

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS DOCTORAL

**Estudio epidemiológico de la toxoplasmosis en una población  
de félidos : (coprología, morfología y serología)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Antonio de Diego Cabrera**

DIRECTOR:

**Juan del Rey Calero**

Madrid, 2015

José Antonio de Diego Cabrera

TP  
1984  

---

186



\* 5 3 0 9 8 6 7 1 7 9 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-011375-8

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN UNA POBLACION DE FELIDOS

Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 186/84**

© José Antonio de Diego-Cabrera  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-20387-1984

**Autor: JOSE ANTONIO DE DIEGO CABRERA**



**ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA TOXOPLASMOSIS**

**EN UNA POBLACION DE FELIDOS**

**(Coprología, Morfología y Serología)**

**Director: D. JUAN DEL REY CALERO**

- Doctor en Medicina. Jefe del Departamento de Medicina Social y Preventiva de la Facultad de Medicina (Universidad Autónoma de Madrid).



**Ponente: D. DIMAS FERNANDEZ GALIANO**

- Doctor en Biología. Catedrático de Microbiología de la:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

- Facultad de Ciencias Biológicas.  
Departamento de Microbiología y Protozoología.

**AÑO 1.982**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

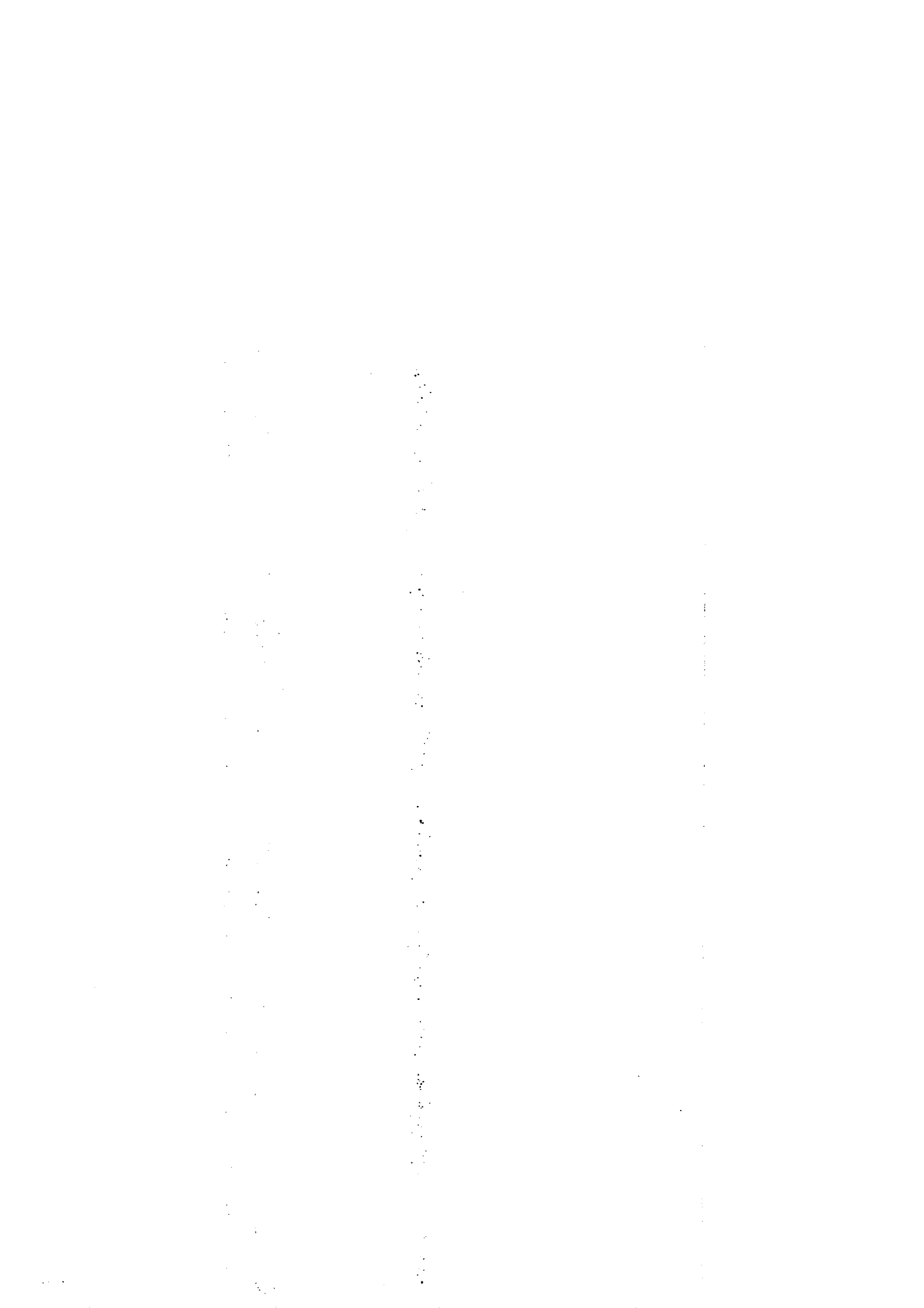
DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL  
Y PREVENTIVA

D. JUAN DEL REY CALERO, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLÓGIA, HIGIENE Y SANIDAD; Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICA : Que el presente trabajo, con el título de "Estudio epidemiológico de la Toxoplasmosis en una población de felinos", (Coprología, - morfología y serología), ha sido realizado por D. JOSE ANTONIO DE DIEGO CABRERA, bajo mi dirección y supervisión, reuniendo a mi juicio las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, expido el presente en Madrid , Julio de 1.982.





**A mis padres.**



## I N D I C E

	<u>Páginas</u>
- <b>Agradecimientos</b> .....	1
- <b><u>INTRODUCCION</u></b> .....	4
- <b><u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u></b> .....	9
. <b>Coccidios habitualmente encontrados en gatos.</b>	29
. <b>Grupos de hospedadores intermediarios según su receptividad</b> .....	31
. <b>Cronología de la Toxoplasmosis</b> .....	36
. <b>Cadena Epidemiológica</b> .....	37
. <b>Epidemiología general</b> .....	38
. <b>Endodiogenia del Toxoplasma gondii</b> .....	39
. <b>Endemias humanas mundiales</b> .....	40
- <b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b>	
. <b>Estudio coparazitológico en una población de gatos</b> .....	42
. <b>Estudio micromorfológico coccidiano</b> .....	48
. <b>Serología de un subgrupo de la muestra de población de gatos estudiada</b> .....	50
. <b>Estudio coparazitológico de una población de félidos salvajes</b> .....	52
. <b>Serología del personal que trabaja con félidos de esta Facultad</b> .....	56

Páginas

Metodología

. Estudio coproparasitológico en una población de félidos .....	58
. Recogida de heces .....	59
. Selección de un pool de la muestra para su estudio .....	60
. Técnica de Faust (simplificada) homogeneización en $SO_4Zn$ (33%) .....	60
. Análisis microscópico (estudio micromorfo-métrico) .....	61
. Concentración coccidiana mediante la técnica de centrifugoflotación en solución salina o sucrosa .....	62
. Conservación del material aislado (ooquistes en $Cr_2O_7K_2$ -2%-) .....	63
. Inoculaciones en ratón blanco para identificación genérica .....	64
. Sacrificio y estudio histoserológico de ratones inoculados oralmente con ooquistes ....	65
. Improntas esplénicas teñidas con Giemsa de ratones infectados previamente .....	68
. Microfotografía del material aislado .....	70
. Estudio serológico de un subgrupo de la muestra de félidos .....	70
. Serología del personal que trabaja con félidos de esta Facultad .....	77
. Método de concentración y esporulación coccidiana (protocolo) .....	84
. Método de concentración coccidiana en una solución de sucrosa .....	86

	<u>Páginas</u>
. Modelo y disposición de las jaulas empleadas en el trabajo .....	88
. Protocolo seguido en el estudio coprológico ...	89
. Técnica de Centrifugo-flotación (método de Faust -protocolo-) .....	90
. Test de aglutinación directa para la Toxoplasmosis -protocolo- .....	91
<b>- <u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>92</b>
. Estudio coproparasitológico .....	93
. Coproparasitología en una población de félidos salvajes. ....	95
. Estudio micromorfométrico coccidiano .....	96
. Estudio serológico de un subgrupo de la población de gatos estudiada .....	97
. Inter-relación entre los datos coprológicos y serológicos de la muestra de gatos estudiada.	100
. Estudio serológico del personal que trabaja con félidos de esta Facultad .....	102
. Serología mundial de gatos .....	105
. Parasitología del gato (quistes tisulares) ....	106
. Parasitología del gato (serología) .....	107
. Parasitología del gato (estudio coprológico) .....	108
. Parasitología del gato (ooquistes) .....	109
. Medidas comparativas de las diferentes coccidias del gato .....	110
. Esquema del ciclo biológico de <i>Cystoisospora felis</i> .....	111

	<u>Páginas</u>
. Esquema del ciclo biológico de Besnoitia wallacei .....	112
. Esquema del ciclo biológico de Toxoplasma gondii (duración de periodos prepatentes) ....	113
. Esquema del ciclo biológico de Hammondia hammondi .....	114
. Diferentes especies de coccidias en gatos (dimensiones, huéspedes intermediarios y modo de transmisión) .....	115
. Características de las diferentes coccidias encontradas en felinos .....	116
. Coccidias cuyos oocistos tienen medidas similares .....	117
. Coccidias que se encuentran frecuentemente en felinos (comparación de sus tamaños con un huevo de Toxocara cati) .....	118
. Títulos de anticuerpos a Toxoplasma gondii en relación con la edad y tipo de gato .....	119
. Estudio coproparasitológico realizado en el Parque Zoológico de Madrid (Resultados I)..	120
. Estudio coproparasitológico realizado en el Parque Zoológico de Madrid (Resultados II).	121
. Serología en animales de Zoológico.....	122
. Relación Infección-Convivencia con gatos. Estudio serológico (A.D.) .....	123
. Relación Infección-Convivencia con gatos. Estudio serológico (I.F.A.) .....	124
- <u>DISCUSION</u> .....	126
- <u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u> .....	140
- <u>MICROFOTOGRAFIAS</u> .....	144
→ <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	154

AGRADECIMIENTOS

La terminación de una Tesis doctoral es el resultado de un largo período de formación universitaria en la que intervienen numerosos factores que van conformando al investigador en el campo por él elegido.

La elección viene grandemente influenciada por esos primeros maestros que con sus consejos, ayuda y guía, a lo largo de los años, van creando inquietud y ansias de penetrar en ese mundo al que empezamos a vislumbrar.

Debo agradecer la ayuda prestada a lo largo de cuatro años al Dr. D. Carlos Zozaya, que supo inculcar en mí el interés por la Parasitología, interés que ha ido aumentando a lo largo de los años.

Al Dr. D. Juan del Rey Calero, Jefe del Departamento de Medicina Preventiva y Social de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en cuyo Departamento ha sido realizada esta tesis, por sus consejos y lectura del manuscrito, así como toda la ayuda prestada sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Debo agradecer igualmente al Dr. D. Dimas Fernández Galiano, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid) el haberse prestado amablemente a ser ponente de esta tesis, así como del interés mostrado por el trabajo, interés que se hizo patente a lo largo de varias entrevistas en las que se discutieron pormenores del mismo.

Al Dr. D. Ignacio García Mas por toda la ayuda prestada en el inicio de dicha Tesis, así como sus acertados consejos en la metodología de la misma.

A la Dra. Dña. Carmen Fernández Criado, en su ayuda de la recolección de los sueros así como en la realización de la técnica de I.F.A.

A todos los compañeros de los Departamentos de Farmacología y Morfología por haberse prestado pacientemente al estudio serológico.

Y, finalmente, quiero agradecer muy especialmente al Dr. D. R. F. Mayer, la gran ayuda prestada en la realización de todo el trabajo gráfico que, con suma maestría, ha sabido dar forma a mis toscos bocetos.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

INTRODUCCION

El *Toxoplasma gondii* es uno de los pocos protozoos que aún en la actualidad presenta numerosos problemas de índole: Taxonómico, epidemiológico y diagnóstico.

Su epidemiología es uno de los puntos que más problemas presenta, ya que no sabemos en el momento actual el verdadero mecanismo de infección.

Desde que en 1965 se descubrió el papel infectante de las heces de gato y la importancia que esto significaba a la hora de establecer la cadena epidemiológica, muchos han sido los trabajos que, realizados en gatos en todo el mundo, han intentado aclarar la importancia real que el felino posee en la transmisión de la enfermedad ya que, debido al hecho de poseer la fase sexual de evolución del parásito en su intestino, es el único animal hasta ahora conocido que expulsa ooquistes en sus deyecciones.

Posteriormente, en los años 1970, estos estudios coprológicos se ampliaron en otras especies de la Familia Felidae, comprobándose el ciclo coccidiano en varias especies de Felinos salvajes.

En la actualidad faltaban en nuestro País estudios coprológicos con una muestra de alto índice de significación, que pudiera poner de manifiesto la problemática que el "ooquiste" representa en la naturaleza y el papel real que juega en la epidemiología toxoplásmica.

El propósito, por tanto, de esta Tesis ha sido aclarar con una muestra, lo suficientemente amplia, el primer eslabón fundamental en la epidemiología de la Toxoplasmosis, ¿qué importancia real tienen los ooquistes expulsados por los félidos en la transmisión de la infección?, ¿a qué intervalos una vez expulsados por primera vez siguen apareciendo con sus heces?, ¿qué porcentaje de gatos son portadores de cepas ooquisticas que son las que presentan un interés real en la epidemiología?, pues el resto de animales herbívoros es el único eslabón que tienen para adquirir la infección al resto de los carnívoros y omnívoros.

