

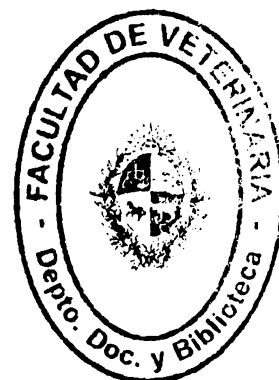
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**TRANSMISIÓN DE LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA EXPERIMENTAL EN
EL MODELO COBAYO**

por

Adriana MAGNIN



TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias. (Orientación Tecnología, Higiene, Inspección y Control de los Alimentos de origen Animal)

MODALIDAD: Ensayo Experimental

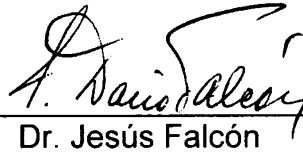
MONTEVIDEO
URUGUAY
2012




FV-29657

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa


Dr. Jesús Falcón

Segundo Miembro (Tutor)


Dr. Alvaro Freyre
Prof. Agdo. Parasitología

Tercer Miembro


Dr. Rodrigo Puentes

Fecha:

Jueves, 18 de Octubre del 2012.-

Autor:


Adriana Magnin

FACULTAD DE VETERINARIA
Aprobado con 10 (diez) 

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Álvaro Freyre, tutor de la presente tesis, por su paciente instrucción, guía y apoyo en este trabajo experimental.

Al Instituto de Higiene por proporcionar los Animales objeto de la presente tesis y permitirme trabajar en sus instalaciones.

Al Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria y su gente por acompañarme, enseñarme y apoyarme en el tiempo de realización del presente ensayo.-

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
Los modelos vaccinales contra Toxoplasmosis.....	9
Modelo Ratón.....	10
Modelo Rata.....	11
Modelo Hámster.....	13
Modelo Cobayo.....	14
Ensayo en Corderos.....	14
Vacunas Existentes.....	14
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Diseño Experimental.....	16
Materiales.....	16
Animales.....	16
Cepa de Toxoplasma.....	17
Métodos.....	17
Concepción y diagnóstico de Gestación de Cobayas.....	17
Obtención de ooquistes de Toxoplasma.....	17
Enumeración de Ooquistes.....	18
Desafío de Cobayas.....	18
Detección de Infección Transplacentaria.....	18
Análisis Estadístico.....	18
Medidas de protección biológica de los operadores.....	18
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	19
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	20
ANEXO.....	26

LISTA DE CUADROS

Cuadro N°1 – Transmisión de Toxoplasma en cobayas no inmunes inoculadas con 10^3 ooquistes de la cepa Prugniaud per os.

Cuadro N° 2 - Transmisión de Toxoplasma en cobayas no inmunes inoculadas con 10^2 ooquistes de la cepa Prugniaud per os.

RESUMEN

Las pérdidas por aborto ovino toxoplásmico son de 10 millones de dólares anualmente en el Uruguay. Suceden de 1 a 3 casos de toxoplasmosis congénita cada mil niños nacidos vivos en el Uruguay. Como las secuelas perduran en muchos casos, se acumulan las generaciones, con lo cual existiría una subpoblación en el entorno de las 5000 a 8000 personas afectadas de secuelas de toxoplasmosis. Una situación similar se da en otros países productores de lana, y en casi todos los países del globo, respectivamente. La vacunación es un método de elección para la prevención de la toxoplasmosis. La vacuna existente contra el aborto ovino toxoplásmico es altamente perfectible. No existen vacunas para humanos. En esta tesis se ensayó la transmisión congénita de *Toxoplasma* en el modelo cobayo, originada por dos dosis diferentes de ooquistes del parásito. Con ambas dosis se logró una tasa de transmisión eficiente. Dicha transmisión corresponderá a los futuros desafíos vaccinales, en el esquema completo de indagación de la protección vaccinal. El modelo cobayo interesa por la posibilidad de investigar la duración de la protección vaccinal, en una especie de vida fértil relativamente prolongada.

SUMMARY

The measurable losses due to toxoplasma abortion in sheep amount 10 million dollars per year in Uruguay. 1-3 every 1,000 babies are born with toxoplasmosis each year in Uruguay. Since many of them remain with sequelae, the generations accumulate, and so, a subpopulation of 5,000 to 8,000 people with sequelae of toxoplasmosis, can be calculated. Similar proportional estimations are found in most countries of the world. Vaccination is a method of choice to prevent toxoplasmosis. The vaccine against Toxoplasma sheep abortion is largely improvable. There is not a Toxoplasma vaccine for humans. In the present research, congenital transmission of toxoplasmosis in a guinea pig model was investigated. High rates of transmission were achieved by infections originated with two different doses of oocysts . Such transmission is the equivalent of the challenge dose in future research on a complete schedule of vaccinal protection in the model. The guinea pig model is interesting because of its long period of fertility, enabling for the testing of long-lasting immunity.

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un protozoo perteneciente al *Phylum Apicomplexa*, con más de 200 huéspedes intermediarios que portan la forma quística en el encéfalo y en la musculatura. Esta circunstancia convierte a la carne contaminada con el parásito como una de las dos fuentes principales de infección con el parásito, si es consumida insuficientemente cocida o cruda. La otra fuente de infección son los ooquistes emitidos con las heces de los gatos una sola vez en su vida. Estas formas de gran resistencia al medio ambiente pueden ser ingeridas por los animales con las pasturas, o por el hombre, con las verduras mal lavadas. Una vez en el interior del huésped intermediario, *Toxoplasma* se disemina por todo el organismo. Aquellos animales que no sucumben a la infección, pasan a tener la infección en estado latente. Esto es importante por la reactivación que pueden sufrir las personas que se inmunodeprimen.

En el humano, *Toxoplasma* es importante por las lesiones que ocasiona al feto en el 50% de las madres que tienen la primoinfección durante la gestación; por las lesiones de coriorretinitis, así como por los cuadros de linfadenitis adquirida (transitoria), que es la forma que adopta en el 15% de las personas comunes (no gestantes ni inmunosuprimidas). En el resto de la gente común, la infección pasa desapercibida (Dubey and Beattie, 1988; Freyre y Falcón, 1989)..

En Uruguay nacen cerca de 150 niños toxoplásmicos anualmente (Conti-Diaz et al, 1998; Freyre et al, 1992). La mayoría de ellos desarrolla lesiones de coriorretinitis ocular o sufren retraso intelectual más adelante. (Freyre y Falcón, 1989; Remington and Desmonts, 1990). La prevención de la toxoplasmosis humana congénita se efectúa sobre la base de la detección de la infección durante la gestación, y el tratamiento de las madres detectadas infectadas. Si embargo, muchas madres comienzan la vigilancia serológica en etapas considerablemente avanzadas de su gestación; sólo una parte de ellas regresa para volverse a chequear serológicamente, y con frecuencia no se interpretan correctamente los resultados serológicos (Remington and Desmonts, 1990).

