ciclos a 93°C durante 1 minuto, 50°C durante 1,5 minutos y 72°C durante 3 minutos. El producto amplificado se diluye entonces al 1/20 en agua destilada para reducir la amplificación de los productos no específicos.

La amplificación secundaria utilizando los cebadores internos 2 y 3 y las mismas condiciones de reacción, se lleva a cabo en 15 ciclos dando un producto de 94 pb. Entonces se visualiza el producto final en geles de agarosa a 1%. Se puede emplear un ensayo tipo Southern utilizando una sonda marcada para confirmar la identidad de los productos B1 de la PCR y distinguirlos de los productos no específicos.

d) Detección de ooquistes en agua potable

Se han detectado ooquistes de *Toxoplasma gondii* en agua potable utilizando el método para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* (18). El método se basa en la recogida de una muestra de agua de gran volumen y en pasarla por un filtro de cartucho. La detección de ooquistes de *Toxoplasma* se realizó mediante la inoculación de rumiantes. (rodents)

2. Pruebas serológicas

Se dispone de diversas pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a *T. gondii*. En un tipo de prueba el observador juzga el color de los taquizoítos al microscopio, tal como sucede con la prueba de tinción (DT) y la prueba IFI. Otra prueba depende del principio de aglutinación de taquizoítos de *Toxoplasma*, glóbulos rojos o partículas de látex, como sucede con la prueba de aglutinación directa (PAD), la prueba de aglutinación indirecta (IHA) y la prueba de aglutinación con látex (LA), respectivamente. Con el ELISA, el cambio en la intensidad de color define la cantidad de anticuerpo específico en una solución dada. Las pruebas DT, IFI, PAD y ELISA se especifican más adelante, indicándose la prueba IFI con más detalle.

La prueba serológica DT (29) se considera el "patrón de oro" para anticuerpos anti-*Toxoplasma* en humanos. Los taquizoítos vivos de *Toxoplasma* se incuban con un factor accesorio tipo complemento y el suero problema a 37°C durante 1 hora antes de añadir azul de metileno. Los anticuerpos específicos inducen la permeabilización de la membrana del parásito de modo que el citoplasma se derrama y los taquizoítos no incorporan el colorante de modo que aparecen incoloros. Los taquizoítos no expuestos al anticuerpo específico (p. ej. una muestra de suero negativo) incorporan el colorante y aparecerán azules. La prueba DT es al mismo tiempo sensible y

específica en humanos, pero podría ser impracticable en otras especies. Además es potencialmente peligrosa puesto que se emplea el parásito vivo. Es costosa y requiere un alto grado de experiencia técnica. Debe tenerse en cuenta que, por motivos de bienestar animal, en la medida de lo posible, los taquizoítos deben cultivarse en cultivo de tejidos en lugar de hacerlo en el peritoneo de los ratones.

La prueba IFI (26) es un método simple y se utiliza ampliamente. Los taquizoítos intactos y muertos de *Toxoplasma* se incuban con el suero problema diluido, se añade el antisuero específico anti especie fluorescente apropiado, y el resultado se visualiza entonces con un microscopio de fluorescencia. Se dispone comercialmente de anticuerpos marcados con fluorescencia para una variedad de especies animales; el método es relativamente económico y se encuentran disponibles comercialmente los kits adecuados. Sin embargo, el método requiere un microscopio de fluorescencia y como los datos son interpretados visualmente, se pueden producir variaciones subjetivas. Puede resultar difícil encontrar algunos conjugados específicos de las especies y existe riesgo de una posible reacción cruzada con anticuerpos frente al factor reumatoide y con anticuerpos antinucleares.

La prueba PAD (49) es sensible y específica. Se añaden taquizoítos formalinizados de *Toxoplasma* a pocillos con forma de U de placas de microtitulación y se aplican las diluciones de los sueros problema. Las muestras positivas producirán aglutinación que puede ser variable, mientras que las muestras negativas producirán un botón de taquizoítos sedimentados en el fondo del pocillo. La prueba es simple y fácil de realizar aunque se requieren cantidades relativamente grandes de antígenos. Se dispone de kits comerciales. Más adelante se indica el método de crecimiento y recogida de los parásitos. También está disponible en el mercado una prueba de aglutinación con látex (PAL). Las PAD y las PAL no son específicas de especie y son adecuadas para su utilización con todas las especies.