Por tanto, una vez aclarado el papel real del gato y los félidos en general en la epidemiología de la Toxoplasmosis podríamos esclarecer el mecanismo de transmisión o, al menos, aclarar ciertas rutas que se presentan en la Naturaleza.

El estudio por tanto ha sido fundamentalmente coprológico, haciendo hincapié en el diagnóstico parasitológico, único veraz a la hora de establecer la presencia del parásito dentro del organismo.

La aclaración colateral al trabajo de todas las coccidias presentes en los félidos, punto en el cual quedan algunas lagunas, para ello hemos realizado su estudio mediante técnicas de concentración y posteriormente, ayudándonos de los métodos micro morfológicos, hemos podido establecer con precisión las coccidias

más frecuentes en el intestino del gato para evitar confusiones con el hallazgo de *T. gondii*.

Los hallazgos, escasos, como se verá en el transcurso de este trabajo, de ooquistes de *T. gondii*, han sido realizados sobre gatos rurales (no domésticos), recogidos en los alrededores de Madrid y otros pueblos, por ser éstos los que por su modo de vida deberían presentar una mayor parasitosis, aparte de que, debido a sus costumbres, son los que posteriormente diseminarian sus ooquistes por los alrededores.

Para poder plasmar una muestra con un alto índice de significación, la visualización coprológica ha sido realizada inmediatamente de la captura de los gatos.

Paralelamente se han realizado estudios sistemáticos, en varios días consecutivos, en subgrupos de la muestra mencionada para intentar aumentar la significación ooquistica, a la par que estudios serológicos para intentar detectar infecciones latentes.

Es, por tanto, a nuestro entender, una aportación valorable, a la hora de dilucidar este primer eslabón epidemiológico.

Finalmente se han realizado estudios coprológicos en los Félidos del Zoológico madrileño para completar la visión global de la epidemiología Felina.

Como corolario a este trabajo se han estudiado serológicamente al personal de esta Facultad (Auxiliares, cuidadores del animalario e investigadores) para establecer la importancia que la convivencia durante largos periodos de tiempo con estos animales representa a la hora de contraer la infección.

Para terminar apuntaré que, según datos recogidos por Aparicio Garrido y Col. (1972), la incidencia de la Toxoplasmosis en España representa 1/3 del total de la población, aproximadamente 12 millones, de los cuales 300.000 han presentado significación clínica.

Creemos, por tanto, que es un problema no sólo a nivel nacional, sino mundial que justifica plenamente nuestra preocupación.

- - - - -

8

REVISION

BIBLIOGRAFICA

Desde que en 1908 fue descubierto el *Toxoplasma gondii* por Nicolle y Manceaux hasta nuestros días, mucha ha sido la producción bibliográfica referida a este protozoo. El gran volumen bibliográfico que llega hasta nuestros días da una idea de la importancia que este esporozoo ha representado y aún representa en todo el mundo.

Este protozoo fue descubierto accidentalmente por estos dos investigadores franceses, que trabajaban en el Instituto Pasteur de Túnez, realizando estudios sobre leishmaniasis en la zona, en una recolección de roedores para suministrar a su laboratorio, encontraron al *Toxoplasma* en el gundi (*Ctenodactylus gundi*) confundiéndosele con una *Leishmania*, aunque sus autores rectificaron al poco tiempo, ya que no crecía en los medios habituales de estos organismos (N.N.N.).

Aún en la actualidad es uno de los pocos protozoos de los cuales, pese a las innumerables investigaciones realizadas en numerosos campos (inmunológico, epidemiológico, clínico, zoológico, terapéutico, etc.), mantiene en jaque a investigadores de todo el mundo.

En ese mismo año, fue también descubierto, a miles de kilómetros de distancia del primer hallazgo, por un investigador brasileño, Splendore en Sao Paulo, encontrándolo en el conejo doméstico.

A partir de este momento innumerables hallazgos de diferentes países del mundo se fueron sumando a los ya existentes, comprobándose que a este protozoo podían albergarlo numerosos animales.

Son años de gran confusión, ya que hallazgos encontrados en diferentes animales se dieron como *Toxoplasma*, descubriéndose más tarde como pertenecientes a varios géneros diferentes de Coccidios.

En el momento actual son los puntos fundamentales en los cuales existen discrepancias entre los numerosos investigadores que estudian este problema; uno de ellos, es su posición taxonómica dentro de los protozoos, pues hasta años muy recientes estaban incluidos junto con otros parásitos afines bajo la denominación de "incertae sedis", aunque en la actualidad ya se han dado pasos muy importantes en lo que se refiere a su clasificación zoológica. Otro de los puntos oscuros en la biología del parásito son los mecanismos de transmisión, que actúan preferentemente en la cadena epidemiológica.

En este sentido se ha avanzado mucho, sobre todo a partir del año 1965 en que HUTCHISON descubrió una forma de resistencia infectante en las heces del gato, esto fue ratificado por otros autores: FRENKEL y DUBEY (1970), OVERDULVE, WEILAND y ZAMAN (1970)

y por el propio HUTCHISON.

En el momento actual, en lo que se refiere a su posición taxonómica no hay discrepancias en lo referente a niveles superiores, no es así a medida que descendemos en su clasificación, sobre todo a nivel de género.

Su pertenencia a los Sporozoa (Apicomplexa), tal y como quedó definida por HONIBERG y col. (1964), o como proponen LEVINE (1970) y SCHOLTYSECK y MEHLHORN (1970), parece que no presenta ningún problema, ya que son parásitos intracelulares y con una adaptación a este modo de vida muy antigua.

En cuanto descendemos a niveles inferiores es cuando empiezan a surgir las discrepancias que mantienen divididos a numerosos investigadores en todo el mundo.

Por una parte hay quienes consideran fundamental su evolución intraorgánica, especialmente lo que se refiere a su reproducción, estos autores consideran que deben separarse Toxoplasmas y Coccidios.

Son mayoría no obstante los que se inclinan a incluirlos dentro de los coccidios, a partir del momento que se comprobó el parecido estructural entre los merozoitos de Eimeria Sp. y T. gondii (Scholtyseck y Piekarski, 1965), y la semejanza de

los macrogametos de ambos grupos de parásitos, así como su naturaleza oocística de la fase inicial del ciclo biológico: - - - HUTCHISON (1965), WORK y HUTCHISON (1969), y FRENKEL y cols. (1970).

A partir de este momento la situación está tan clara para algunos autores que piensan se debería, según su opinión, incluir en el género *Isospora* Schneider, 1881, pasando el género *Toxoplasma*, Nicolle y Manoeuvre (1908), como sinónimo de aquél (OVERDUINE, 1970), TADROS y LAARMAN (1982).

Ciertamente, la relación *Toxoplasma*-Coccidios es muy estrecha, a muchos niveles y una prueba más al respecto nos la proporcionan el valor de algunos anticoccidióticos en la terapia contra la *Toxoplasmosis*.

La serología ha aportado importantes descubrimientos a la estructura antigénica del parásito y así dos de las muchas pruebas serológicas en uso, pero las que presentan un mayor índice de sensibilidad y especificidad: (Inmunofluorescencia indirecta y el Test de Sabin y Feldman -Dye Test-), han puesto en evidencia la especificidad del género, comparándolo incluso con antígenos *sarcosporiditos*.

Un paso importante fue dado por DUBEY y FRENKEL (1972), indicando el parentesco entre ambos géneros, al demostrar en *Isog*

pora felis e *Isospora rivolta* su capacidad invasora de órganos extraintestinales (hígado, bazo, ganglios, mesentéricos, ect.) y el valor infectante de estos estadios, cuya aplicación a los felinos determina un periodo de prepatencia más breve que el conseguido mediante administración oral de oocistos esporulados.

Igualmente interesante, es por otro lado la relación existente entre *Toxoplasma*, *Sarcocystis* y *Besnoitia* Spp. Por lo pronto, las formas musculares de los sarcosporidios tienen estructura muy similar a las semejantes de los *Toxoplasmas*.

Las verdaderas diferencias entre ambos géneros recaen en la distinta estructura de quistes y pseudoquistes, así como lo referente a la serología, puntos que hay que tener en cuenta a la hora del cambio genérico.

La literatura nos refleja las diferentes modalidades taxonómicas en que varios autores han aportado nuevos descubrimientos.

Podemos considerar ya establecido el nivel de Subphylum para estos organismos establecido por LEVINE (1970), basándose en la presencia de una estructura apical característica de este grupo.

Una de las hipótesis taxonómicas es la propuesta por - - -  
SCHOLTYSECK y MEHLHORN (1970):

Subclase: Ceccidia, Leuckart (1879)

- Ordenes: - 1) Protonocidia, Cheissin -1956-.  
 - 2) Endodyococcidia, Scholtyseck -1970-.

. Familias:

Sarcocystidae, Levine 1961

Toxoplasmatidae, Levine 1961.

- 3) Eucoccidia, Leger y Duboscq, 1910.

Frenkel en el año 1977 propone la siguiente clasificación:

Familia: Eimeriidae

Subfamilia: Eimeriinae

Género: Isospora.

Familia: Sarcocystidae

Subfamilia: Sarcocystinae

Género: Sarcocystis

Género: Frenkelia

Subfamilia: Toxoplasmatinae

Géneros: - Toxoplasma

- Besnoitia

- Hammondia

- Cystoisospora

Esta clasificación se puede considerar como la más amplia-  
 mente aceptada, si bien LEVINE, sostiene que no hay bases sufi-

cientes para conservar como géneros separados a *Toxoplasma* y *Hammondia*, por lo que propone la inclusión de las especies del género *Hammondia* dentro del género *Toxoplasma*.

FRENKEL y cols. (1979) propone una nueva clasificación, basada en la de Frenkel (1977) con la inclusión de la nueva subfamilia *Cystoisosporinae*, que engloba al género *Cystoisospora*, aduciendo que se diferencian claramente de los *Toxoplasmatinae* por poseer quistes monozoicos (unizoitos).

La clasificación propuesta es la siguiente:

Familia: *Sarcocystidae*

Subfamilia: *Cystoisosporinae*

Género: *Cystoisospora*

Subfamilia: *Sarcocystinae*

Géneros: *Sarcocystis*

*Frenkelia*

*Toxoplasma*

*Beanoitia*

*Hammondia*

Finalmente TADROS y LAARMAN (1982), proponen como único género válido el género *Isospora* pasando todos los demás géneros antes considerados a ser sinónimos de éste.

Nosotros pensamos que hay suficientes diferencias de momento en varios niveles (intraorgánico, epidemiológico, serológico, etc.)

para conservar esta separación genérica, que supondría por otro lado más problemas de los que pretende resolver en su simplificación.

Hemos seguido por tanto en nuestro trabajo el criterio taxonómico propuesto por FRENKEL y cols. (1979).

Una vez apuntadas las diferentes hipótesis taxonómicas, punto en el cual, como hemos podido constatar, quedan aún lagunas y discrepancias, vamos a pasar revista somera a las características fundamentales de este grupo de parásitos.

#### SUBFILO APICOMPLEXA: Características generales del Grupo

A partir de los hallazgos de LEVINE (1970), fue establecido este grupo atendiendo a la presencia de una estructura típica localizada en la zona anterior del cuerpo denominada "complejo apical".

Esta estructura está formada por: Pared celular, anillos polares, microporo, conoide, micronemas y roptrias.

#### Pared celular

El límite celular de los zoitos coccidianos está construido, según SCHOLTYSECK y MEHLHORN (1970) y SCHOLTYSECK (1979), por una membrana externa y un complejo membranoso interno, compuesto a su

vez por dos unidades de membrana estrechamente relacionadas y formadas con la participación de las vesículas citoplásmicas.

Según VIVIER y cols. (1970), ROBERTS y HAMMOND (1970a) y SCHOLTYSECK y cols (1970), la pared celular varía en anchura en las diferentes especies, pero usualmente no sobrepasa los 40  $\mu$ m.

La membrana externa es continua y engloba totalmente la célula, sin embargo la capa membranosa interna termina cerca del extremo anterior en el anillo polar.

#### Microtubulos

En muchos estados del ciclo de los Apicomplexa, se pueden observar, según SCHOLTYSECK (1979), microtubulos subpeliculares por debajo de la pared celular. En esporozoitos y merozoitos se encuentran regularmente distribuidos por la periferia, recorriendo la célula desde el extremo anterior hasta la región nuclear.

El número de microtubulos es de carácter taxonómico a nivel genérico e incluso específico. Su función parece tener relación con la de movilidad celular.

#### Anillos Polares

El anillo polar es fuertemente osmiofilo y está formado por la capa membranosa interna de la pared celular. Normalmente, exig

te, al menos, un anillo polar en el extremo anterior pudiendo existir un segundo en el extremo posterior e incluso, en ocasiones, un tercero.

Según ROBERTS y HAMMOND (1970a) el anillo polar anterior va a servir de zona de anclaje a los microtubulos subpeliculares.

En cuanto al anillo polar posterior SCHOLTYSECK (1979) asegura que se encuentra siempre presente en los merozoitos jóvenes, siendo precisamente la zona por la cual la célula hija se separa de la célula madre en los procesos de reproducción asexual.

#### Microporo

Esta estructura, formada a partir de la pared celular, fue observada por primera vez por GARNHAM y cols. (1961), VIVIER y HENNERE (1965), le dieron su nombre definitivo. Es un organulo formado a expensas de la pared celular.