En veterinaria, la toxoplasmosis adquiere importancia principalmente por ser el agente de aborto ovino infeccioso más frecuente en Uruguay. En el Uruguay, es responsable de pérdidas económicas en la industria ovina por valor de 10 millones de dólares anuales (Freyre et al 1996; Freyre et al, 1999 a). Asimismo, la prevalencia de la infección del ganado ovino en el Uruguay, que se sitúa en el entorno del 25% (Freyre et al, 1996), es fuente de infección humana, cuando se consume su carne insuficientemente cocida (Freyre y Falcón, 1989).

Los perjuicios explicados se pueden prevenir mediante el uso de una vacuna, tanto en la esfera humana como en la producción ovina, con ventajas sobre otros medios preventivos.

Existe un método de profilaxis medicamentosa del aborto ovino, consistente en el agregado de monensin a la ración (Buxton, 1987). Sin embargo, este método no es aplicable en países como Uruguay, en el que los ovinos son mantenidos en un sistema de pastoreo extensivo, y el suministro de ración es totalmente excepcional. Existe asimismo una vacuna que ayuda a disminuir las pérdidas por el aborto ovino toxoplásmico (Buxton, 1993), pero que es altamente perfectible (los motivos se explican más adelante).

La aplicación de una vacuna para prevenir la toxoplasmosis congénita humana es una idea sostenida por mucho investigadores (Dubey y col., 1996; Freyre y Falcón, 1989; Freyre, 1998; Innes et al, 2009; Jongert y col., 2009; Nielsen, 2002). No obstante, no hay vacunas antitoxoplásmicas aplicables a la gente, actualmente. Uno de los métodos existentes para la profilaxis de la toxoplasmosis congénita humana, es el seguimiento seroinmunológico de la embarazada para toxoplasmosis, y su eventual medicación (Remington and Desmots, 1990). Se trata de un método de prevención secundaria, y el tratamiento de la embarazada muchas veces sólo limita las lesiones ya producidas por *Toxoplasma*. También es un método cuyo éxito depende de la precocidad del ingreso de la embarazada al sistema asistencial, circunstancia que generalmente se ve demorada en los estratos sociales más pobres (Conti-Diaz et al, 1998). Otro método es el de la educación sanitaria, cuya instalación adecuada y eficaz no carece de costos importantes (Remington and Desmots, 1990), al igual que el método anterior. La vacunación superaría con creces estos inconvenientes, por la certeza de su eficacia, su bajo costo económico y la posibilidad de ser aplicada antes del embarazo (Freyre y Falcón, 1989; Remington and Desmots, 1990; Dubey, 1996; Freyre, 1998).

REVISION BIBLIOGRÁFICA:

“EL USO DE MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD PROTECTORA CONTRA LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA”.

Los modelos vaccinales contra la toxoplamosis

El esquema básico para el ensayo de un inmunógeno experimental en animales de laboratorio, contra la toxoplasmosis congénita, consiste en inmunizar un

grupo de hembras de la especie elegida con dicho inmunógeno, y dejar transcurrir cierto tiempo durante el cual se establecerá la inmunidad específica. Luego se facilita la gestación de las hembras inmunizadas y se desafían dichas hembras con una o más cepas y uno o más estadios de *Toxoplasma* por vez, durante la gestación. Al nacimiento, se inoculan muestras de los tejidos de los recién nacidos en ratones adultos libres de infección toxoplásmica. Tras un período mínimo de 25 días se sangran los ratones receptores y se determina la presencia de anticuerpos específicos contra *Toxoplasma*. Si existió protección vaccinal, los ratones receptores serán seronegativos.

Se han utilizado distintas especies de laboratorio para indagar la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita. Existen modelos de protección contra desafíos mortales de *Toxoplasma*, contra la formación de quistes cerebrales del parásito, y contra la transmisión de la toxoplasmosis congénita. Esta última es la circunstancia más relevante, tanto en la oveja como en la mujer.

El uso del ratón para el modelo de toxoplasmosis congénita.

Los primeros estudios realizados con el modelo ratón datan de 1988 (McLeod et al, 1988). Esta investigadora inmunizó ratonas Swiss Webster con la mutante ts-4 de *Toxoplasma*. Lamentablemente utilizaron una dosis de desafío desproporcionada en relación al peso corporal del ratón. Ello fué posiblemente la causa de la escasa protección obtenida. Mas tarde, Roberts y Alexander (1992) establecen que no hay transmisión congénita de la toxoplasmosis durante la etapa crónica de la infección en ratones. Los resultados de los experimentos llevados a cabo por F. Safern (2003) en su tesis de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, sugieren que en el modelo ratón la transmisión de la infección crónica durante la gestación sucede en una escala muy moderada. Roberts y Alexander (1992) demuestran la transmisión de la toxoplasmosis durante la etapa aguda en 5 de 6 ratonas gestantes. Asimismo, establecen la protección contra un desafío homólogo en 9 ratonas. En una publicación posterior, Roberts et al (1994) ensayan una subunidad antigénica como inmunógeno en este modelo, con buenos resultados, aun cuando no han confirmado ni expandido sus resultados al presente. Seguidamente, se determina que hay una susceptibilidad aumentada a la toxoplasmosis en la ratona preñada, y que la respuesta inmunológica es de tipo 2- dependiente (Roberts et al, 1994).

Existen mas recientemente nuevos estudios de protección vaccinal contra la toxoplasmosis congénita en ratones, que aportan nueva información (Thouvenin et al, 1997; Elsaid et al, 2001; Letscher-Brou et al, 2001; Mohamed et al, 2003; Mevelec et al, 2005), pero la investigación de Roberts et al. en 1994 continúa siendo la única que ha dado resultados auspiciosos.