La técnica original ELISA (35) utiliza una preparación de antígeno soluble realizada con taquizoítos de la cepa de *Toxoplasma* RH (como se describe más adelante) y se coloca en pocillos de una placa de microtitulación. Se añaden los sueros problema (p. ej. ovino en origen), seguido de un conjugado anti-especie marcado con un enzima como puede ser IgG anti-ovina marcada con peroxidasa de rábano. Cualquier conjugado adherido causa un cambio de color en el sustrato que es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido y puede ser leído con un espectrofotómetro a la absorbancia específica del sustrato empleado. La técnica es simple, permite ensayar un gran número de muestras y es fácil de realizar con el conjugado anti-especie elegido. Se dispone comercialmente de conjugados anti-especies, sustratos y kits completos. Sin embargo la técnica requiere un espectrofotómetro. La técnica ELISA es idónea para laboratorios que analizan gran número de muestras.

Recientemente se ha elaborado un ELISA cinético (KELA) (37). El sistema KELA sirve para medir la tasa de reacción entre el enzima ligado y la solución de sustrato que provoca el desarrollo del color. Se leen tres densidades ópticas (DO) a intervalos de 45 segundos (utilizando el programa de manejo de datos KELA) y se presentan los resultados en forma de pendientes. Se da una correlación muy alta entre el ELISA y el KELA, y, por tanto, las dos pruebas constituyen excelentes herramientas de diagnóstico.

A fin de mejorar la especificidad del ELISA convencional, se han elaborado pruebas para utilizar en ovejas (30, 33), en las que se utilizan antígenos recombinantes (19) y antígenos específicos de *Toxoplasma* purificados por afinidad (22), pero estas pruebas no se utilizan aún de forma rutinaria.

Con el ELISA convencional, la detección de anticuerpos de IgG e IgM específicos para *Toxoplasma* permite un cierto grado de discriminación entre la toxoplasmosis grave y la crónica. Más recientemente se han elaborado pruebas de avidéz. A medida que madura la respuesta inmune, después de haberse establecido la infección, se desarrollan anticuerpos con avidéz creciente (afinidad funcional) de antígenos. Esa avidéz puede medirse y utilizarse para indicar una infección por *T. gondii* activa o reciente. Se ha elaborado una prueba para la detección de la avidéz de IgG por el antígeno P30 de *T. gondii* en ovejas (30). Esta prueba es una buena herramienta de diagnóstico para diferenciar las infecciones relativamente recientes de las más antiguas.

- **Preparación de antisueros y antígenos**

Se pueden obtener comercialmente antisueros contra *T. gondii* y antisueros conjugados para las pruebas IFI y ELISA, lo que permite muestrear una variedad de especies animales. No se dispone de patrones internacionales para sueros animales.

Más adelante se indican los protocolos a seguir en la preparación del antígeno del taquizoíto para su utilización en las pruebas IFI y ELISA. Los taquizoítos se pueden cultivar en ratones o en cultivo de tejidos y se mantienen intactos para la prueba IFI o se preparan como antígeno soluble para la técnica ELISA.

- **Producción de taquizoítos de *Toxoplasma* en ratones**

- i) Se inyectan seis ratones libres de *Toxoplasma* por vía intraperitoneal utilizando una jeringa de 1 ml y una aguja del calibre 23, con 0,2 ml de 1×10^7 /ml de taquizoítos de *T. gondii* de la cepa RH, se recogen frescos a partir de un pase previo por ratón o a partir de cultivo de tejidos. (Para la

recuperación óptima de los taquizoítos tomando el mínimo número de células mononucleares del hospedador, los ratones deben tener más de 6–8 semanas de vida y pesar aproximadamente 22–25 g.)