#### Conoide

GUSTAFSON y cols. (1954), describieron una estructura en el polo apical de los merozoitos de *T. gondii*, en forma de cono hueco, a la que denominaron "conoide". Se trata de un tronco de cono hueco formado por estructuras fibrilares dispuestas en espiral. Si bien no se sabe con certeza, es probable que la

función del conoide consista en permitir la penetración del parásito en la célula hospedadora mediante un mecanismo desconocido.

#### M i c r o n e m a s

Fueron descritas por GUSTAFSON (1954) en merozoitos de -- *Toxoplasma gondii*, llamándolos "toxonemas". A partir de entonces se le concedieron varios nombres, siempre en relación con el coccidio en que se encontraban, hasta que JACOBS (1967) los denominó micronemas.

La función de las micronemas es desconocida. Algunos autores sugieren una función secretora y otros indican que los micronemas y las roptrias pertenecen a un mismo sistema funcional.

#### R o p t r i a s

Estructuras electrodensas en forma de maza, localizadas en la región anterior de merozoitos y esporozoitos de diferentes Apicomplexas, debiéndose su nombre a SENAUD(1967). Las roptrias varían enormemente de forma, poseen una zona anterior estrecha y una posterior ensanchada. Se encuentran rodeadas por una membrana limitante simple, característica que la distingue de otras estructuras con densidad electrónica que se encuentran en el citoplasma de estos protozoos como lasgotas de lípidos complejos.

Su misión parece estar relacionada con la secreción de enzimas proteolíticas con el fin de ayudar al conoide en la penetración de la célula hospedadora.

El segundo punto sobre el cual existe aún más dudas que en lo que se refería a niveles taxonómicos es el relacionado con los mecanismos de transmisión del parásito. Si bien está establecido los dos tipos de transmisión: Congénita y Adquirida. Es en este segundo punto en el que se presentan mayores problemas, y además es el que representa el 99% de las infecciones, ya que el mecanismo vía placenta es el mayormente estudiado y el que presenta un cuadro patognomónico más definido.

Es, por tanto, el mecanismo de transmisión que acaece después del nacimiento sobre el cual nos quedan numerosas dudas, las fuentes de adquirir la infección son muy numerosas, ingestión de carnes que contengan quistes viables, productos naturales (leche, huevos, etc.), experimentalmente se han conseguido medios en los cuales el parásito se encuentra y puede ser - - - vehiculado de un ser a otro, como en el semen de ciertos animales (DUBEY, J.P., 1980); y, finalmente, tenemos los oocistos expulsados por el gato, que fueron evidenciados por primera vez por HUTCHISON en el año 1965.

El medio, por ello, más natural biológicamente hablando de contraer la infección es mediante la ingesta de alimentos que

contengan ooquistes esporulados.

HUTCHISON (1967) repitió sus experimentos en heces de gatos infectados, suponiendo que las formas infectantes eran vehiculadas por huevos de *Toxocara cati*, ascarido frecuentemente encontrado en el gato, comparando este tipo de transmisión con la de *Histomonas meleagridis* por huevos del nematodo *Heterakis gallinae*.

Pero fue JACOBS en 1967, que inoculando ratones con heces flotadas de gato, libres de huevos de *Toxocara cati* el que demostró la infectividad de éstas.

DUBEY (1968), HUTCHISON y cols (1968), SCHEFFIELD y MELTON (1969), FRENKEL y cols. (1969), siguiendo las investigaciones anteriores, llegaron a la conclusión que la transmisión del Protozoo no guardaba ninguna relación con los huevos del *T. cati*.

Posteriormente, se avanza en el ciclo intraorgánico del gato y son numerosas las aportaciones de diversos autores como: HUTCHISON y cols. (1969-1970 y 1971), SHEFFIELD y MELTON (1970a), FRENKEL y cols. (1970), DUBEY y cols. (1970a), OVERDULVE (1970), WEILAND y KUHN (1970), WITTE y PIEKARSKI (1970), ZAMAN y COLLEY (1970), COLLEY y ZAMAN (1970), SHEFFIELD (1970), DUBEY y cols. (1970b), WALTON y WERNER (1970), PIEKARSKI y WITTE (1971) describen ciertas fases coccidianas en las células epiteliales del intestino del gato, tras la inoculación oral con bradizoitos.

FRENKEL y cols. (1970), MILLER y cols. (1972), definen los conceptos de hospedador definitivo e intermediario.

FRENKEL y cols. (1970), administraron a gatos cada uno de los tres estados vegetativos de *Toxoplasma gondii*, resultando diferentes períodos de prepatencia para cada uno de ellos.

CORDERO DEL CAMPILLO (1973) afirma que de las 36 especies que posee la familia Felidae, sólo en siete se ha llegado a la formación de oquistes perteneciendo a dos géneros: *Felis* y *Lynx*, siendo éstas: *F. catus*, *F. yagouaroundi*, *F. pardalis*, *F. bengalensis*, *F. concolor*, *Lynx lynx* y *L. rufus*.

En cuanto a los hospedadores intermediarios el número de especies que pueden actuar como tales es muy elevado, perteneciendo a los más variados grupos taxonómicos.

DUBEY y FRENKEL (1972) describen cinco fases asexuadas, así como la gametogonia en el intestino del gato tras la ingestión de quistes con bradizoitos.

HUTCHISON y cols. (1971), KUHN y col. (1974), OVERDULVE (1978) han sido los únicos en estudiar ciertos procesos producidos en el intestino de los gatos tras la ingestión de oquistes.

CHINCHILLA y RUIZ (1976) apuntan el posible papel de las cucarachas como hospedadores de transporte de *Toxoplasma gondii*. SMITH y FRENKEL (1978) observan que la cucaracha *periplaneta americana*, puede después de haber ingerido ooquistes de *Toxoplasma* transmitirlos por sus heces hasta diez días después de la ingestión.

CHESSUM (1972) y DUBEY (1976), provocan la reeliminación de ooquistes de *T. gondii* por gatos con infección crónica, debido a la posterior infección con *Isospora felis*, explicándose dicho proceso como un fenómeno de interferencia inmunológica.

DUBEY (1978) encuentra que en gatos infectados con *Isospora felis* antes que con *T. gondii*, se evitaba la reeliminación de ooquistes de *T. gondii* por una nueva infección con *Isospora felis*.

DUBEY y FRENKEL (1976) encuentran que se producen quistes cerebrales en ratones a los cinco días de ser inoculados con taquizoitos, a los 7-9 días de ser inoculados con bradizoitos y a los 9-10 días de serlo con ooquistes.

Asimismo delimitan los diferentes períodos de prepatencia conforme al estado productor de la infección.

VRABLIC (1977) estudia la morfología y biología de los gametocitos de *T. gondii*.

OVERDULVE (1978) estudia el ciclo biológico intestinal de *T. gondii* en gatos libres de germen, gnotobioticos y convencionales, recalcando que todos los trabajos realizados, hasta el momento sobre este particular, han sido realizados con gatos convencionales. Asimismo, observa que los taquizoitos no son transmisibles siguiendo la vía digestiva.

DUBEY (1977) señala la existencia de *Hammondia hammondi* ya descubierto por Frenkel y Dubey (1975) afirmando que existen diferencias para mantenerlo como género separado de *Toxoplasma gondii*. Estas diferencias esenciales son las siguientes:

- 1.) Los quistes de *Hammondia hammondi* se localizan fundamentalmente en músculo esquelético y no en cerebro como en el caso de *T. gondii*.
- 2.) *Hammondia hammondi* es obligatoriamente heteroxeno y no facultativo como en *T. gondii*.
- 3.) La débil producción de anticuerpos anti-*Toxoplasma* en ratones infectados con *Hammondia* (no así en gatos) detectada mediante el Dye-Test (Frenkel y Dubey 1975).

LEVINE, no considera razones suficientes para establecer diferencias específicas, por lo que propone que el nombre correcto para *Hammondia hammondi* sea el de *Toxoplasma hammondi* (Frenkel

y Dubey, 1975).

DUBEY (1977) por el contrario opina que el simple hecho de que Hammondia sea obligatoriamente heteroxeno, es razón suficiente para mantenerlo como género aparte.

Del mismo modo, FRENKEL (1977), sigue manteniendo el género Hammondia y la especie Hammondia hammondi como especie tipo.

Hay que tener en cuenta que hay diversas especies del género Hammondia en diferentes hospedadores, tales como H. heydorni (Tadros y Laarman, 1976) parásito del perro. Hammondia pardalis y H. equicanis, H. bovicanis y H. ovicanis. (Tadros y Laarman, 1982).

Dubey (1977) propone el cambio de género para Isospora felis , Isospora rivolta, Isospora canis, etc ., basándose en el ciclo extraintestinal que presentan estos parásitos.

DUBEY y FRENKEL (1974), SHEFFIELD y MELTON (1974) y - - - OVERDULVE, 1978, señalan que la inmunidad frente a T. gondii en el gato persiste durante largo tiempo (2 años), aunque ésta decrece ostensiblemente alrededor de los veinte meses aproximadamente.

WALLACE (1975) señala que la respuesta inmunitaria en gatos frente a H. hammondi es de escasa significación.

SHEFFIELD y MELTON (1974), apuntan que los anticuerpos circulantes en el gato no juegan un papel decisivo en la prevención de la excreción oocística.

DUBEY (1977a) señala que los anticuerpos maternos adquiridos en la leche protegen pasivamente a los gatitos del ciclo enteroepitelial, estas inmunoglobulinas son del tipo IgA e IgM.

OVERDULVE (1978), afirma que bajo condiciones naturales, la mayoría de los gatos expulsaron oocistos una sola vez en su vida.

DUBEY (1977) ha demostrado la persistencia de estados infecciosos de *Toxoplasma gondii* en mucosa y submucosa después de 4 a 18 meses de la infección con quistes tisulares.

El papel por tanto central de los Félidos en la epidemiología y epizootiología de la Toxoplasmosis viene indicada por los siguientes hechos:

- 1.) Ninguna evidencia de infecciones humanas pudo apreciarse en atolones del Pacífico, en ausencia de gatos (WALLACE, 1969)
- 2.) Prevalencias del 4,7% fueron observadas en pueblos de Siberia libres de gatos. Esta cifra se multiplicó por cuatro en ciudades con gatos.

3.) Anticuerpos se encuentran comúnmente en vegetarianos estrictos.

ZAMAN (1970) establece las medidas y morfología de los distintos coccidios del gato, paso de fundamental importancia en el esclarecimiento del parasitismo coccidiano en estos animales.

DUBEY (1967a) establece la distribución quística en los diferentes tejidos de gatos infectados en fase aguda y crónica, estableciendo que es el cerebro el órgano mayormente afectado, en las dos fases de la infección.

DUBEY (1977a), señala la importancia que la edad y el sexo tienen en los gatos frente a la inmunidad contraída por estos, señalando que la tasa de anticuerpos es más elevada a partir del comienzo de su vida cazadora.

CHRISTIE y DUBEY (1977), WEILAND (1979) señalan la presencia de inmunidad cruzada entre Hammondia y Toxoplasma en ratones y hamsters.

APARICIO (1972) presenta el problema que la Toxoplasmosis tiene en España, señalando la presencia de ésta en un 1/3 de la población española, indicando que de este número 300.000 han presentado significación clínica.

APARICIO (1966) en una encuesta serológica realizada en animales de abasto, señala la importancia que los suidos tienen en la Europa Occidental, junto con los bovinos y ovinos.

REY CALERO (1967) sobre una encuesta serológica realizada en la Provincia de Cádiz señala las diferencias entre los habitantes del litoral y los de montaña, relacionada seguramente con la presencia de animales y régimen alimenticio.

GANLEY (1980), señala la relación existente entre Asociación con gatos y Toxoplasmosis.

JACOBS (1964) apunta que es posible la infección toxoplásmica en ausencia de anticuerpos demostrables.

LOVELACE y cols. (1978) señala la presencia de anticuerpos en indios Ticuna, comunidad étnica amazónica que no tienen ningún contacto con felinos en sus poblados y su régimen alimenticio es fundamentalmente piscívoro y frugívoro, no conociéndose las actividades agrícolas ni ganaderas.

IPPEN y cols. (1981) en una encuesta serológica realizada en animales de Zoológico señala la gran incidencia que las aves presentan frente a la infección en comparación con los mamíferos, siendo las columbiformes y anseriformes las que presentan mayores tasas de infección.

Uno de los problemas que se plantean a la hora de diagnóstico coprológico, es saber identificar con certeza los hallazgos encontrados. Hay que tener en cuenta que son numerosos los coccidios que alberga el gato, algunos de ellos de morfología y medidas similares y la única manera de ponerlos en evidencia es mediante biopruebas.

LEVINE en el año 1981 clasificó los coccidios del gato y de los carnívoros en general, clarificando toda la parasitología coccidiana de estos animales.

El gato doméstico (*Felis catus*) puede albergar por tanto en su interior los siguientes coccidios:

1.) Eimeria cati (Yakimoff, 1933)

ooquistes ..... 18-23 x 14-20  $\mu$  m.  
esporocistos ... 16-22  $\mu$  m.

2.) Eimeria felina (Nieschulz, 1924)

ooquistes ..... 21-26 x 13-17  $\mu$  m.

3.) Isospora felis (Wenyon, 1923).

ooquistes ..... 32-53 x 26-43  $\mu$  m.  
esporocistos ... 20-27 x 17-22  $\mu$  m.