En Uruguay: El modelo ratón para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita se ha venido perfeccionando en el Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Montevideo (FV), a través de un conjunto de tesis de grado ya defendidas y plasmadas en una publicación (Freyre et al, 2006a). Los resultados de los experimentos llevados a cabo por Safern (2003) sugieren que en el modelo

ratón, la transmisión de la infección toxoplásmica crónica durante la gestación sucede en una escala tan moderada que no interfiere mayormente con los resultados finales, lo cual viabiliza el modelo. Por otra parte, se determinó que hubo transmisión congénita de la toxoplasmosis durante la etapa aguda de la enfermedad iniciada con dosis precisas de bradizoítos (datos pasibles de ampliación) (Gonzalez, 2003). También se demostró en la misma tesis, que las ratonas inmunizadas previamente con cepas completas (protección prototípica) antes de la concepción y luego desafiadas con quistes de *Toxoplasma* durante la gestación, no transmitieron la infección a su descendencia. Posteriormente, se diseñó un método para el diagnóstico de la gestación en la ratona, basado en el aumento del peso corporal entre los días 9 y 12 de gestación, con 100% de sensibilidad, 67% de especificidad y alto valor predictivo positivo (Telechea, 2011). También se demostró la transmisión originada por ooquistes de la cepa Prugnnaud de *Toxoplasma* (experimento a expandir), pero no con ooquistes de la cepa ME-49 (Bacci, 2005). Actualmente se investiga en este centro sobre la inmunidad cruzada entre la cepa RH, utilizada para inmunizar ratonas (con terapia sulfonamídica simultánea), y cepas de *Toxoplasma* se utilizan como desafíos gestacionales, en sus formas quísticas y ooquísticas.

Las últimas investigaciones en ratones se hicieron en el proyecto “ Ensayos preclínicos sobre una vacuna contra la toxoplasmosis congénita humana y ovina” . Se diseñó una vacuna inactivada que demostró protección en los modelos murino BALB/c y cobayo, de toxoplasmosis congénita. Está diseñada para ser aplicada experimentalmente en tres dosis con 15 días de separación entre ellas, y la protección inmune que confiere en el modelo cobayo, es de al menos 10 meses. La vacuna fué diseñada de modo que sea farmacéuticamente apta para su aplicación en humanos y ovinos (sin publicar).

En un proyecto en curso, en el Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria, se ha demostrado la capacidad protectora de los taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma* inactivados con etilenimina binaria (EIB) en el modelo congénito de toxoplasmosis murina. Aparentemente, la capacidad inmunoprotectora de los organismos así tratados, sería muy similar a la de los zoítos irradiados con rayos gama (experimentos del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria sin publicar).

La utilización del modelo rata

Dubey y Shen (1991b), y Zenner (1993), fueron los primeros en realizar experimentos sobre el modelo rata de toxoplasmosis congénita, en el exterior. Como consecuencia de ellos, se llegó a las siguientes conclusiones: a) No obtuvieron transmisión congénita de la toxoplasmosis durante el período crónico de la infección, es decir, en ratas infectadas algunas semanas antes del inicio de la gestación; b) obtuvieron transmisión de *Toxoplasma* en todas las ratas infectadas durante la gestación, independientemente de si la inoculación de *Toxoplasma* se hizo del 7º al 15º día y de si se efectuó con 10^4 bradizoítos o con 10^4 ooquistes de *Toxoplasma*; c) la infección durante la gestación de ratas no inmunes, se transmitió cuando menos a 1/3 de la camada, en ocasiones a toda la camada; d) los fetos de las ratas inmunizadas antes de la gestación,

quedaron totalmente protegidos contra desafíos efectuados durante la gestación.

La raza de rata empleada tiene importancia en la tasa de transmisión de *Toxoplasma*. Así, se observó más transmisión en ratas Long Evans que en ratas Wistar. Paulino y Vitor (1999), obtienen tan sólo 11.4 % y 3 % de transmisión connatal en ratas Wistar y Holzman, respectivamente, inoculadas con 10^2 ooquistes de *Toxoplasma*.

Posteriormente, se realizan importantes ensayos sobre protección en ratas gestantes, contra la toxoplasmosis congénita (Zenner, 1999) . Se producen infecciones crónicas en ratas antes de la gestación con las cepas RH, 76 K y Prugniaud. Luego las desafían durante la gestación en forma homóloga y heteróloga. Obtienen, en todos los casos, protección completa de las camadas (ausencia de infección toxoplásmica en ellas). En otros ensayos de la misma publicación, inmunizan ratas con extracto de taquizoítos RH en adyuvante de Freund incompleto, con taquizoítos RH viables, con taquizoítos RH irradiados, o bien con antígenos de secreción-excreción. Obtienen casi 100 % de protección, también en estos casos.

Se sostiene que la rata sea también una especie adecuada para un modelo de estudio de inmunidad contra la toxoplasmosis connatal extrapolable a la mujer, porque debido a su resistencia natural contra *Toxoplasma*, es posible inmunizarla inclusive con cepas virulentas, sin necesidad de prevenir su muerte con terapia sulfonamídica. Según Thiermann (1957) y Freyre et al (1999b) la rata también es favorable para el modelo en cuestión, debido a la muy baja transmisión connatal de *Toxoplasma* durante la etapa crónica de la infección en esta especie.

En la FV de Montevideo se ha ensayado la transmisión de la toxoplasmosis aguda durante la gestación en ratas no inmunes. Se obtuvo transmisión en el 0 al 70 % de las ratas madres, empleando 12 cepas de *Toxoplasma*. Se observaron amplias variaciones individuales en la frecuencia de transmisión en ratas de la misma raza que recibieron inóculos similares. En dichos experimentos, la frecuencia de la transmisión no se vio afectada ni por la cepa, ni por la dosis de *Toxoplasma* , ni tampoco por el momento de la gestación en que fueron inoculadas (6-8 o 15 días) (Freyre et al, 2001a). También se demostró la baja frecuencia de la transmisión congénita de *Toxoplasma* en ratas gestantes portadoras de una infección crónica con el parásito (Freyre et al, 1999b).

Más recientemente, en el laboratorio citado se ha demostrado la influencia del tamaño de la dosis de desafío para que se haga patente o no, la capacidad protectora por parte de la cepa RH de *Toxoplasma* en el modelo congénito en ratas (Freyre et al, 2006c). También en la FV se ha perfeccionado el modelo rata de toxoplasmosis congénita, describiendo un método práctico y eficaz para el diagnóstico de gestación en esta especie, disminuyendo el número de tejidos de neonatos a muestrear para el diagnóstico de transmisión congénita (o su ausencia), desarrollando desafíos gestacionales con dosis umbral, para poder detectar el efecto de inmunógenos con moderada capacidad inmunogénica, y

demostrando la ausencia de transmisión lactogénica para estas dosis (Vitabar, 2012). También se ha demostrado la protección cruzada de la cepa RH en el modelo congénito en rata. Asimismo se ha contribuido al estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis adquirida en el modelo rata (Freyre et al, 2001 a,b ; Freyre et al, 2004; Freyre et al, 2006b).