- ii) Se sacrifican los ratones 3 días más tarde mediante inhalación de CO₂ (debe evitarse la dislocación cervical porque puede causar contaminación del fluido peritoneal con glóbulos rojos).
- iii) Se fija el ratón de espaldas sobre una superficie de corcho limpia. Se separa asépticamente la piel abdominal, se extrae cualquier fluido peritoneal con una aguja de calibre 21 unida a una jeringa de 1 ml y se expulsa suavemente el exudado recogido en un volumen igual de PBS.

El momento óptimo de recoger los taquizoítos es 72 horas después de la inoculación inicial, momento en el que habrá organismos suficientes, pero antes de que exista contaminación significativa de las células hospedadoras. También es importante no posponer la recogida del fluido peritoneal más allá de 3 días desde la muerte de los ratones. (Si los taquizoítos para la inoculación del ratón se toman a partir de muestras estabilizadas congeladas, podría ser necesario recoger los ratones 4 o 5 días después de la inoculación inicial y realizar un pase del parásito una vez más a través de ratones antes de ser utilizados como antígeno en las pruebas indicadas anteriormente.)

- iv) Se centrifuga el fluido a 500 **g** durante 5 minutos, se aspira el sobrenadante y se resuspende en una solución salina equilibrada de Hanks (HBSS). Se alternan lavados en PBS y HBSS por centrifugación.
- v) Se calcula la concentración de taquizoítos y células hospedadoras contaminantes con una cámara de recuento Neubauer mejorada (El recuento de taquizoítos se realiza a una dilución 1/1.000 y la contaminación celular a una dilución 1/10).
- vi) Se llevan a cabo lavados posteriores (etapa (iv) anterior) cuando sea necesario para reducir la contaminación celular a <0,5% de células mononucleares y <0,25% de glóbulos rojos.
- vii) Se resuspenden los taquizoítos en PBS hasta alcanzar una concentración final de 1×10^7 /ml.
- viii) Los taquizoítos se pueden mantener de esta manera por pases continuos sin necesidad de adicionar penicilina/estreptomicina, siguiendo procedimientos asépticos estrictos.

• **Preparación de alícuotas de taquizoítos de *T. gondii* estabilizadas y congeladas**

- i) Los taquizoítos se consiguen a partir de ratones o cultivos de tejidos como ya se ha descrito.
- ii) Se centrifugan a 500 **g** durante 5 minutos y se resuspenden en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Gibco BRL, Paisley, Gran Bretaña) aproximadamente tres veces.
- iii) Se añaden las siguientes soluciones hasta conseguir estas concentraciones: dimetil sulfoxido al 10%; suero de caballo normal al 20% (libre de anticuerpos frente a *T. gondii*); taquizoítos resuspendidos al 70% hasta una concentración final de 1×10^8 taquizoítos/ml.
- iv) La preparación debe permanecer estática durante 1 hora.
- v) Se distribuyen alícuotas de 1ml en tubos de tapón de rosca apropiados para el almacenamiento en nitrógeno líquido.
- vi) Se introducen los tubos en un pequeño contenedor. Se envuelven en un material aislante grueso y se colocan en un congelador a –70°C hasta conseguir que los taquizoítos se congelen gradualmente.
- vii) Al día siguiente se transfieren a nitrógeno líquido, manteniéndolos bien aislados mientras se transfieren.
- viii) Este material estabilizado puede ser empleado para inocular ratones o cultivar el parásito en cultivo de tejidos. Cuando se saca del congelador, la muestra se descongela rápidamente en agua templada.

• **Producción de taquizoítos de *Toxoplasma* en cultivos de tejidos**

- i) Se puede cultivar *Toxoplasma gondii* y mantener en cultivo de tejidos mediante pases dos veces por semana en células de riñón de mono verde africano (Vero).
- ii) Las células y el parásito se cultivan en medio IMDM suplementado con 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y suero fetal bovino al 2%.
- iii) Los taquizoítos se recogen a partir de frascos de cultivo de tejidos raspando la monocapa celular mediante un raspador celular estéril.