- 4.) Isospora rivolta (Grassi, 1879 - Wenyon, 1923)
- ooquistas ..... 21-28 x 18-23  $\mu$  m.  
 esporocistos ... 14-16 x 10-13  $\mu$  m.
- 5.) Sarcocystis hirsuta (Moulé, 1888)
- 6.) Sarcocystis gigantea (Raillet, 1886)
- 7.) Sarcocystis porcifelis (Dubey, 1976)
- 8.) Sarcocystis fmgiformis (Raillet, 1897)
- 9.) Sarcocystis muris (Blanchard, 1885)
- 10.) Sarcocystis leborum (Crawley, 1914)
- 11.) Sarcocystis cuniculi (Brumpt, 1913)
- 12.) Sarcocystis cyruensis (Ashford, 1978)
- 13.) Toxoplasma gondii (Nicolle y Manceaux, 1908)
- 14.) Hammondia hammondi (Frenkel, 1974) = (Toxoplasma hammondi)  
 (Frenkel, 1974).
- 15.) Toxoplasma pardalis = (Hammondia pardalis) (Hendricks, 1979)
- ooquiste ..... 36-46 x 25-35  $\mu$  m.  
 esporocisto ... 19-25 x 14-19  $\mu$  m.
- 16.) Besnoitia besnoiti (Marotel, 1913)
- ooquiste ..... 14-16 x 17x14  $\mu$  m.

17.) Besnoitia wallacei (Tadros y Laarman, 1976)

ooquiste ..... 16-19 x 10-13  $\mu$  m.  
 esporocistos . 11 x 7-8  $\mu$  m.

18.) Besnoitia darlingi (Drumpt, 1913)

19.) Besnoitia Sp. (Ito, Tsunoda y Shimura, 1978), considerada antiguamente como Isospora bigemina raza grande.

ooquistes .... 14-18 x 12-15  $\mu$  m.  
 esporocistos . 10-14 x 8-9  $\mu$  m.

CORDERO (1973) clasifica a los hospedadores intermediarios del T. gondii en cuatro grupos:

- A - De receptividad máxima (ratón, gundi, ratón criceto, rata de algodón, conejo, cobaya y otros). En todos ellos la infección experimental provoca la muerte con dosis bajas de parásitos (4-8) de suficiente virulencia.
- B - De receptividad alta (perro, cerdo, oveja, zorro, lobo, gato). Se trata de animales que ofrecen cierta resistencia al parasitismo y cuya respuesta a la infección depende de la dosis empleada, el estado del animal y otras circunstancias. En ellos la infección puede ser latente desde el principio, pasar directamente a una fase aguda, con terminación letal (generalmente en fetos), o bien desembocar en una latencia crónica tras la fase aguda. En este grupo situamos también al hombre.

- C - De receptividad media (rata gris, turón, rata blanca de laboratorio y otros). Son animales sensibles, particularmente de jóvenes o sometidos a "stress" (incluida la aplicación de inmunodepresores) en los que no provoca manifestaciones clínicas, ni siquiera con dosis elevadas, siendo la formación de anticuerpos, con la localización de quistes en el cerebro, a veces con tendencia regresiva, la única reacción observada en ellos.
- D - Sin receptividad: En general invertebrados (helminths, artrópodos, etc.) y algunos vertebrados poiquiloterms, en los cuales no hay realmente multiplicación del agente o sólo lo es efímera. Mas bien, procede hablar de supervivencia de *T. gondii*.

Pero aunque es una clasificación meramente empírica, tiene gran valor epidemiológico. Al lado de los felinos, por ser hospedadores definitivos, los animales de receptividad máxima (Grupo A) desempeñan un importante papel en el mantenimiento de los focos naturales de infección. El interés de los otros grupos es decreciente.

Pero en el diagnóstico de la Toxoplasmosis en poiquiloterms debemos extremar nuestras medidas ya que hallazgos encontrados habitualmente en éstos y diagnosticados como *Toxoplasma*

posteriormente se ha visto que correspondían a géneros diferentes como Lankesterella, Schllackia y Besnoitia Spp, ya que a estos hallazgos les faltó la comprobación en la inoculación de ratones con el material infectante.

Parece ser que temperatura corporal y condiciones generales a niveles bioquímico y biofísico juega un papel importante en la baja receptividad de estos animales.

Los únicos poiquiloterms que quizás tuvieran importancia a nivel epidemiológico serían los ofidios, ya que su dieta es a base de mamíferos y aves, frecuentemente portadores de *T. gondii*.

Entre los hospedadores homeotermos cerca de doscientas especies son las que pueden formar quistes de *Toxoplasma*.

Entre las aves tenemos los órdenes: Gallinacei, Columbace, Lamellirostres, Steganopodes, Accipitres, Striges, Passares, etc.

Entre los mamíferos tenemos los siguientes órdenes: Monotrema, Marsupialia, Insectivora, Chiroptera, Primates, Carnivora, - - - Perisodactyla, Artiodactyla, Rodentia y lagomorpha, principalmente.

Al igual que los errores cometidos en reptiles, en las aves parece ser que muchos de los diagnósticos efectuados han sido erróneos, confundiendo al *T. gondii* con otros esporozoa, pertene-

cientes al género *Lankesterella* (= *Atoxoplasma*).

Entre los mamíferos tenemos que prestar mayor interés a aquellas especies que conviven con el hombre estrechamente, más las que éste utiliza como alimento, bien sean animales de abasto o de caza. Por el momento, digamos que los que realmente representan una fuente de infección para nosotros, como señala Aparicio (1968), en la Europa Occidental son los cerdos, ovejas y vacas (estas mucho menos que las dos especies anteriores).

Una de las características, aparte de las ya enumeradas del *T. gondii*, lo representa su ciclo biológico, o mejor dicho, parte de él, de las fases que consta el ciclo evolutivo dos son las que presentan variaciones con respecto a los coccidios: Fase proliferativa y la quística o de reposo, ya que el resto de las fases: agamogónica, gametogónica y esporulativa, son similares a las coccidianas.

Finalmente, hay que tener en cuenta que la especie *Toxoplasma gondii* no está constituida por un agregado de individuos homogéneos, sino que como muchas otras especies, está formada por numerosas poblaciones que difieren en cuanto a su virulencia, aunque se admite que hay un serotipo universal.

Las variaciones de actividad de las diversas cepas han sido denunciadas por numerosos investigadores en uno y otros hospedadores, hemos visto en apartados anteriores como en la infección del gato, no todas las cepas daban lugar a la expulsión ooquistica, no llegaban por tanto a completar el ciclo evolutivo, al igual que han aparecido diferencias en los períodos de prepatencia.

Todos estos hechos han llevado a la comisión de expertos de la O.M.S. (1969) a recomendar que, ante cualquier aislamiento de *T. gondii*, se proceda a identificar claramente su origen, con detalles relativos al hospedador, persona que lo aisló y demás características, haciendo cuanto antes la valoración de la cepa aislada, en todos sus detalles, pero particularmente la virulencia, a fin de conocer las modificaciones ulteriores que pudieran provocarse en la cepa. Todos estos detalles deben comprobarse en el animal experimental tipo que es el ratón.

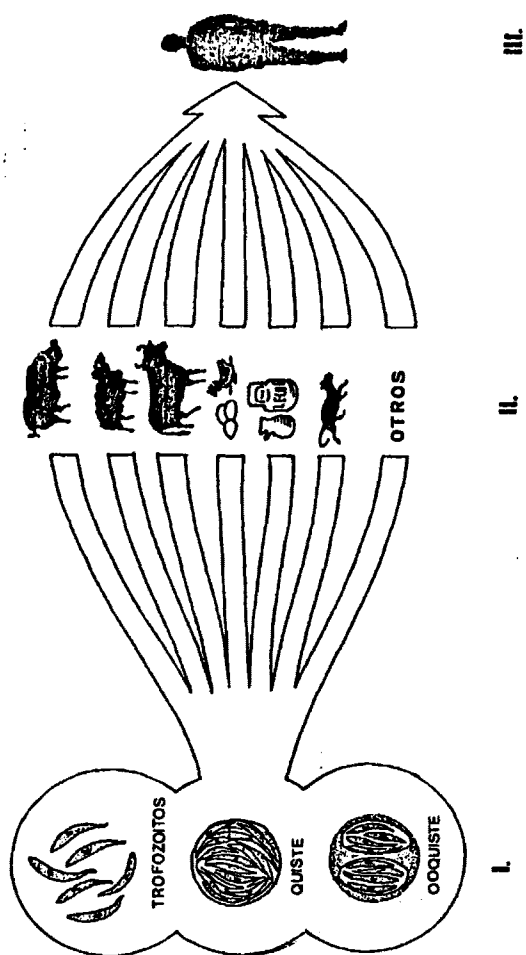
La virulencia, por tanto, debe expresarse en términos cuantitativos, tipificando los inoculos.

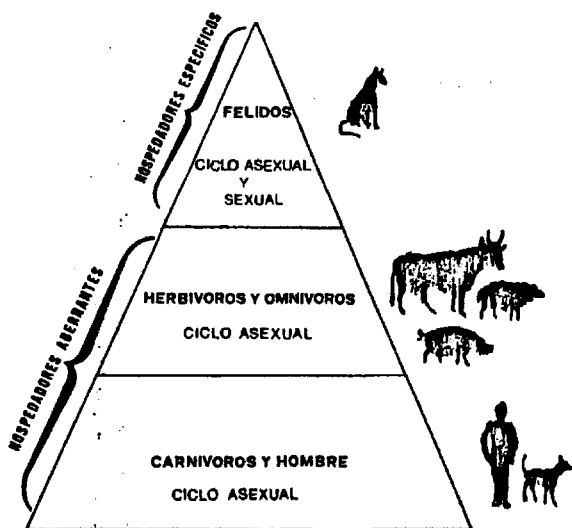
-----

## CRONOLOGIA DE LA TOXOPLASMOSIS

Autores y año	Contribucion.
Nicolle - Manceaux (1908)	Descubierto en gondis.
Splendore (1908)	Descubierto en Conejos
Mello (1910)	Enfermedad descrita en un perro
Janku (1923)	Identificado en un ojo humano
Wolf - Cowen (1937)	Toxoplasmosis congenita humana
Pinkerton - Weinman (1940)	Enfermedad fatal en un adulto
Sabin (1942)	Caracteriz. la enferm. en el hombre
Sabin - Feldman (1948)	Descripcion del dye-test
Siim (1952)	Toxoplasmosis glandular en el hombre
Hartley - Marshall (1957)	Casos de aborto en ovejas
Beverley (1959)	Transmision congenita en raton
Jacobs (1960)	Caracterizacion biologica de quistes
Hutchison (1965)	Transmision fecal en gatos
Hutchison, Frenkel, Dubey Overdulve, Weiland, Zaman (1970)	Descripcion de fase coccidiana
Frenkel (1970), Miller (1972)	Huesped def. e intermed. definidos
Dubey & Frenkel (1972)	5 tipos de esquizontes descritos en el intestino del gato
Wallace (1969), Munday (1972)	Confirmacion del papel epidemiologico del gato : estudios en islas

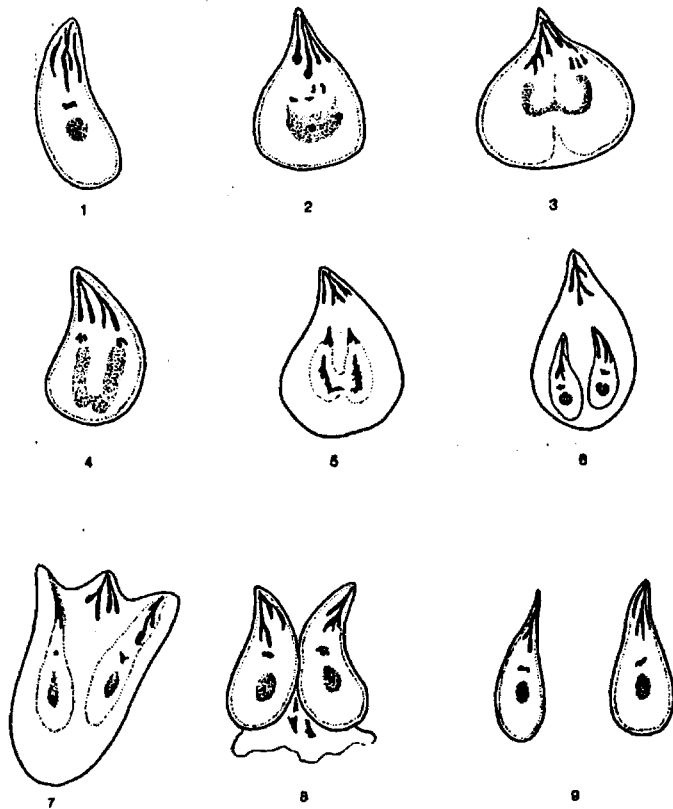
CADENA EPIDEMIOLOGICA





**EPIDEMIOLOGIA GENERAL DE LA TOXOPLASMOSIS**

Proceso de división por endodiogenia de *Toxoplasma gondii*



ENDEMIAS MUNDIALES.