El modelo hamster de inmunidad contra la toxoplasmosis congénita

Existen sólo dos antecedentes de toxoplasmosis congénita experimental en el hamster en la literatura universal. En uno de ellos se comprobó la transmisión congénita de *Toxoplasma* durante la fase crónica de la infección, aunque no es posible saber exactamente la proporción de esta transmisión, porque los resultados se expresaron en conjunto con la transmisión constatada en ratones (De Roever-Bonnet, 1960). El otro antecedente consistió en un ensayo sobre la protección de la mutante ts-4 de *Toxoplasma* contra desafíos provocados durante la gestación de hamsters (Frenkel et al, 1986). En este caso cabe consignar que la dosis de desafío utilizada fue desproporcionada en relación al peso corporal.

En la Facultad de Veterinaria de Montevideo se produjeron dos tesis sobre toxoplasmosis en hamsters, cuyos resultados fueron los siguientes:

En la primera de ellas (Freyre et al, 2009) el objetivo fue indagar la utilidad del hamster para un modelo de transmisión de la toxoplasmosis congénita. Se diseñó un método no invasivo para el diagnóstico de la gestación en hamster con una sensibilidad y una especificidad de 70.2 y 94.7 % respectivamente (n=168). De 32 hembras con una infección toxoplásmica crónica, 3 transmitieron *Toxoplasma* congénitamente durante su primera gestación, pero no durante las gestaciones subsiguientes. Las tasas de transmisión congénita de la infección iniciadas durante la gestación con 2 estadios de 2 cepas de *Toxoplasma* se situaron entre 33 al 100% para 76 hembras inoculadas. Sólo 1 de 17 hembras transmitió el parásito exclusivamente a través de la leche.

En la segunda tesis (Freyre et al, 2011) se apreció protección casi totalmente uniforme contra la toxoplasmosis congénita iniciada con inoculaciones con quistes y ooquistes del parásito, pertenecientes a distintos genotipos, a causa de que la inmunización Rh previa a la gestación, tiene que ser controlada con medicación si se quiere que la mayoría de los hamsters sobrevivan. También se observó cierta transmisión congénita de *Toxoplasma*, durante la fase crónica de la infección. Por estos dos motivos, se considera al hamster como menos práctico que los modelos en la rata y en el ratón BALB/c. Se concluyó que la protección en el modelo hamster se parece considerablemente a aquella que ocurre en la naturaleza, donde la mayoría de las mujeres y de las ovejas gestantes que experimentaron una infección toxoplásmica previamente, protegen a sus fetos contra una infección con el parásito durante la gestación subsiguiente.

El modelo cobayo de toxoplasmosis congénita

El modelo cobayo de estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita experimental ha sido desarrollado por Haumont et al (2000). Estos autores han demostrado una moderada capacidad del antígeno toxoplásmico denominado SAG-1 para proteger contra desafíos toxoplásmicos gestacionales en la cobaya. Más importantemente, han demostrado la validez del modelo, al verificar su suficiente capacidad para quedar inmune antes de la gestación, y mantener dicha capacidad durante la preñez, y al haber logrado la transmisión gestacional experimental de *Toxoplasma*. Este modelo es considerado valioso para esta tesis, porque aunque su gestación dura más del doble de la gestación de la rata o la ratona, la vida reproductiva del cobayo también es proporcionalmente más prolongada, con lo cual puede ser utilizado para comprobar la duración de la inmunidad por un período dilatado.

El equipo de Flori et al (2002, 2003) también ha hecho aportes al modelo cobayo de toxoplasmosis congénita. Determinaron la carga parasitaria por órganos mediante la técnica de PCR cuantitativo en la descendencia de cobayas inoculadas a los 20 o 40 días de gestación, y el efecto de la infección congénita: 25% de sobrevivencia de neonatos cuya madre fue inoculada a los 40 días de gestación, contra 77% para los neonatos provenientes de madres inoculadas a los 20 días de gestación (Flori et al, 2002). En otro trabajo, obtuvieron 84-100% de transmisión congénita cuando las madres fueron inoculadas con *Toxoplasma* a los 20 y 40 días de gestación, respectivamente. Determinaron que el hígado, los pulmones y cerebros de los neonatos son los órganos de elección para el aislamiento de *Toxoplasma* (Flori et al, 2003).

Existen asimismo unos pocos antecedentes en la literatura de décadas anteriores, de infección de cobayos con *Toxoplasma* , que no son citados porque la información que brindan no es operativa a los fines de esta tesis.

Ensayos en corderos en la FV de Montevideo

También en la FV de Montevideo se demostró prototípicamente la posibilidad de inmunizar corderos contra la formación de quistes tisulares de *Toxoplasma* (Freyre et al., 2009), lo que haría seguro el consumo de carne ovina desde el punto de vista de la toxoplasmosis, de traducirse estos resultados preliminares en un recurso práctico.

Las vacunas existentes

Existe una vacuna con alto nivel de protección contra la emisión de ooquistes toxoplásmicos por los gatos, cuya aplicación contribuiría a disminuir la prevalencia de la infección toxoplásmica humana y tal vez también la de los animales de consumo (Freyre et al, 1993). Tratándose de una vacuna a *Toxoplasma* vivo, su aplicación está pendiente de que pueda ser elaborada y distribuída en condiciones rentables. Asimismo está patentada la mutante ts-4 de *Toxoplasma* (United States Patent Office, 1982; Patente No. 4,473,549) , para la cual también ha colaborado el Laboratorio de Toxoplasmosis de la FV de Montevideo (Frenkel et al, 1986). Sin embargo, esta vacuna tampoco se ha

llevado a la práctica porque 1) no se ha demostrado su eficacia para proteger contra la toxoplasmosis congénita, sino solamente contra desafíos mortales con *Toxoplasma* , y 2) se trata de una vacuna viva, y se ha demostrado que tiene carácter persistente en los tejidos de huéspedes inmunodeprimidos. No existe una vacuna antitoxoplásmica de uso humano.

Respecto a la inmunización de ovinos contra el aborto toxoplásmico, desde la década de los 70, se sabía que la infección de una oveja con *Toxoplasma* antes de la concepción, la protegía contra el aborto si era posteriormente desafiada durante la gestación. Ello daba la pauta que eventualmente sería posible lograr la vacunación de las ovejas. La inmunización con taquizoítos de *Toxoplasma* inactivados por el formol, sin embargo, no protegió a las ovejas contra el aborto toxoplásmico.