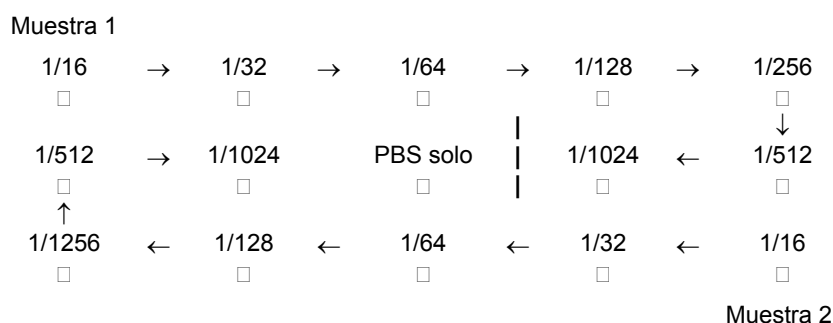
- iv) Se emplean frascos de cultivo de tejidos de 25cm² que han sido sembrados con 1×10^5 células Vero, se añaden taquizoítos en una relación de dos taquizoítos por célula de la monocapa y se incuban a 37°C en un incubador con atmósfera humidificada y un 5% de CO₂. Se recogen después de 3–4 días.
- **Preparación de taquizoítos intactos para ser utilizados en la prueba IFI**
 - i) Se prepara una suspensión de 4×10^7 /ml taquizoítos de la cepa de *T. gondii* RH en PBS.
 - ii) Se añade formaldehído (40%) hasta conseguir una concentración final de 0,2% (v/v).
 - iii) Se incuba a 4°C durante toda la noche y se divide en alícuotas empleando tubos cerrados adecuadamente que se mantienen congelados hasta su uso.
 - **Producción de antígeno soluble para la técnica ELISA**
 - i) Se prepara una suspensión de taquizoítos de la cepa de *T. gondii* RH en PBS.
 - ii) Se centrifuga a 2.000 **g** durante 15 minutos, se conserva el precipitado y se resuspende en nueve veces su volumen en agua destilada.
 - iii) Se rompen los taquizoítos mediante tres ciclos de congelación y descongelación.
 - iv) Entonces se sonica la preparación de antígeno durante 20 segundos a 4°C y una amplitud de 20 micras.
 - v) Se extrae cualquier residuo celular mediante centrifugación a 10.000 **g** durante 30 minutos a 4°C.
 - vi) Se retiene el sobrenadante y se conserva a –20°C hasta su uso. (La estimación de proteínas esperada tiene un valor de entre 2 y 4 µg/ml.)
 - **Protocolo para la prueba IFI**

El siguiente es un protocolo para realizar una prueba IFI de detección de anticuerpos IgG anti*Toxoplasma* en suero ovino. Solo requiere pequeñas modificaciones para las pruebas en diferentes especies o para la medida de anticuerpos IgM.

 - i) Se limpia el número necesario de portas multiprueba de 15 pocillos para cultivo de tejidos (laboratorios Flow) y se deja secar.
 - ii) Se colocan 5 µl de una preparación de taquizoítos intactos en cada pocillo y se dejan secar.
 - iii) Se fijan en metanol durante 10 minutos.
 - iv) Se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno en 0,3 M de PBS, pH 7,4.
 - v) Se añaden 5 µl del suero ovino problema (diluido en PBS) a cada pocillo. (Se preparan diluciones seriadas de los sueros problema, p. ej. 1/16, 1/32, etc. hasta 1/1.024.) Se debe incluir un suero control positivo y negativo en cada prueba así como una muestra con “solo PBS”. Se incuban 30 minutos a temperatura ambiente.
 - vi) Se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
 - vii) A cada pocillo se añaden 5 µl de una dilución apropiada de IgG de conejo anti-oveja conjugada a isotiocianato de fluoresceína, diluidos en colorante azul de Evan filtrado al 2% en PBS, y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - viii) Se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS.
 - ix) Se colocan los portas bajo cubreobjetos con glicerol tamponado (nueve partes de PBS y una de glicerol) o Citifluor (Citifluor Ltd, Londres).
 - x) Se examina mediante un microscopio de fluorescencia, provisto de objetivos de $\times 20$ y de $\times 40$.