INTENSA			MÉDIA		ESCASA	
> 60%	50-60%	40-50%	30-40%	20-30%	10-20%	<10%
Costa Rica	Argentina	Belgica	Alemania	Australia	Canada	China
Guatemala	Austria	Francia	Arabia	Bulgaria	Corea	Indonesia
Honduras	Brasil	Camerun	Colombia	Checoslovaquia	Egipto	Irak
Libano	El Salvador	Ceylan	Cuba	Eritrea	India	Islandia
Nigeria	Ghana	Congo	Espana	E.E.UU	Japon	
Islas Pacifico	Pakistan	Chile	Grecia	Inglaterra	Malasia	
Venezuela	Togo	Ecuador	Haiti	Marruecos	Noruega	
		Holanda	Israel	Rhodesia	Polonia	
		Hungria	Italia	Suecia	Rumania	
		Madagascar	Mejico	URSS	Senegal	
				Tunez	Sudan	
				Uganda		

41

MATERIAL Y METODOS

El trabajo epidemiológico en los félidos estudiados comprende de los siguientes puntos:

- 1.) Estudio coparazitológico realizado en una población de gatos de los pueblos de los alrededores de Madrid y Provincias vecinas.
- 2.) Estudio micromorfométrico coccidiano.
- 3.) Serología de un subgrupo de la población de félidos.
- 4.) Estudio coparazitológico de los félidos del Parque Zoológico de Madrid.
- 5.) Serología del personal que trabaja con félidos de esta - - Facultad.

#### M A T E R I A L

##### 1.) ESTUDIO COPARASITOLÓGICO DE UNA POBLACION DE GATOS: (Felis catus)

La población elegida para su estudio ha sido recogida durante estos últimos años en las siguientes Provincias y Pueblos:

##### - Provincia de Madrid:

La Cabrera, Bustarviejo, Valdemando, Torrelaguna, Moratalaz, San Sebastián de los Reyes, Lozoyuela de la Sierra, Aldea

Vieja, San Martín de Valdeiglesias y Canencia de la Sierra.

- Provincia de Toledo: Talavera de la Reina y Cebolla.

- Provincia de Segovia: Santo Tomé del Puerto y Somosierra.

- Provincia de Guadalajara: Jadraque, Sigüenza, Cifuentes, Brihuega y Atienza.

La muestra de gatos presenta en su mayoría las mismas características; a saber: vida rural, aunque la mayoría poseían dueños, pero con alimentación diversa, gatos por tanto que tienen un interés epidemiológico por completar su alimentación con - - presas vivas, y que por estar en contacto con las personas - - podían tener, a la hora del estudio, un interés real.

Estos gatos fueron obtenidos de diferentes maneras, gran parte de ellos eran regalados o vendidos a los proveedores de esta Facultad por sus dueños, otros fueron capturados en la Naturaleza.

Estos gatos eran llevados al animalario de esta Facultad, donde inmediatamente de su captura se les empezaba a hacer el estudio coprológico. Esto tiene gran interés porque se evitaba que gatos infectados previamente pudieran resultar negativos por un almacenamiento excesivo antes de su estudio, ya que la

expulsión coquistica se realiza por un período de tiempo breve y a intervalos irregulares, con lo que el muestreo resulta sumamente complejo.

Estos gatos eran, por tanto, examinados a principio de cada semana, ya que su recolección se realizaba durante los fines de semana y llegaban a la Facultad generalmente el domingo por la tarde.

Los gatos antes de realizar nuestro experimento no recibieron ningún tratamiento antiparasitario ni bacteriano.

Estos gatos posteriormente eran utilizados por los Departamentos de esta Facultad con diferentes fines de investigación. Se desecharon gatos que en un principio habían sido sometidos a manipulación tanto externa como interna (colocación de electrodos, administración de fármacos, etc.).

Las edades comprendidas son muy amplias debido al tamaño de la muestra, pero predominan las edades comprendidas entre los 2 y 5 años, gatos menores de 5 meses escasísimos por la dificultad de obtención y por no ser requeridas estas edades con frecuencia con fines de investigación.

Así que en principio la muestra por la edad y costumbres representa un conjunto ideal bajo el punto de vista epidemiológico.

gice. Los datos sobre la edad y demás características fueron obtenidas directamente del proveedor.

El protocolo seguido en este estudio epidemiológico fue el siguiente:

Los gatos una vez recibidos en el animalario eran confinados en jaulas como muestra la figura de la página 88. Las heces depositadas diariamente eran almacenadas en la bandeja situada en la parte inferior.

La toma de muestras la realizamos de la siguiente manera:

Eran controlados los gatos a medida que iban llegando, y las jaulas eran numeradas para controlar perfectamente el ejemplar si hubiera necesidad de posteriores estudios, no se miraron jaulas que tuvieran un número superior a 2 gatos, pues a la hora de protocolizar las heces podía influir en el muestreo.

Las heces se tomaban en su totalidad de la bandeja, éstas eran depositadas en sobres como muestra la figura de la página 89 en los que figuraba el número de gatos observados y el número asignado de la jaula, ya en el laboratorio se tomaba un pool de estas muestras, se homogeneizaban en solución de  $SO_4Zn$  al 33% y se operaba como muestra la figura de la página 90.

Empleamos este método simplificado de concentración por flotación ya que, previamente, nos había dado unos resultados excelentes para el estudio de protozoos intestinales, ya que el  $\text{SO}_4\text{Zn}$  no distorsiona los quistes de protozoarios. Como suele ocurrir con el  $\text{ClNa}$  de la solución de Willis, aunque nosotros hemos podido comprobar que el método de concentración por flotación en  $\text{ClNa}$  no alteraba la membrana ooquistica.

Este método lo empleamos al principio como protocolo selectivo para la detección coccidiana en las heces.

Las coccidias eran sometidas a métodos micromorfométricos, los oculares micrométricos al principio eran calibrados con los objetivos micrométricos correspondientes para establecer la escala en diferentes objetivos.

Los oculares y objetivos micrométricos empleados para este estudio -marca Nikon-, fueron utilizados en todas las muestras, de esta manera hemos podido poner en claro todas las medidas definitivas de las diferentes coccidias del gato, punto en el cual quedaban algunas lagunas y daban pie a confusiones a la hora de establecer un verdadero diagnóstico.

Hemos podido constatar nuestros datos con los establecidos por Zaman (1970), con los que estamos en concordancia.

Cuando aparecieron coccidias de medias correspondientes a *T. gondii* o *Hammondia hammondi*, todas las heces del sobre se procesaron mediante la Técnica de la Sucrosa (página 86) por técnica en C1Na y sedimentación en 24 horas (página 84). Los oquistes posteriormente se dejaron en Dicromato potásico durante una semana para su esporulación, estos oquistes, antes de ser inoculados en ratón, el sedimento era resuspendido en agua e inoculado vía oral (ruta de mayor efectividad), y de esta manera quedaba comprobado con precisión la naturaleza exacta de los oquistes aislados, ya que el ratón es el animal que reúne todas las características necesarias (siempre se infecta con *T. gondii* y muere en el caso de que la cepa inoculada sea virulenta), de aquí que se tome como modelo para tipificar la virulencia de las distintas cepas aisladas.

Los gatos fueron procesados en un sólo estudio coprológico diario, pero hemos realizado un reforzamiento a dicho muestreo un estudio en un subgrupo de la muestra a 100 gatos que fueron observados durante siete días consecutivos. El tamaño de la muestra estudiada ha sido de 600 ejemplares.

## 2.) ESTUDIO MICROMORFOMETRICO COCCIDIANO

El estudio morfológico coccidiano representa en la epidemiología de la *Toxoplasmosis* uno de los eslabones de mayor importancia, ya que muchas veces, debido a la dificultad de establecer un verdadero diagnóstico coccidiano en los félidos -por el parecido de algunas de sus coccidias-, se puede llegar a crear un cierto confusio<sup>n</sup>ismo a la hora del hallazgo de coquistes de *T. gondii*.

Por todo ello, nos propusimos en este trabajo reflejar la incidencia coccidiana en la muestra de félidos estudiada, así como las medidas de los equistes y esporoquistes que habitualmente albergan estos animales, con el propósito de establecer, de una manera clara, las distintas coccidias que, con medidas determinadas e incidencia distinta, iban apareciendo en los gatos y félidos salvajes.

Para nuestro estudio, por tanto, utilizamos la muestra base, en la que diariamente, a medida que se iba realizando su protocolo, iban anotándose cuidadosamente las medidas de todas las coccidias aparecidas y, finalmente, al terminar el estudio de la muestra llegar a establecer los porcentajes de cada una de las coccidias que albergan habitualmente estos félidos.

Hemos llegado al convencimiento que donde suelen encontrarse dificultades, es a la hora de establecer el diagnóstico

certero entre *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi*, esta úti ma descubierta por Frenkel y Dubey en el año 1975, por Wallace (1975) y posteriormente ratificado por el propio Dubey y - - - Streitel (1976), pero hasta el momento no se le conoce, en su ciclo biológico, el verdadero hospedador intermediario, aunque ratones, hamster y otros roedores se han utilizado como hospedadores intermediarios en experimentaciones.

La diferencia exacta, por tanto, entre *Hammondia Toxoplasma* se realiza mediante biopruebas, inoculando el material obtenido en ratones blancos y comprobando, mediante pruebas histológicas y serológicas, su verdadera identidad.

A diferencia de *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* no forma habitualmente quistes en el cerebro sino en musculatura, presentando además en el ratón pruebas serológicas cruzadas con *T. gondii* aunque de bajo título como hemos podido comprobar. Christie y Dubey (1977).

El ciclo biológico de *Hammondia hammondi* queda reflejado en el esquema que figura en la página 114, en comparación con el de *T. gondii* (página 113).

Todas las medidas han sido realizadas con microscopio binocular y oculares micrométricos marca Nikon.

### 3.) SEROLOGIA DE UN SUBGRUPO DE LA MUESTRA DE UNA POBLACION DE GATOS

Paralelamente al estudio coparazitológico realizado en la muestra de gatos, hemos realizado un estudio serológico en un subgrupo de dicha población.

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados -- sobre la Toxoplasmosis se han realizado mediante pruebas serológicas, y aquí es donde se nos plantea uno de los problemas a la hora de dar una explicación para intentar ponder en claro las discrepancias numéricas observadas entre el diagnóstico directo e indirecto.

Los estudios serológicos realizados en gatos dan una incidencia que oscila entre un 14 y un 86% (ver página 105), lo cual a primera vista nos indica una incidencia relativamente alta en gran número de países estudiados. Por todo ello era necesario estudiar y contrastar nuestros resultados coprológicos con las inmunopruebas, para intentar dar una explicación o establecer la verdadera importancia epidemiológica del gato en la Toxoplasmosis.

Los sueros utilizados para nuestro estudio proceden de un subgrupo de los gatos estudiados coprológicamente. Dicha muestra comprende un número total de 106 sueros procesados.

Estos sueros fueron obtenidos en el momento del sacrificio de los animales; posteriormente fueron almacenados en nevera para permitir una mejor retracción del coágulo y finalmente centrifugados a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos. Una vez obtenido el suero de los ejemplares, era almacenado en viales con tapón de rosca y conservados en congelador a -20° C hasta su procesamiento, el tiempo de almacenamiento de los sueros nunca fue superior a los tres meses.

Todos estos sueros fueron estudiados mediante la técnica de Aglutinación directa, con antígeno de la Casa Bio-Merieux (antígeno pesado) y se realizó su estudio en placas de microtitulación de fondo en U .

La lectura fue realizada en fondo oscuro sobre espejo con luminosidad oblicua.

La elección del método fue debido a la fiabilidad de la prueba de Aglutinación directa, que detecta con gran prontitud las IgM específicas. Esta prueba presenta una alta especificidad, una sensibilidad media y facilidad en la reproductibilidad, por lo que la preferimos a otras pruebas más sensibles pero complejas en su elaboración, aparte de que en un - - - Screening epidemiológico resulta muy eficaz y valorable.

#### 4.) ESTUDIO COPROPARASITOLÓGICO DE UNA POBLACION DE FELIDOS SALVAJES

El gato representa, como hemos visto, el eslabón primario en la epidemiología Toxoplásmica, pero los félidos salvajes, o al menos parte de ellos, se han visto que producen ooquistes, de aquí el interés real que tienen este grupo de animales en la cadena epidemiológica, aunque, como es obvio, su interés bajo el punto de vista en epidemiología humana no es tan importante como el gato doméstico.

Es en el año 1970 cuando comienzan los estudios sobre félidos salvajes para intentar ampliar el círculo de hospedadores definitivos, y es Frenkel el que primeramente demostró que puede cumplirse la gametogonia en el lince y el jaguar. A partir de este momento, numerosos investigadores van sumando hallazgos, Janitschke y Werner (1972) incluyeron en la lista al tigre de bengala y Miller y col. (1972) a pumas y linceas. (Cit. por Cordero -1973-).

En el momento actual después de numerosas investigaciones, se ha podido comprobar que únicamente los félidos son los únicos capaces de expulsar ooquistes en sus deyecciones. Es por todo esto que hemos querido incluir en nuestro trabajo una investigación coprológica que, por otra parte, no ha sido aún realizada en nuestro País, para que el estudio epidemiológico fuera lo más amplio posible.

El estudio fue realizado en el Zoológico de Madrid, en dos fases, con un intervalo de tiempo entre ambas de tres meses aproximadamente, viendo la totalidad de los félidos existentes en dicho Parque, en cada uno de los muestreos.

El estudio coparazitológico fue realizado, por tanto, en las siguientes especies:

- 1.) *Panthera Onca* (Jaguar)
- 2.) *Panthera Leo* (León del Atlas)
- 3.) *Panthera Leo* (León)
- 4.) *Lynx lynx* (Lince)
- 5.) *Felis Tigrina* (Gato Margay)
- 6.) *Acynonix Jubátus* (Güepardo)
- 7.) *Panthera Pardus* (Leopardo)
- 8.) *Felis Concolor* (Puma)
- 9.) *Panthera Pardus* (Pantera negra)
- 10.) *Panthera Tigris* (Tigre de Bengala)
- 11.) *Panthera Pardus* (Pantera China)

De las once especies estudiadas, se realizó un estudio de las condiciones de vida, así como tipo de alimentación y

revisiones veterinarias efectuadas.