No obstante, se desarrolló una vacuna en Nueva Zelanda contra el aborto ovino toxoplásmico que consiste en generar la inmunidad antitoxoplásmica mediante la inoculación de la cepa acistogénica de *Toxoplasma* S48 antes de la gestación. La cepa desaparece del organismo de los ovinos vacunados 6 semanas luego de la inoculación, y la inmunidad estéril que genera, protege contra desafíos heterólogos efectuados durante la gestación (Wilkins et al, 1988). En 1988 en Nueva Zelanda, de 29 brotes de aborto ovino toxoplásmico, 9 (31%) sucedieron en rebaños que habían sido vacunadas contra *Toxoplasma* (McKenzie, 1988). En condiciones controladas la vacuna demostró aproximadamente 72% de protección (corderos viables) en 64 ovejas inmunizadas, por comparación con ovejas no inmunizadas. No obstante, aunque muchos corderos nacieron viables, 2/3 de los fetos de ovejas vacunadas, se infectaron in útero con el inóculo de desafío que recibió la madre (Buxton et al, 1993). La cepa vaccinal S-48 no puede generar la producción de ooquistes en gatos. Su efecto protector perdura por lo menos durante 18 meses (Buxton et al, 1993). Tratándose de una vacuna viva, puede originar la infección humana, por lo que las embarazadas y personas inmunodeprimidas no deberían aplicarla.

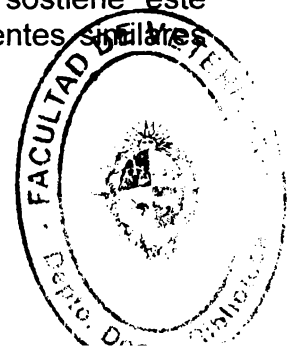
Existen excelentes actualizaciones sobre el tema (Innes, 2009; Jongert, 2009).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE LA PRESENTE TESIS

El objetivo principal de la presente tesis fué demostrar la factibilidad de la transmisión congénita de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos, en el modelo cobayo . La hipótesis que sostiene este objetivo, es que será posible alcanzarlo, teniendo en cuenta la transmisión congénita obtenida en cobayas inoculadas con quistes del parásito, por otros investigadores (Flori y col, 2002, 2003; Haumont, 2000).

El objetivo secundario es que dicha transmisión será posible con el uso de dosis muy pequeñas de ooquistes toxoplásmicos. La hipótesis que sostiene este objetivo, es que será posible alcanzarlo, considerando antecedentes similares en ratas y ratones, en tesis trabajadas en el mismo Laboratorio.

(Telechea, 2011; Vitabar, 2012) ,



MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se ensayó la dosis umbral de *Toxoplasma* para la transmisión congénita originada por ooquistes Prugniaud en la cobaya, en dos grupos de 9 hembras cada uno, que recibieron 10^3 y 10^2 ooquistes Prugniaud por boca, durante la gestación. Para ello, se alojaron machos y hembras en relación 1:6, y se determinó el peso corporal al inicio y a la 4^a. y 6^a. semana. Se procedió a la inoculación cuando se observó un aumento de peso corporal mayor o igual a 20 g, coincidente con la detección de fetos por medio de la palpación abdominal. Como controles de comportamiento reproductivo, se utilizaron 20 hembras y 4 machos, alojados en las mismas condiciones. Se estableció asimismo un grupo control de performance reproductiva en cobayas no inoculadas, para el registro de neonatos vivos/mortinatos y de eventuales abortos. Este grupo tuvo por efecto poder relacionar, para el caso que se presentaran accidentes de la gestación en los dos grupos anteriores, si dicha mortalidad obedeciera a la acción de *Toxoplasma*. Pueden haber otras causas de mortalidad perinatal, como la constatada por Haumont et al (2000), presuntamente debida a deficiencia relativa de vitamina C en la dieta.

MATERIALES

Animales

Para el modelo de toxoplasmosis congénita, se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) procedentes del Servicio Seroterápico del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina de Montevideo. Las hembras pesaban entre 570 y 916 g al inicio de los experimentos. Se eligió esta especie, de probada adecuación para el modelo de inmunidad contra la toxoplasmosis congénita (Haumont et al, 2000), por la duración de su vida reproductiva, que permite inmunizar a los cobayos cuando recién destetados y desafiarlos 8,5 meses más tarde (y más también). Esto no es posible con el modelo ratón o el modelo rata, debido a que la vida reproductiva de las razas endogámicas empleadas es, en el mejor de los casos, de 6 meses.

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1, de 20 gr de peso corporal, para los bioensayos de los cobayos recién nacidos. Se eligió esta cepa porque el Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria ha trabajado con ella desde 1979, y ya conoce su reacción patogénica durante la infección toxoplásmica.

Se utilizaron gatitos recién destetados obtenidos mediante donación personal, de la raza europea (cruzas), por ser la más común y porque el Laboratorio de Toxoplasmosis ya conoce la producción de ooquistes toxoplásmicos en esta raza.

Sólo se utilizaron cobayos, ratones y gatos inicialmente libres de infección toxoplásmica. Se testaron muestras de suero de los animales mediante la reacción de aglutinación directa (AD) de Desmouts y Remington, con el uso de

2-ME (Desmonts and Remigton, 1980). Se interpretó como reactivo, todo animal cuyo suero fue positivo a la dilución 1:64 o mayor. La misma reacción se utilizó para comprobar la infección toxoplásmica (o su ausencia) en ratones subinoculados con tejidos de cobayos neonatales (bioensayos). La reacción de AD para toxoplasmosis ha demostrado alta sensibilidad y especificidad en humanos, ratas, ratones y ovinos con infección natural y experimental a *Toxoplasma*, en manos de los investigadores de la línea (Freyre et al, 1996, 1999a, 1999b, 2001a, 2001b, 2004, 2006a, 2006b, 2006d).

En cuanto al cumplimiento con la ética de experimentación animal, se cumplió con los preceptos de la Comisión de Vigilancia de la Ética en Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria, con la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UDELAR, con el Decreto de Protección Animal del 29.2.2000 y con la Ordenanza sobre Uso de Animales de Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria del 21.12.99.

Cepa de *Toxoplasma* usada para desafiar

Se empleó la cepa Prugniaud de *Toxoplasma*. Se seleccionó esta cepa porque 1) es una cepa completa (formadora de quistes y ooquistes), tal cual sucede en la naturaleza; 2) la cepa Prugniaud fué aislada de un caso de toxoplasmosis congénita mortal en Limoges (M.L.Dardé, comunicación personal a A.F.). Recordamos que la propuesta es acerca del modelo de toxoplasmosis congénita. También, en el Laboratorio de toxoplasmosis se posee experiencia previa con la utilización de la cepa Prugniaud, en cuanto a su transmisión congénita en el modelo ratón (Freyre et al., 2006a), en el modelo rata (Freyre et al., 1999b, 2001a, 2006c), así como en el modelo hámster (sin publicar).