Con un resultado negativo del suero problema los parásitos intactos aparecerán rojos debido a la autofluorescencia del colorante azul de Evan. También pueden presentar un casquete fluorescente verde en un extremo del parásito (fluorescencia polar no específica). Con un suero problema positivo los parásitos presentarán fluorescencia roja y al menos el 80% de ellos en un pocillo dado estarán rodeados por una banda continua de fluorescencia verde. En una oveja/cabra adulta un título se considerará positivo cuando los pocillos muestren resultado positivo a diluciones $\geq 1/64$ y será negativo a diluciones $\leq 1/32$. Para crías de cordero y suero fetal, los títulos serán $\geq 1/32$ y $\leq 1/16$, respectivamente.

A continuación se indica un ejemplo de sistema en porta:



C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

La única vacuna disponible es una preparación viva producida comercialmente para ovejas (Toxovax, Intervet BV, Países Bajos; Toxovax, AgVax, Ag Research, Nueva Zelanda), y actualmente con licencia de uso en Gran Bretaña, Irlanda, Francia, Portugal, España y Nueva Zelanda. Consiste en el cultivo de tejidos en el que se desarrollan taquizoítos de *T. gondii* S48 atenuados por más de 3.000 pases en ratones. La vacuna estimula la inmunidad protectora efectiva durante al menos 18 meses después de una única inyección subcutánea, pero, como es incapaz de producir quistes tisulares, las ovejas no permanecen con una infección vacunal persistente. La vacuna tiene un corto periodo de validez y supone un riesgo potencial para individuos inmunodeprimidos y hembras en estado de gestación (4). La vacuna debe guardarse y utilizarse siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante, de modo que nunca debe congelarse, debe mantenerse en refrigeración (4°C) y protegida de la luz solar. Deberá añadirse el diluyente a la suspensión concentrada de taquizoítos inmediatamente antes de usarse.

REFERENCIAS

1. BOWIE W.R., KING A.S. WERKER D.H., ISAAC-RENTON J.L., BELL A., ENG S.B.V & MARION S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, **350**, 173–177.
2. BROWN M., LAPPIN M.R., BROWN J.L., MUNKHTSOB B. & SWANSON W.F. (2005). Exploring the ecological basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J. Wildlife Dis.*, **41**, 691–700
3. BURG J.L., GROVER C.M., POULETTY P. & BOOTHROYD J.C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1787–1792.
4. BUXTON D. (1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, **9**, 335–337.
5. BUXTON D. (2000). Toxoplasmosis and neosporosis. *In: Diseases of Sheep*, Martin W.B. & Aitken I.D., eds. Blackwell Science, Oxford, UK, 86–94.
6. CANFIELD P.J., HARTLEY W.J. & DUBEY J.P. (1990). Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. *J. Comp. Pathol.*, **103**, 159–167.
7. COSTA J.M., PAUTAS C., ERNAULT P., FOULET F., CORDONNIER C. & BRETAGNE S. (2000). Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2929–2932.
8. CUNNINGHAM A.A., BUXTON D. & THOMSON K.M. (1992). An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Pathol.*, **107**, 207–219.
9. SABIN A.B. & FELDMAN H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**, 660–663.
10. DUBEY J.P. (2004). Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, **126**, 57–72.
11. DUBEY J.P. & BEATTIE C.P. (1988). *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