Los datos nos fueron suministrados por los veterinarios del Parque Zoológico y pudimos ver que podían incluirse perfectamente en nuestro estudio por reunir las características necesarias (vida semi-salvaje, alimentación con ganado muerto y presas vivas suministradas regularmente -aves en general-). La carne ingerida era sobre todo de equidos y ganado vacuno. Estos animales no habían sido sometidos a fármacos antiparasitizantes, ni la carne ingerida por ellos sometida a ningún tipo de proceso.

Las muestras de heces fueron recolectadas directamente por sus cuidadores en el momento de la limpieza de las jaulas y de los recintos al aire libre donde habitualmente se encontraban estos animales.

Las muestras fueron envasadas en frascos de plástico con tapón de rosca (esterilizados) en los que se anotaron los nombres de cada uno de los animales y día de recogida.

Estas muestras fueron procesadas inmediatamente a su llegada al laboratorio, y el procedimiento empleado fue similar al empleado con los gatos (como figura en el apartado primero).

El estudio serológico fue imposible realizarlo, por las dificultades obvias que ello comportaba.

El interés que creo tiene este estudio de los animales salvajes en cautividad es el siguiente:

- Las condiciones de stress a las que son sometidos estos animales durante el transporte y las infecciones concurrentes, pueden promover la activación de una Toxoplasmosis latente.
  
- El riesgo de contagio es más alto, teóricamente, aquí pues su alimentación se lleva a cabo mediante animales domésticos, los cuales están más expuestos a la infección, por su almacenamiento en establecimientos controlados (granjas, etc.)

Por todo ello, era interesante comparar nuestros datos con los de otros países, para poner de manifiesto posibles - - infecciones que pudieran ser de origen primario (Toxoplasmosis contraída en el lugar de origen), o secundario (contraída por contagio durante su permanencia en el Jardín Zoológico).

**3.) SEROLOGIA DEL PERSONAL QUE TRABAJA CON FELIDOS DE ESTA FACULTAD.**

Para completar este estudio epidemiológico hemos querido plasmar la importancia que tendría el estrecho contacto con estos félidos en la incidencia de la infección, realizando un muestreo de todo el personal de esta facultad que, durante un período amplio de tiempo, hubiera trabajado con gatos o que de alguna manera su relación con éstos hubiera sido constante.

Para ello recogimos muestras de sangre del personal investigador, ayudantes y cuidadores del animalario de esta facultad; la toma fue realizada mediante punción venosa (vena radial). Esta sangre fue almacenada en cámara fría durante 24 horas y posteriormente separado el suero para su estudio.

A diferencia del estudio realizado en los gatos, en esta última muestra, por ser menos numerosa y porque los resultados había que matizarlos con mayor precisión, recurrimos a hacer el estudio mediante dos pruebas alternativas: Aglutinación directa e Inmunofluorescencia indirecta. Con ambas pruebas hemos podido establecer una titulación precisa que nos reflejara la situación real de todas estas personas en estrecho contacto con gatos durante un período de tiempo que osciló entre uno y cinco años.

El antígeno empleado para la aglutinación directa fue servido por la Casa Bio-Merieux, antígeno en suspensión, el mismo antígeno empleado para la serología de los félicos.

El antígeno para la inmunofluorescencia indirecta perteneciente a la misma Casa nos fue servido liofilizado en cajas de 4 viales de 1 ml. cada uno. Este antígeno, una vez resuspendido en solución salina fisiológica, está listo para su empleo.

La antigammaglobulina marcada servida por la misma Casa en viales liofilizados, fue resuspendida previamente antes de su empleo. El microscopio empleado para la lectura de la prueba, marca Nikon, de condensador de fondo oscuro que facilita la titulación final.

- - - - -

## M E T O D O S

### 1.) ESTUDIO COPROPARASITOLÓGICO DE UNA POBLACION DE FELIDOS

Tanto en los gatos como en los félidos salvajes del Zoológico se han seguido los siguientes métodos:

- 1.- Recogida de heces.
- 2.- Pool seleccionado para su análisis.
- 3.- Homogeneización en  $SO_4Zn$  (33%) (Método de Faust, simplificado).
- 4.- Análisis microscópico (Estudio Micromorfométrico).
- 5.- Técnicas de concentración en Sucrosa o centrifugación en solución salina saturada para aislamiento de *T. gondii* o *H. hammondi*, y para la concentración coccidiana general.
- 6.- Material conservado en  $Cr_2O_7K_2$  (2%) para su conservación y estudio posterior.
- 7.- Inoculación en ratón blanco (*Mus musculus*) para identificación coccidiana precisa entre *H. hammondi* y *T. gondii*.
- 8.- Sacrificio posterior de ratones (de 30 a 60 días, después de su infección) y estudio anatomopatológico cerebral para identificación de quistes tisulares.
- 9.- Implantaciones esplénicas teñidas con Giemsa, de ratones infectados previamente con oocistos de *T. gondii*.

10.- Microfotografía del material aislado en el tiempo en que duró el estudio coproparasitológico

- - - - -

1.- Recogida de heces

La toma de heces diaria en gatos y la realizada en los dos estudios practicados en el Zoológico de Madrid se obtuvo de la siguiente manera:

Todos los gatos, a medida que iban llegando al animalario, eran introducidos en jaulas que previamente habían sido distribuidas y numeradas como muestra la figura de la página ( 88 ). Estos gatos eran observados inmediatamente de su llegada e muy pocos días después, para evitar la posible pérdida coquistica debido a un retenimiento excesivo antes de su estudio.

Sus deyecciones diarias eran recolectadas de la bandeja inferior de la jaula ( página 88 ) y el conjunto de esas deyecciones era introducido en bolsitas de papel preparadas al efecto en las que figuraba el número de gatos observados (nunca en número superior a dos). Con esto hemos evitado de una manera ostensible que el muestreo posterior no diera resultados significativos y también se constataba el número de la jaula, de esta manera siempre podríamos indagar -en caso de resultado positivo del análisis-

el gato que interesara en un momento determinado del estudio.

## 2.- Pool seleccionado para su estudio

De todas las muestras fecales obtenidas diariamente de los gatos, se realizaba su estudio de un pool obtenido tomando pequeñas cantidades de cada una de las deyecciones.

En las muestras numerosas, procedentes de dos gatos, se procesaban de la misma manera obteniendo de toda la muestra dos porciones significativas para su ulterior estudio.

Con los fólidos del Zoológico operamos de la misma forma.

## 3.- Homogeneización en $SO_4Zn$ (33%) -Técnica de FAUST simplificada-

Hemos empleado en un principio en el procesamiento de todas las muestras el método de Faust simplificado, consistente en la homogeneización de la muestra sometida a estudio en una solución de  $SO_4Zn$  al 33% en unos pocillos de vidrio de 10 c.c. de capacidad de poca profundidad y gran superficie, ideales para las técnicas de flotación.

Nos decidimos por este método debido a los excelentes resultados obtenidos en estudios anteriores en el diagnóstico de

quistes de protozoos.

Aunque hemos podido comprobar que la solución salina saturada (Método de Willis), que en cierta manera altera la membrana química de los protozoos, no afecta a los oquistes coccidianos.

Una vez homogeneizada la muestra con varilla de vidrio de bordes romos, se llena con solución de  $SO_4Zn$  (33%) hasta el borde, formando menisco, y se coloca encima un porta ancho utilizado en Coprología en la técnica de Kate (Figura de la página 89 ).

Se deja durante (5 a 10 minutos) para permitir que los oquistes suban a la superficie y los restos gruesos de las heces de mayor densidad caigan al fondo.

Pasado este tiempo se voltea el portaobjeto con cuidado para no derramar el líquido adherido a su cara interna y dejamos reposar unos momentos, para que los oquistes y demás estructuras queden en reposo y miramos al microscopio con objetivo a seco débil.

#### 4.- Análisis Microscópico (estudio micromorfométrico)

Con objetivo de 20x comenzamos a observar la muestra y vamos anotando mediante la inserción en el ocular del microscopio de una escala graduada (ocular micrométrica), con la cual

vamos obteniendo las medidas de todas las coccidias que van apareciendo.

Estas medidas, así como el estado del desarrollo del ooquiste recién emitido, fueron anotadas diariamente y los datos almacenados para el estudio morfológico y de desarrollo de la parasitología coccidiana de los félidos a lo largo de todo nuestro estudio. Datos que al final, una vez establecidas sus medidas correspondientes, nos han permitido la clasificación y reconocimiento exacto de los coccidios que parasitan de una manera regular a estos animales, punto que presentaba ciertos problemas por la similitud de ciertos coccidios con el género *Toxoplasma*.

Indirectamente este estudio nos ha permitido poder sacar un cuadro con los parásitos más frecuentes del gato doméstico (*Felis catus*). Cuadro que queda reflejado en la página 116.

5.- Concentración coccidiana mediante la técnica de Centrifugoflotación en solución salina o en sucrosa.

Cuando mediante la técnica de flotación (método de Faust simplificado) observamos ooquistes con medidas comprendidas entre 11 x 13 micrómetros, empleamos en todos los casos técnicas de concentración, mediante los métodos de centrifugoflotación en solución salina, descrito en la página 84 ó mediante la técnica de

centrifugoflotación en Sucrosa, descrita en página 86.

Para ello hemos tomado la cantidad total de heces emitidas por el fólido, y mediante homogeneización previa en agua operamos como indican cada uno de los métodos descritos.

Hay que tener en cuenta que tanto los ooquistes de Toxoplasma como de Hammondia salen sin esporular, siendo no infectantes en este estadio, hay que permitir por tanto su esporulación, para posteriormente inocularlos al ratón y así comprobar su verdadera identidad.

6.- Conservación del material aislado en  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$  (2%) para su mantenimiento y estudio posterior.

Una vez que las diferentes coccidias eran reconocidas, se concentraban mediante las técnicas de centrifugoflotación en solución salina y posteriormente eran guardadas en viales con  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$  (2%) para su esporulación y conservación. El Dicromato permite la esporulación coccidiana en un plazo de 3-7 días en presencia de oxígeno.

La esporulación era controlada a intervalos observando la evolución ooquistica en sucesivos días con el microscopio óptico y objetivo 20x.

Una vez obtenida la esporulación y los ooquistes fueron guardados en dichos viales y mantenidos en nevera (+4°C.) para su conservación.

El dicromato posee propiedades bactericidas y fungicidas, con lo que la conservación puede mantenerse por largos intervalos de tiempo manteniendo su infectividad.

#### 7.- Inoculaciones en ratón blanco, para identificación genérica

La identificación morfológica entre los dos géneros: *Toxoplasma* y *Hammondia* sólo es posible mediante biopruebas, y el animal ideal para la realización de estas pruebas es el ratón blanco, la rata no puede ser empleada por presentar elevada resistencia y actuar como animal de almacén.

Es por ello que los ejemplares aislados reuniendo las características suficientes, tanto en tamaño como en morfología, después de su esporulación eran inoculados vía oral en el agua de la bebida o mediante la introducción de los ooquistes con jeringa a la que se le había quitado la aguja.

El ratón se comportará de diferente manera atendiendo a la virulencia y dosis de la cepa utilizada.

Cepas de alta virulencia, pueden matar al ratón en pocos días con dosis pequeñas, estas cepas no producirán quistes tisulares, por el contrario las cepas de baja virulencia respetaran la vida al ratón produciendo quistes en cerebro entre los 30 y 60 días después de la infección. (Dubey, 1977).

Distintamente, los coquistes de Hammondia no producen la muerte del ratón y generalmente no forman quistes en cerebro sino en musculatura.

#### 8.- Sacrificio y estudio histo-serológico de ratones inoculados eralmente con coquistes

Una vez inoculados los coquistes via oral, hay que esperar su evolución posterior para comprobar su virulencia. Hemos visto que no todas las cepas de *T. gondii* presentan la misma patogenicidad en el ratón: unas de ellas, lo mataran en espacio de pocos días en una baja dosis; en cambio otras, respetaran su vida y producirán quistes tisulares. En el caso de *T. gondii*, el 90% de los quistes producidos por la cepa se localizan en el cerebro.

Para *Hammondia hammondi* esta localización es sumamente rara, ya que sus quistestisulares presentan una localización en músculos abdominales, estos quistes tisulares son además más pequeños que los de *T. gondii* (Frenkel y Dubey, 1975). (Cit. por Dubey, 1977).

Estos ratones sacrificados fueron previamente sangrados para estudios serológicos.

El problema que se presenta a este nivel es que ratones infectados con *H. hammondi* presentan inmunidad cruzada frente al *T. gondii*, aunque en este animal el título, al cabo de un mes de infección, suele ser muy bajo como hemos podido comprobar en las cepas aisladas ( 1/8 - 1/16).

El ratón normalmente va a desarrollar anticuerpos frente a *T. gondii* de 3 a 16 días después de la infección (Dubey, 1976).

En cuanto a la serología en ratones infectados, el tiempo en que aparecen los anticuerpos en el suero dependerá del tipo de la forma infectante (taquizoitos, bradizoitos u oocistos), de la cepa inoculada y de la dosis administrada. Este punto ha podido ser demostrado por nosotros mediante inoculación de taquizoitos de la cepa RH a ratones y comprobar los tiempos en los cuales aparecen anticuerpos en el suero, en ningún caso su aparición fue anterior a los 6 días de la infección.