MÉTODOS

Métodos para lograr la concepción de las cobayas y diagnosticar la gestación

Para lograr la concepción de las cobayas, éstas fueron alojadas a razón de 1 macho cada seis hembras. La gestación fue confirmada en el momento del desafío, a la 6ª semana de haber concebido, por palpación abdominal y por verificación de aumento de peso corporal, con respecto a determinaciones previas efectuadas en la 1ª y 4ª semana luego de haber sido alojadas las hembras con el macho.

Obtención de ooquistes de *Toxoplasma*.

Para la obtención de ooquistes del parásito, se obtuvieron gatitos recientemente destetados, negativos a la AD para toxoplasmosis a la dilución de 1:64. Se les suministró el cerebro de un ratón con infección toxoplásmica crónica. Se colectaron las heces de los días 4 a 7 post-infección, las que se concentrarán por el método de Sheather modificado (Frenkel, 1977), y se incubaron con agitación en 2% de ácido sulfúrico durante 96 hs. hasta completar la esporulación. Los ooquistes fueron inoculados por boca en cobayas, previa neutralización y enumeración.

Enumeración de ooquistes

Los ooquistes fueron suspendidos en PBS y enumerados en una cámara de Neubauer, a 400 x .

Desafío de las cobayas

Las cobayas fueron desafiadas a la 6^a-7^a semana de gestación, por inoculación oral de 10³ ooquistes esporulados de la cepa Prugniaud. Se utilizó esta vía porque por ella transcurre la infección en condiciones naturales.

Método para la detección de la infección trasplacentaria mediante bioensayos.

Una vez nacidos los cobayos hijos , se subinocularon de inmediato en ratones CF-1. Los órganos neonatales utilizados fueron hígado y pulmón. Muestras de estos órganos fueron homogeneizadas con un homogeneizador de tejidos con solución de CINA 9^o/oo estéril, y subinoculadas intraperitonealmente (i.p) en 4 ratones. Al cabo de 25 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de AD en el suero de los ratones receptores de los tejidos . Se consideró que hubo transmisión congénita, cuando las subinoculaciones de tejidos neonatales resultaron positivas para *Toxoplasma*.

Análisis estadístico

Para detectar cualquier asociación entre la transmisión congénita entre cobayas inoculadas con las dos dosis de ooquistes, se utilizó el test de homogeneidad de X² o bien el test de Fisher a un nivel de significación de $\alpha = 0.05$.

Medidas para la protección biológica de las personas involucradas en el proyecto de trabajo.

Se aplicaron las directivas de la Organización Mundial de la Salud para la salvaguardia de las personas involucradas en el presente proyecto de trabajo, contra el riesgo de infección toxoplásmica (Organización Mundial de la Salud. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 1994). Se aplicaron asimismo las "Normas de Bioseguridad del Laboratorio de Toxoplasmosis", aprobadas por el Consejo de la Facultad de Veterinaria de Montevideo en abril de 2003.

RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de transmisión se resumen en los cuadros N° 1 y 2.

Ocho de 9 madres inoculadas con 10³ ooquistes Prugniaud transmitieron el parásito congénitamente. La madre que no transmitió *Toxoplasma* a su descendencia, tuvo un mortinato, sin embargo. De 9 hembras, 5 tuvieron descendencia sana, una hembra tuvo mitad de la descendencia sana y la otra

mitad fueron mortinatos, dos hembras tuvieron mortinatos, y la restante hembra abortó dos fetos. De 26 productos de la concepción , 21 resultaron positivos a *Toxoplasma* en el bioensayo (cuadro No. 1) .

Los diagnósticos de gestación de las 9 cobayas , sobre la base de la ganancia de peso corporal entre la 4^a. y la 6^a. semana de haber sido puestas con el macho y de la palpación abdominal, resultaron todos correctos. En el período señalado, el promedio de los aumentos de peso fue de 34 g, con extremos de 20 y 60 g (cuadro No.1).

Nueve de 9 madres inoculadas con 10² ooquistes Prugniaud transmitieron el parásito congénitamente. De 9 hembras, 5 tuvieron descendencia sana, dos hembras tuvieron parte de la descendencia sana y parte mortinato, y las dos hembras restantes tuvieron mortinatos. De 20 productos de la concepción , todos resultaron positivos a *Toxoplasma* en el bioensayo (cuadro No. 2) .

Como en el caso del grupo experimental anterior, los diagnósticos de gestación de las 9 cobayas , sobre la base de la ganancia de peso corporal entre la 4^a. y la 6^a. semana de haber sido puestas con el macho y de la palpación abdominal, resultaron todos correctos. En el período señalado, el promedio de los aumentos de peso fue de 61.7 g, con extremos de 6 y 98 g (cuadro No.2).

En el grupo control de 20 cobayas, sólo una tuvo un aborto. No ocurrieron mortinatos. No se investigó la causa del aborto. Cuando la misma cobaya fue puesta a copular nuevamente, tuvo un parto normal. No se registró la cantidad de crias nacidas en las restantes cobayas.

No existieron diferencias significativas entre los resultados de las madres inoculadas con 10² y 10³ ooquistes toxoplásmicos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Respecto a las pruebas de transmisión, el pasaje congénito de *Toxoplasma* ocurrió casi en la misma proporción, independientemente de la dosis de ooquistes de *Toxoplasma* ensayadas, por lo cual se decidió emplear la dosis más baja (10² ooquistes) para el desafío de la prueba vaccinal en futuros ensayos de inmunización pregestacional/desafío intragestacional. Esta puede considerarse la dosis umbral, puesto que no es posible obtener suspensiones con cantidades constantes de ooquistes menores a la señalada, máxime considerando que la determinación de la viabilidad de los ooquistes toxoplásmicos es difícil, más allá de identificar si cada uno está esporulado (y por lo tanto infectante) o no (Vitabar, 2012).

Las tasas de transmisión aquí obtenidas (89% y 100%,según la dosis de ooquistes), guardan semejanza con las obtenidas por Flori et al. (2002), de 84% con quistes Prugniaud orales y 86 con quistes de la cepa 76K por la misma vía (n=56). Los mismos autores obtuvieron la transmisión congénita en 11 de 13 cobayas y en 16 de 16 cobayas inoculadas con quistes de la cepa 76K por

boca, hacia el día 20 ó 40 de gestación, respectivamente (Flori et al, 2003). Menos comparable resultan los experimentos de Haumont et al (2000), con 31 de 32 camadas infectadas congénitamente, por haber utilizado la cepa RH (una cepa de laboratorio), en su forma de taquizoíta (una forma evolutiva inoperante en la naturaleza para la transmisión entre individuos) y la vía intradérmica de inoculación (una vía ciertamente no natural de la infección con *Toxoplasma*).