12. DUBEY J.P., GARNER M.W., WILLETTE M.M., BATEY K.L. & GARDINER C.H. (2001). Disseminated toxoplasmosis in magpie geese (*Anseranas semipalmata*) with large numbers of tissue cysts in livers. *J. Parasitol.*, **87**, 219–223.
13. DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E. & HIDE G. (2001). High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 1699–1703.
14. ELLIS J.T. (1998). Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1053–1060.
15. FAYER R., DUBEY J.P. & LINDSAY D.S. (2004). Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitol.*, **20**, 531–536.
16. GUSTAFSSON K. & UGGLA A. (1994). Serologic survey for *Toxoplasma gondii* infection in the brown hare (*Lepus europaeus*) in Sweden. *J. Wildlife Dis.*, **30**, 402–407.
17. HOWE D.K. & SIBLEY D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Inf. Dist.*, **172**, 1561–1566.
18. ISAAC-RENTON J., BOWIE W.R., KING A., IRWIN G.S., ONG C.S., FUNG C.P., SHOKEIR M.O. & DUBEY J.P. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied Environ. Microbiol.*, **64**, 2278–2280.
19. JOHNSON A.M. & ILLANA S. (1991). Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. *Gene*, **99**, 127–132.
20. KHAN A., BÖHME U., KELLY K.A., ADLEM E., BROOKS K., SIMMONDS M., MUNGALL K., QUAIL M.A., ARROWSMITH C., CHILLINGWORTH T., CHURCHER C., HARRIS D., COLLINS M., FOSKER N., FRASER A., HANCE Z., JAGELS K., MOULE S., MURPHY L., O'NEIL S., RAJANDREAM M.A., SAUNDERS D., SEEGER K., WHITEHEAD S., MAYR T., XUAN X., WATANABE J., SUZUKI Y., WAKAGURI H., SUGANO S., SUGIMOTO C., PAULSEN I., MACKEY A.J., ROOS D.S., HALL N., BERRIMAN M., BARRELL B., SIBLEY L.D. & AJIOKA J.W. (2006). Common inheritance of chromosome associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res.*, **16**, 1119–1125.
21. KIJLSTRA A., EISSEN O.A., CORNELISSEN J., MUNNIKSMA K., EIJCK I. & KORTBEEK T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **45**, 3165–3169.
22. LEKUTIS C., FERGUSON D.J., GRIGG M.E., CAMPS M. & BOOTHROYD J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.*, **112**, 1–10.
23. LIN M.H., CHEN T.C., KUO T., TSENG C.C. & TSENG C.P. (2000). Real-Time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4121–4125.
24. LIND P. & BUXTON D. (2000). Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In: Congenital Toxoplasmosis; Scientific Background, Clinical Management and Control, Ambroise-Thomas P. & Petersen E., eds. Springer, Paris, France, 261–269.
25. MAHALAKSHIMA B., THERESE K.L., SHYAMALA G., DEVIPRIYA U & MADHAVAN H.N. (2007). *Toxoplasma gondii* detection by nested polymerase chain reaction in lens aspirate and peripheral blood leukocyte in congenital cataract patients: The first report from a tertiary eye hospital in India. *Curr. Eye Res.*, **32**, 653–657.
26. MUNDAY B.L. & CORBOULD A. (1971). The application of the *Toxoplasma* indirect fluorescent-antibody test to sheep sera. *Aust. J. Med. Technol.*, **2**, 3–6.
27. NAGY B., LÁZÁR L., NAGY G., BÁN Z. & PAPP Z. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using quantitative real-time PCR method. *Orv. Hetil.*, **148**, 935–938.
28. RODGER S.M., MALEY S.W., WRIGHT S.E., MACKELLAR A., WESLEY F., SALES J. & BUXTON D. (2006). Ovine toxoplasmosis; the role of endogenous transmission. *Vet. Rec.*, **159**, 768–772.
29. SABIN A.B. & FELDMAN H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, **108**, 660–663.
30. SAGER H., GLOOR M., TENTER A., MALEY S., HÄSSIG M. & GOTTSSTEIN B. (2003). Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol. Res.*, **91**, 171–174.
31. SAVVA D., MORRIS J.C., JOHNSON J.D. & HOLLIMAN R.E. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.*, **32**, 25–31.

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

*

* *