De las tres cepas de *T. gondii*, dos de ellas presentaron títulos comprendidos entre 1/256 y 1/1024, títulos altos que se correspondieron con un comportamiento altamente patógeno en el ratón matándolo entre el 11 y 14 día de la infección, sin producir quistes tisulares.

Taquizoitos fueron aislados de bazo, lugar por el que presentan una gran predilección en estadios agudos de la infección.

El comportamiento por tanto de las cepas aisladas revela una significada virulencia.

El tercer ratón inoculado con ooquistes no pudo con certeza comprobarse la verdadera identidad ya que murió durante la noche y en la autopsia no pudo evidenciarse ninguna forma parasitaria, tanto en cerebro como en vísceras. Nos inclinamos a pensar que su muerte fue debida al *Toxoplasma*, ya que durante tres días presentó la misma sintomatología que los dos anteriores (lomo arqueado, pelo erizado y temblores) y murió al cabo de 21 días después de la infección.

En todos los casos las dosis inoculadas, vía oral, de ooquistes no sobrepasaron los cuatro parásitos por campo microgópico (objetivo 40x), lo que equivale aproximadamente a - - - 128.000 ooquistes/ml.

9.- Improntas esplénicas teñidas con Giemsa de ratones infectados previamente con oocistos de Toxoplasma gondii.

Hemos visto que de las tres cepas aisladas, dos de ellas presentaron un alto poder patógeno, matando a los ratones entre los 11 y 14 días después de la infección. Estas cepas no formaron quistes típicos cuando se efectuó la biopsia cerebral. Al practicar improntas de bazo sobre un porta, dejándolas secar durante unos minutos y tiñendo a continuación con el colorante de Giemsa, pudimos apreciar taquizoitos en forma de media luna y ovalados, con núcleo central y citoplasma azul pálido.

Estos parásitos aparecieron extracelulares, como puede apreciarse en las microfotografías de la página 151, debido a la ruptura celular producida al efectuar la impronta.

Otro método empleado para la visualización de los parásitos, fue homogeneizar el bazo extraído del ratón en una pequeña cantidad de solución salina y tomar una pequeña gota de este homogeneizado y realizar frotis teñidos finalmente con Giemsa.

La coloración por Giemsa la hemos practicado siguiendo estrictamente los pasos de su autor:

- 1.) Fijación con metanol -durante 5 minutos-.

- 2.) Verter el exceso de alcohol y dejar secar, agitando el preparado al aire.
- 3.) Teñir con el colorante disuelto en agua tamponada (pH: 7,2) a razón de una gota de colorante por ml. de agua tamponada y dejar actuar durante 30 minutos.
- 4.) Lavar con agua del grifo.

El homogeneizado de bazo en solución salina y posterior extensión, nos ha dado mejores resultados por:

- Una mayor cantidad de parásitos visualizados, y
- Por una más clara imagen obtenida de ellos.

El resto de los ratones que no murieron, ni presentaron ningún síntoma al inocularles oquistes de similares medidas a los de *T. gondii*, fueron sacrificados a los 60 días de su infección, incluidos sus cerebros en parafina, para efectuar su posterior biopsia. Asimismo, fueron sangrados para su estudio serológico y en ninguno de ellos pudimos ver quistes en cerebro. La titulación estuvo comprendida entre 1/8 y 1/16.

10.- Microfotografía del material aislado mientras duró el estudio coproparasitológico

Todo el material que íbamos aislando: coquistes, taquizoitos, etc., iba siendo fotografiado y seleccionado; de esta manera hemos podido dejar constancia de todos los pasos seguidos en nuestro estudio.

Todas las microfotografías han sido realizadas sobre microscopio binocular Nikon, con carrete Agfachrome de 50 Asas.

- - - - -

2.) ESTUDIO SEROLOGICO DE UN SUBGRUPO DE LA MUESTRA DE FELIDOS ESTUDIADA COPROLOGICAMENTE

Hemos realizado, conjuntamente al estudio coprológico de los gatos, un estudio serológico paralelo para intentar evidenciar infecciones latentes y ver de esta forma qué porcentaje de gatos han estado infectados en la naturaleza, para después comparar estos análisis indirectos con los resultados de los estudios parasitológicos.

El grupo de gatos estudiado fue de 106 ejemplares pertenecientes a la misma muestra. La sangre fue obtenida en el mismo momento de su sacrificio y fue almacenada en tubos de ensayo. Se dejó durante 24 horas en cámara fría (+4º C.) para el retraimiento del coágulo y posteriormente fue centrifugado a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos.

El suero, de esta manera obtenido, fue almacenado en congelador de -20º C. hasta su procesamiento. En ningún momento el suero permaneció más de tres meses en congelador antes de su estudio.

La reacción utilizada para este estudio ha sido la de aglutinación directa, con antígeno pesado (solución de *Toxoplasmas* obtenidos de exudado peritoneal de ratón infectado previamente). Este antígeno de la Casa Bio-Merieux reúne las características de poner de evidencia antígenos de membrana que son los que juegan un papel fundamental en este tipo de pruebas y los que tienen mayor importancia en las infecciones.

El test de Aglutinación directa ha sido utilizado por reunir las suficientes características de fiabilidad sobre todo en pruebas epidemiológicas. Este test presenta escasas diferencias con la prueba de Inmunofluorescencia indirecta, siendo esta última prueba en la actualidad ampliamente utilizada por



en que intervengan podrá resultar negativa si simultáneamente no hay otras inmunoglobulinas presentes (IgG) o bajará sensiblemente el título si es que existen. La diferencia entre uno y otro título (suero sin tratar y suero tratado) comprende a las IgM eliminadas.

Como es natural, la reacción que mejor se presta para realizar esta experiencia es la de aglutinación directa, ya que entre toda la gama de reacciones en uso para el diagnóstico de la Toxoplasmosis es la que mejor capta la presencia de IgM, que influyen en la reacción de modo preferente.

De las dos series realizadas de los sueros a estudio, una de ellas llevará el suero con 2-Mercaptoetanol (suero tratado) y otra serie sin tratar (suero + P.B.S.). Este tratamiento consiste en mezclar a partes iguales los sueros no inactivados con una solución 0,2 M. de 2-Mercaptoetanol (14 mls. del producto diluidos en c.s.p. un litro de tampón PBS pH 7,2). El reactivo así preparado se conserva un mes a 4°C. en frasco opaco.

Después de incubación en baño a 37°C. durante una hora, se encuentra la mezcla dispuesta para proceder a realizar las diluciones previas a la reacción, teniendo en cuenta que para esta serie, y la no tratada, se parte de una dilución al 1/2.

Haciendo uso de la aglutinación directa, ofrece Peloux (1973) un esquema de interpretación que hemos seguido en todos

los sueros estudiados. (Cit. por Aparicio -1978-).

Hemos hecho una división, dividiendo a los títulos en tres categorías fundamentales, según Coméneau (1975): (Cit. por Aparicio -1978-):

Títulos altos: comprendidos entre 1/265 y superiores

Títulos medios: comprendidos entre 1/64 y 1/128

Títulos bajos: A partir de 1/32 y diluciones inferiores

Según el esquema de interpretación de Peloux (1973), hemos seguido a lo largo de nuestro estudio los siguientes puntos:

- 1.) Títulos altos, lábil, al tratamiento químico con 2-Mercaptoetanol, corresponden a infecciones recientes en las que actuarían preferentemente las IgM.
- 2.) Títulos medios, lábil al 2-Mercaptoetanol se corresponden también a infecciones recientes en las que actuarían las IgM de preferencia.
- 3.) Títulos altos, estables al tratamiento químico con 2-Mercaptoetanol, se corresponden con infecciones recientes pero sin IgM presentes.
- 4.) Títulos medios, estables al tratamiento con 2-Mercaptoetanol corresponderían a infecciones antiguas, actuando con prefe-

rencia las IgM.

5.) Títulos débiles, estables al tratamiento químico corresponderían a anticuerpos residuales.

6.) Títulos débiles, lábiles al tratamiento químico corresponden a reacciones inespecíficas, esto se correspondería por tanto a anticuerpos naturales o a infecciones muy recientes.

El esquema de protocolo seguido en el estudio de la muestra es el que figura en la página 91 .

Como control negativo, hemos empleado 25 microlitros de suero + seroalbumina bovina diluida en PBS y como positivo hemos empleado sueros obtenidos de ratones infectados nueve días antes con taquizoitos de *T. gondii* y que fueron tratados con sulfadiazina sódica a partir del primer día de la infección (150 mg/100 ml. agua) para evitar su muerte antes de que se produjera reacción humoral. Estos ratones presentaban previamente una titulación de 1/2048, que fue controlada previamente (estado agudo de infección).

En todas las series hemos empleado en vez de solución salina, una solución Buffer de PBS pH = 7 y 0,1 Molar con la que hemos preparado una dilución de seroalbumina bovina al 0,5%. Mediante esta variante el método original con solución salina logramos vencer las pequeñas dificultades que a veces se presen-

taban en la lectura, ya que esta solución Buffer de seroalbumina permite una mejor aglutinación.

La lectura final de los sueros se ha realizado sobre fondo negro en espejo, con iluminación oblicua.

En la muestra de los félidos salvajes del Zoológico nos fue imposible realizar su serología, aunque en el cuadro de la página 122 queda reflejada la serología de animales de características similares a nuestra muestra.

3.) SEROLOGIA DEL PERSONAL QUE TRABAJA CON FELIDOS DE ESTA FACULTAD.

La técnica aplicada para la aglutinación directa en este estudio ha sido similar a la ya explicada en apartados anteriores. (páginas 91 ).

Vamos, a continuación, a explicar la técnica empleada para la inmunofluorescencia indirecta así como la metodología seguida:

(a.) Fundamentos y mecanismos: Este test reúne los requisitos fundamentales de: sensibilidad - especificidad y reproductibilidad. Es una prueba en la que cual "llega a verse" el complejo antígeno-anticuerpo, sin necesidad de echar manor de ningún fenómeno colateral o accesorio. (Aparicio, 1978).

El más lejano antecedente del fundamento de esta técnica hay que buscarlo en una observación de MARRACK que data del año 1934. Este investigador demostró que ciertas sustancias colorantes pueden unirse a los anticuerpos sin provocar modificaciones en sus características. Pensaron COONS y Colaboradores (1941) que podría ocurrir el mismo fenómeno usando los llamados fluorocromos, descubiertos en 1933 por Haitinger y Hamperl, ya que, en definitiva y aparte otras propiedades, también son colorantes. La idea fue llevada a la práctica un

año más tarde (COONS y Col., 1942) dando como frutos la realidad de conseguir que los anticuerpos adquirieran la propiedad de la fluorescencia y pudieran ser "vistos" en su soporte antigénico en microscopio adecuado a las circunstancias: excitación por un haz de luz de baja longitud de onda, porque los fluorocromos sustancias primarias e intensamente fluorescentes, poseen la propiedad no sólo de poder unirse a los anticuerpos en una - - reacción intermolecular, sino la de transmitir a ellos su fluorescencia. Para ello hubo que tratar con un fluorocromo los sueros inmunes, cuyos anticuerpos quedaban marcados, al reaccionar con su antígeno específico, que en este caso necesariamente ha de ser un antígeno forme, tal como un protozoo, una bacteria, una célula, se transmitiría la fluorescencia a todo el complejo antígeno-anticuerpo, quedando perfectamente visible en campo microscópico adecuado.

Pero esta técnica de Inmunofluorescencia directa, presenta sus problemas que arrancan de la complejidad del proceso, ya que con antelación habría de marcarse uno por uno todos los sueros problemas.

No es, por tanto, hasta el año 1954, en que COONS y WELLER descubren el método de la inmunofluorescencia indirecta.

Cuando a un animal se le inyecta una gammaglobulina heteróloga reacciona con la formación de una antigammaglobulina es-

pecífica. Es una reacción de inmunidad. Inyectando cabras o conejos, animales de gran capacidad inmunizante, aunque pueden usarse otros, con gammaglobulinas humanas, se logra en el suero la presencia de una antigammaglobulina antihombre. Del mismo modo se pueden obtener antigammaglobulinas de cualquier especie animal. Estas antigammaglobulinas (los sueros que las contienen) son las que se conjugan con el fluorocromo. La reacción, según esta técnica, ha de desarrollarse en dos fases:

En la primera, se coloca frente al antígeno el suero problema sin previa manipulación; en la segunda, se hace actuar la antigammaglobulina conjugada. Si en la primera fase se constituyó el complejo antígeno-anticuerpo; en la segunda, la antigammaglobulina fluorescente reaccionará con el anticuerpo presente, y transmitirá la fluorescencia a todo el complejo. Si, por el contrario, no encuentra soporte en que fijarse por ausencia de anticuerpos, se perderá sin lograr transmitir la fluorescencia al antígeno, que queda intacto.

(b.) Técnica: El antígeno para la prueba de inmunofluorescencia indirecta puede ser preparado directamente de la ascitis de un ratón infectado previamente con una cepa virulenta de *T. gondii*, nosotros hemos empleado antígeno comercial liofilizado. Este antígeno una vez resuspendido, en solución salina fisiológica, se fija sobre un portaobjetos. Posteriormente, se depositan en cámara de 37° C. para la desecación total

No es imprescindible fijarlos en ese momento, aunque pueden fijarse sumergidos durante 10 minutos en acetona y luego se dejan secar. A continuación colocamos los portas en cajas de plástico, evitando su hidratación y, seguidamente, son almacenados en congelador a  $-20^{\circ}$  a  $-30^{\circ}$  C., con lo que su conservación es mayor si no se van a utilizar inmediatamente.