Contrasta la alta tasa de transmisión congénita observada en el modelo cobayo, con las tasas intermedias de transmisión obtenidas en experimentos del Laboratorio de Toxoplasmosis en ratones BALB/c (Freyre et al., 2006a) y ratas Fischer (Freyre et al, 2006 c). La conocida mayor susceptibilidad del cobayo a la toxoplasmosis (Haumont et al, 2000; Flori et al, 2002,2003) con respecto a la mayor resistencia natural de la rata (Freyre et al, 2006 c) y el ratón BALB/c (Freyre et al., 2006 a), explicaría esta diferencia.

Las tasas de sobrevida de los fetos en los presentes experimentos, fueron de 57.7 %y 65% con ooquistes de la cepa Prugniaud. Son más altas que las tasas de sobrevida obtenidas por Flori et al (2000), de 31% con la cepa 76 K y 53% con la cepa Prugniaud. La diferencia podría atribuirse a la cepa de cobayos utilizada en cada caso, o bien al hecho de utilizarse ooquistes en los presentes experimentos, y quistes en los experimentos de Flori et al (2000).

Respecto al método utilizado para la determinación de la gestación en la cobaya, el método basado en el aumento de peso corporal entre la 4ª. y la 6ª. semana de haber sido puesto machos y hembras en la misma jaula, aunado con la palpación abdominal, resultó suficientemente preciso a los fines propuestos. Este método se compara favorablemente con el método de determinación de la progesterona (Haumont et al., 2000), por cuanto es un método mínimamente invasivo y no requiere una técnica nuclear que no está al alcance de cualquier laboratorio. El método del pesaje corporal se ha revelado útil también para la detección de la gestación en la rata (Freyre et al., 2006c) y el ratón BALB/c (Freyre et al., 2006 a), en el contexto de ensayos sobre toxoplasmosis congénita experimental.

Como conclusión, puede decirse que se ha logrado el objetivo de la tesis, al obtenerse la transmisión congénita de la toxoplasmosis en el modelo cobayo en forma muy frecuente, casi total, tras la inoculación de ooquistes del parásito. La utilización de ooquistes de *Toxoplasma* torna más práctico esta clase de experimentos, por las posibilidades de almacenamiento de esta fase evolutiva, con mantenimiento de la viabilidad durante muchos meses. La experiencia ganada posibilita la ejecución ponderada de los desafíos vacunales en experimentos que se desarrollarán próximamente.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buxton D, Donald KM, Finlayson J. (1987). Monensin and the control of experimental ovine toxoplasmosis: a systemic effect. *Vet Rec*; 120:618-9.
2. Buxton, D. (1993). Toxoplasmosis: the First Commercial Vaccine. *Parasitol Today*, 9: 335-337.
3. Conti Díaz IA, Freyre A, Queiruga G, Noya C, Mendez J, Gedda C, Reig B, Acosta M, López Jordi J, González Banfi A. (1998). Estudio de la toxoplasmosis en la Unidad de Perinatología del BPS en el período 1991 - 1996. *Rev Med Uruguay*; 14: 226-235.
4. De Roever-Bonnet, H. (1960). Congenital *Toxoplasma* infection in mice and hamsters with avirulent strain. *Trop. Geogr. Med.*, 21: 443-450, 1960.
5. Desmonts G, Remington JS. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection . Method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*; 11:562-568.
6. Dubey JP, Beattie CP (1988) *Toxoplasmosis of animals and Man*. Florida, CRC Press Inc , 220 p.
7. Dubey JP, Shen SK.(1991). Rat Model of Congenital Toxoplasmosis. *Inf Immun*; 59:3301-3302.
8. Dubey JP, Urban JF Jr, SW Davis.(1991b). Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non persistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res*; 52:1316-1319.
9. Elsaid MA, Martins MS, Frézard F, Braga E, Vitor R. (2001). Vertical Toxoplasmosis in a Murine Model: Protection after Immunization with Antigens of *Toxoplasma gondii* Incorporated into Liposomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96: 99-104.
10. Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Tran Manh Sung R. (2002). Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea pig : use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *J Med Microbiol* ; 51:871-878.
11. Flori, P, Hafid J, Thonier V, Bellete B, Raberin H, Tran Manh Sung R. (2003). Parasite Load in guinea pig foetus with real time PCR after maternofetal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Parasite*; 10:133-140.
12. Frenkel JK, Freyre A, Smith DD. 1986. Tests of non persistent *Toxoplasma* ts-4 vaccine in mice and hamsters: Appearance of immunity, vaccine persistence, and protection against transplacental infection:

13. Freyre A, Falcón J. (1989). Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis. Montevideo, Uruguay, Editorial Departamento de Publicaciones de la Universidad , 338 pp.
14. Freyre A, Queiruga G, Méndez J, Lavarello, L. (1992). Riesgo de infección toxoplásmica del feto humano en Montevideo. An. Clínicos (España) 4: 122-127.
15. Freyre A, Choromanski L, Fishback JL, Popiel I. (1993). Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the t-263 strain of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol; 79: 716-719.
16. Freyre A, Falcón J, Mendez J, Gedda C, D'Angelo JM. (1996). Evaluación de las pérdidas económicas debidas a toxoplasmosis en ovinos en el Uruguay. Parasitología al Día; 20: 100-108.
17. Freyre A. (1998). Vacunas contra *Toxoplasma*. Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis. Santa Fé de Bogotá, Colombia, Junio 4-6. pp.98-111.
18. Freyre A, Bonino J, Falcón J, Castells D, Correa O, Casaretto A. (1999a). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. Vet Parasitol; 81: 85-88.
19. Freyre A, Falcon J, Correa O, Mendez J, Gedda C. (1999b). Congenital transmission of experimental chronic toxoplasmosis in rats. J. Parasitol; 85: 746-748.
20. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, Gonzalez M, Venzal J. (2001a). Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. Parasitol Res; 87: 941 – 944.
21. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, Gonzalez M, Venzal J. (2001b). Residual infection in the brains of rats fed cysts of 15 strains of *Toxoplasma*. Parasitol. Res.; 87: 915 – 918.
22. Freyre A, Falcón J, Mendez J, González M. (2004). An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. Exptl Parasitol; 107:14-9.
23. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M. (2006a). Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. Exptl Parasitol; 113: 154-160.
24. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M, Lanzzeri S. (2006b). Susceptibility of Artificially Released Zoites of *Toxoplasma gondii*, to Gamma Irradiation. Res J Parasitol; 1: 42-47.

25. Freyre A, Falcon J, Mendez J, Rodriguez A, correa L, Gonzalez M (2006c). Partial cross-protection among 4 strains of *Toxoplasma* against congenital transmission in a rat model. *Exptal Parasitol*; 112:8-12.
26. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M. (2006d). *Toxoplasma gondii*: Differential protection rates by two strains against cyst formation in a rat model. *Exptal Parasitol*; 114: 265-270.
27. Freyre A, Fialho CG, Bigatti LE, Araujo FA, Falcón JD, Mendez J, González M. (2009). *Toxoplasma gondii*: congenital transmission in a hamster model. *Exp Parasitol*. 122:140-4.
28. Freyre A, Araujo FA, Fialho CG, Bigatti LE, Falcón JD. (2011). Protection in a hamster model of congenital toxoplasmosis. *Vet Parasitol*.183:359-363.
29. González A. (2003). Modelo murino de toxoplasmosis congénita. II diagnóstico de gestación por colpocitología, colpocitología y tapón vaginal y dilatación abdominal; transmisión aguda de la toxoplasmosis congénita (infección con quistes). Tesis. Facultad de Veterinaria de Montevideo. 12 pp.
30. Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Jurado M, Mazzu P, Daminet V, Verlant V, Bollen A, Biemans R, Jacquet A. (2000). Protective Immunity against Congenital Toxoplasmosis with Recombinant SAG1 Protein in a Guinea Pig Model. *Infect Immun*; 68: 4948-4953.
31. Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S., Katzer, M. (2009). Veterinary Vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 104:246-251.
32. Jongert, E., Roberts, C.W., Gargano, N., Forster-Wald, E., Petersen, E. (2009). Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104:252-266.
33. Letscher-Brou V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E, Leyva R, Herion P, Saavedra R. (2001). Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*; 87: 70-9.
34. Mc Kenzie J. (1988). Sheep abortions. *Invermay. Surveillance*; 16: 24.
35. Mevelec MN, Bout D, Desolme B, Marchand H, Magne R, Bruneel O, Buzoni-Gatel D. (2005). Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital Toxoplasmosis in mice. *Vaccine*; 23: 4489-99.
36. Mohamed RM, Aosai F, Chen M, Mun HS, Norose K, Belal US, Piao LX, Yano A. (2003). Induction of protective immunity by DNA vaccination with

- Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*; 21: 2852-61.
37. Paulino JP, Vitor R. (1999). Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holzman rats. *Parasite*; 6:63-6.
 38. Remington JS, Desmonts G. (1990). Toxoplasmosis. En: Remington JS, Klein JO. (Eds.) *Infectious Diseases of the Fetus and newborn Infant*. Philadelphia, Saunders. pp.90-195.
 39. Roberts CW and Alexander J. (1992). Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*; 104: 19-23.
 40. Roberts CW, Brewer JM, Alexander J. (1994). Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine* ; 12: 1389-1394.
 41. Safern, F. (2003). Modelo murino de toxoplasmosis congénita. I. Diagnóstico de gestación por tapón vaginal, transmisión crónica de la toxoplasmosis congénita y protección prototípica. Tesis. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 15 pp.
 42. Telechea, C. (2011). Optimización del modelo rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita: método para el diagnóstico de la gestación de la rata y frecuencia de la transmisión congénita. Tesis Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 22 pp.
 43. Thiermann E.(1957) Transmisión congénita del *Toxoplasma gondii* en ratas con infección leve. *Biológica(Chile)*; 23: 59-67.
 44. Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Klein JP, Kien T. (1997). Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis : increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. *Parassitol*; 39: 279-83.
 45. Vitabar, V. (2012). Optimización del modelo rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita: umbral de la transmisión congénita. Tesis. Facultad Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 23 pp.
 46. Wilkins MF, O'Connell E. and Te Punga WA. (1988). Toxoplasmosis in sheep III. Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. *N Zeal Vet J*; 36: 86-89.
 47. Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delaw M. (1999). Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Par Immun*; 21: 261-72.

48. Zenner, L. (1993). Rat Model of Congenital Toxoplasmosis: Rate of Transmission of Three *Toxoplasma gondii* Strains to Fetuses and Protective Effect of a Chronic Infection. *Infect Immun*; 61: 360-363.

ANEXO

Cuadro N° 1

Transmisión de Toxoplasma en cobayas no inmunes inoculadas con 10³ ooquistes de la cepa Prugniaud per os.

Coba- ya No.	Peso 1 ^a . Sem.	Peso 4 ^a . Sem.	Peso 6 ^a . Sem.	Peso cuando inocula- das (g)	Resultado de la gestación	Días de gestacion Cuando Desafiadas (1)	Sero- logía madre	Serología Subinocu- Lacion hijos	
1	894	894	906	954	50	4 crias vivas	11-23	+	Todos +
2	886	830	846	876	30	3 crias vivas	20-33	+	Todos +
3	810	836	856	856	20	4 mortinatos	30-43	+	1 de 4 +
4	916	896	898	958	60	1 mortinato	29-42	+	negativo
5	750	768	806	806	38	2 fetos abort	10-23	(2)	Todos +
6	818	804	824	826	20	2 crias vivas	25-38	+	Los 2 +
7	866	864	862	856	20	2 crias vivas	14-27	+	1+ y 1 -
8	850	826	826	864	40	3 crias vivas	14-27	+	Todas +
9	850	830	858	852	28	3 crias vivas	22-35	+	Todas +

1. Sobre la base de gestaciones de 59 a 72 días de duración
2. Murió posparto, antes de ser sangrada

Cuadro N° 2

Transmisión de Toxoplasma en cobayas no inmunes inoculadas con 10² ooquistes de la cepa Prugniaud per os.

Coba-ya No.	Peso 1ª Sem.	Peso 4ª Sem.	Peso 6ª Sem (2).		Resultado de la gestación	Días de gestacion Cuando Desafiadas (1)	Sero-logía madre	Serología Subinocu-lacion hijos
-------------	--------------	--------------	------------------	--	---------------------------	---	------------------	---------------------------------

1	570	640	698	58	1 cria viva	31-44	+	+
2	644	622	668	46	1 mortinato 2 crías vivas	26-39	+	+ Las 2 +
3	648	650	692	42	2 crías vivas	26-39	+	Las 2 +
4	726	752	758	6(3)	2 mortinatos	26-39	+	Los 2 +
5	604	632	700	68	3 crías vivas	30-43	+	Todas +
6	684	706	774	68	3 mortinatos	33-46	+	Todos +
7	-	482	578	96	3 crías vivas	30-43	+	Todas +
8	-	348	422	74	1 mortinato 1 cria viva	25-38	+	Todos +
9	-	446	544	98	1 cria viva	22-35	+	+

1. Sobre la base de gestaciones de 59 a 72 días de duración
2. En este cuadro, coincide con el peso a la inoculación.
3. Se palpó un feto.

29657