Al realizar la prueba, se extraen los portaobjetos necesarios del congelador y después de mantenerlos unos minutos a temperatura ambiente, pueden ya utilizarse.

Los sueros problemas utilizados fueron obtenidos mediante punción venosa (vena radial) y previa centrifugación, almacenados en congelador antes de su manipulación.

Antes de proceder con los sueros, estos deben ser calentados en baño a  $56^{\circ}$  C. durante veinte minutos para privarlos de su complemento. La antigammaglobulina conjugada se obtiene comercialmente, que viene liofilizada y que una vez rehidratada puede conservarse mucho tiempo a  $-30^{\circ}$  C., pero no conviene congelar y descongelar el mismo vial varias veces, deberá distribuirse su contenido en diferentes viales para su uso. Las descongelaciones deberán ser lentas, a temperatura ambiente. A continuación hay que proceder a la titulación de la antigammaglobulina conjugada.

Conocidos ya los elementos que intervienen, veamos el modo de proceder, esto es, la metódica de la reacción:

Extraídos los portaobjetos necesarios del congelador, se dejan durante unos minutos a temperatura ambiente y posición inclinada para su descongelación. Si no se habían fijado previamente, hágase ahora.

Se preparan diluciones del suero problema en la solución tamponada. Para la titulación partimos del título 1/50, títulos inferiores no los valoramos. Se suelen emplear en principio tres diluciones: una débil (1/50 ó 1/100), otra media (1/500) y otra elevada (1/4000) con lo que hacemos un escrutinio. En una segunda sesión desechamos los negativos y matizamos en diluciones intermedias hasta fijar el título definitivo.

Una gota de cada una de las diluciones se deposita sobre la gota desecada de antígeno. Con varilla de plástico, sin tocar el fondo, puede extenderse lo necesario para que el contacto con la superficie de la gota antigénica sea total.

Los portas se llevan a la estufa a 37° C. durante treinta minutos en atmósfera húmeda, esto se consigue introduciendo los portas en placas petri con papel de filtro humedecido (cámara húmeda). Durante este tiempo tiene lugar la reacción propiamente dicha, fijándose los anticuerpos, si es que existen, sobre los toxoplasmas. Ahora hay que revelar el fenómeno.

Terminada la incubación se vierte el exceso de suero diluido y se sumergen los portas en solución tamponada a pH 7,2 durante

10 minutos. Este lavado debe hacerse con los portas en posición vertical. Se extraen y se dejan secar al aire. Inmediatamente, colocados de nuevo en la cámara húmeda, se agrega a cada gota, que debe estar constituida por el complejo antígeno-anticuerpo, en su caso, por el antígeno sólo, otra gota de la antigammaglobulina conjugada convenientemente diluida según su título. Nueva incubación similar a la anterior, durante la cual la antigammaglobulina debe fijarse sobre el anticuerpo, si es que existe.

A los treinta minutos, se vierte el exceso de conjugado y se hace otra loción en la solución tamponada como en el caso anterior.

Secados los portas al aire, se procede a la contracoloración. Para ello se sumergen en una solución de Azul de Evans al 1/10.000 (siempre en la solución tamponada). A los diez minutos se lavan los portas como las dos veces anteriores, se dejan secar de nuevo y se montan con cubreobjetos, la lectura debe hacerse inmediatamente, para no perder fluorescencia.

(c.) V a l o r a c i ó n . - En caso de positividad los toxoplasmas presentan una fluorescencia amarillo-verdosa localizada en la periferia (pared). El centro del parásito aparece en tono rojizo por la acción del contracolorante. En sueros muy positivos o en diluciones muy débiles, apenas puede descubrirse la coloración interna, ahogada por la intensa fluorescencia perifé

rica; en cambio, destaca bien y el borde fluorescente es fino cuando se llega al límite de la dilución. En caso de negatividad no debe verse fluorescencia periférica, apareciendo todo el antígeno teñido de rojo. No deben considerarse como positivas las preparaciones en que los toxoplasmas presenten una fluorescencia polar, que es inespecífica y se presenta algunas veces en sueros negativos.

Podemos, por tanto, hacer tres categorías con respecto a la titulación:

- Títulos débiles: 1/50 - 1/400 procesos latentes
  - Títulos medios: 1/500 - 1/2000 actividad mínima con o sin ciclos clínicos.
  - Títulos elevados: Por encima de 1/2000, se corresponderían con infecciones recientes.
- - - - -

METODO DE CONCENTRACION Y ESPORULACION COCCIDIANA

- 1.) Emulsionar una parte de heces en 10 volúmenes de agua.
- 2.) Filtrar la suspensión en malla metálica galvanizada.
- 3.) Verter el filtrado en tubos de centrifuga hasta 2 cm. del borde.
- 4.) Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 5.) Lavar el sedimento dos o tres veces en agua del grifo mediante centrifugación.
- 6.) Homogeneizar el sedimento en solución salina saturada y centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 7.) Verter el sobrenadante en probeta graduada y añadir diez veces su volumen de agua del grifo.
- 8.) Dejar reposar durante la noche para la sedimentación coquistica.
- 9.) Verter la mayoría del sobrenadante con cuidado de no agitar el sedimento.
- 10.) Resuspender el sedimento y poner en tubos de centrifuga
- 11.) Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.

12.) Resuspender el sedimento en un pequeño volumen de  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$   
al 2% .

13.) Verter en frasco cónico o placa Petri y Dejar a temperatu  
ra de la habitación durante tres días para permitir la  
esporulación.

- - - - -

METODO DE CONCENTRACION COCCIDIANA EN UNA SOLUCION DE SUCROSA

- 1.) Tomar una muestra de heces y reblandecerlas en un recipiente con agua del grife.
- 2.) Tirar el exceso de agua y emulsionar las heces antes de añadir la solución de sucrosa.
- 3.) Añadir lentamente de 5 a 10 volúmenes de una solución de sucrosa 1,15 de gravedad específica (azúcar 53 gr., agua 100 ml fenol líquido 0,8 ml.)
- 4.) Filtrar el homogeneizado en malla metálica o en dos capas de gasa y poner en tubos de centrifuga hasta 1 ó 2 centímetros del borde.
- 5.) Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 6.) Colectar 1 ó 2 gotas de la cima del sobrenadante entre porta y cubre.
- 7.) Dejar el preparado reposar de 1 a 5 minutos para la inmovilización de las partículas fecales y examinar con objetivos de 20x-40x.
- 8.) Mezclar 0,5 ml. de sobrenadante en 4,5 ml. de  $SO_4H_2$  al 2% en una botella de 30 ml., ésta se tapa y se mantiene durante 3 a 7 días a la temperatura de la habitación.
- 9.) Agitar a intervalos la botella para permitir la aireación de

los ooquistes.

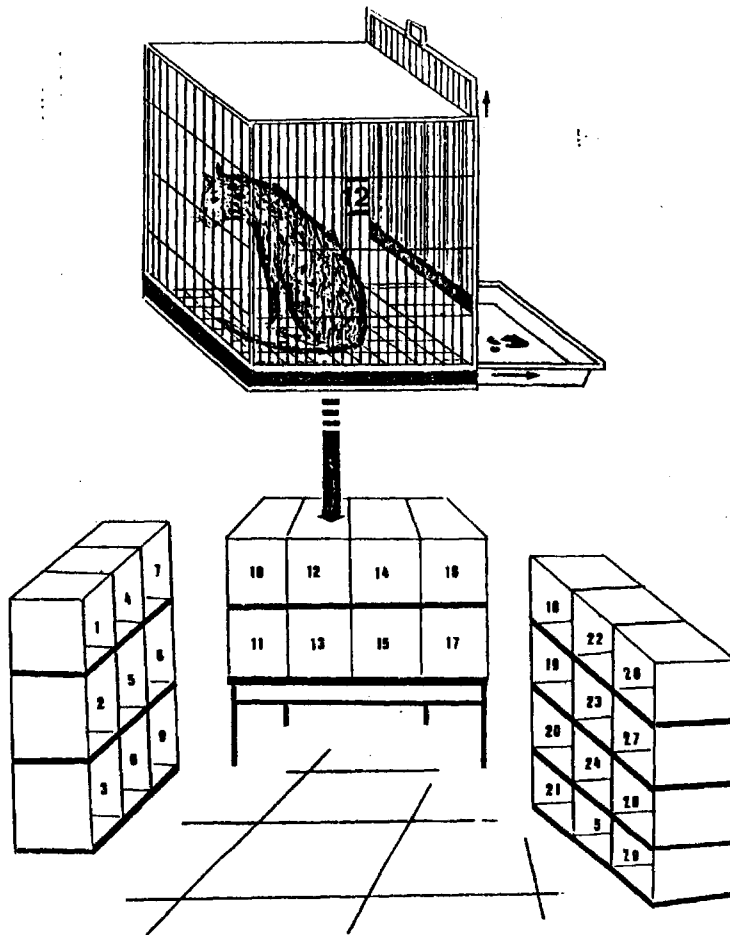
10.) Para inocular al ratón el  $SO_4H_2$  deberá ser extraído mediante dilución en agua y centrifugación, o bien se neutralizará con NaOH al 3,3% conteniendo rojo fenol al 2% como indicador.

La solución de NaOH deberá ser añadida gota a gota hasta que se presente el cambio de color de amarillo a naranja.

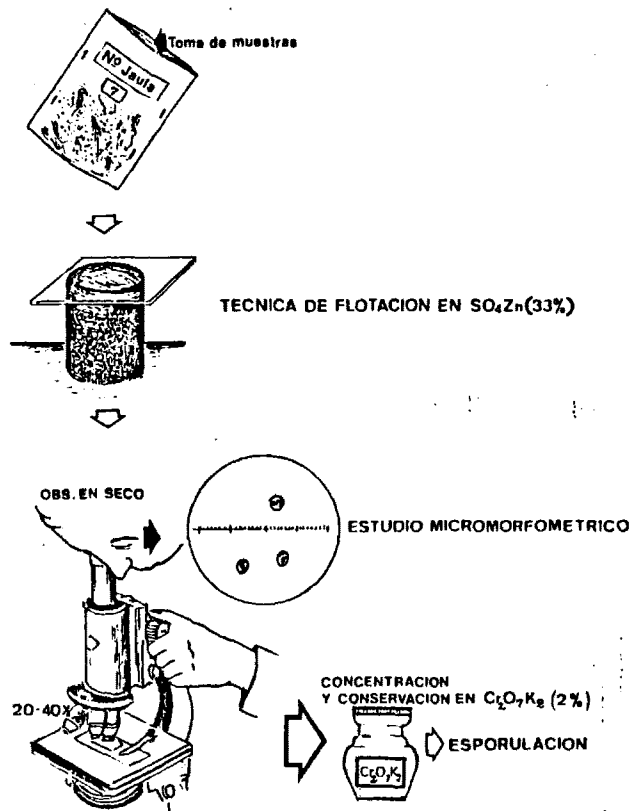
11.) El ratón puede ser inoculado por vía oral o intraperitoneal, pero la primera ruta es más efectiva.

- - - - -

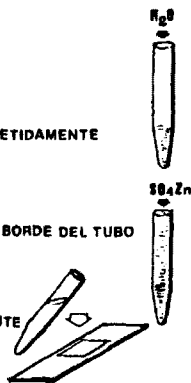
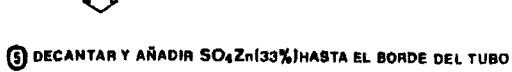
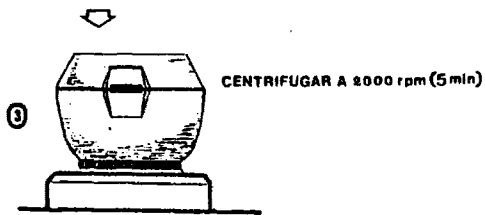
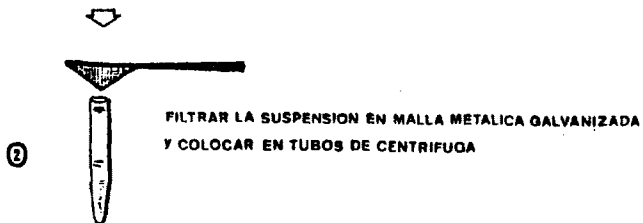
MODELO Y DISPOSICION DE LAS JAULAS EMPLEADAS EN EL TRABAJO



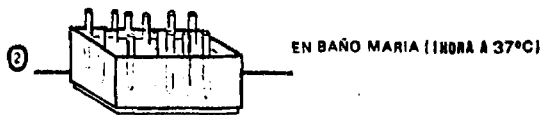
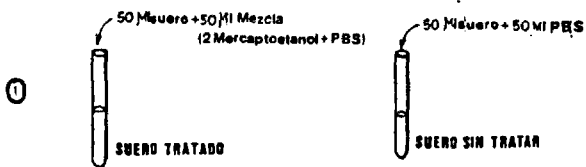
**PROTOCOLO SEGUIDO EN EL ESTUDIO  
COPROLOGICO.**



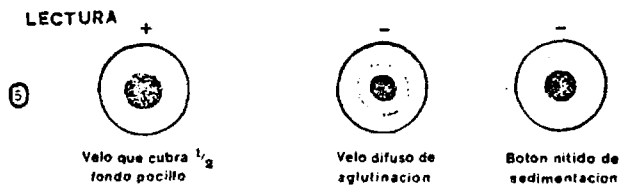
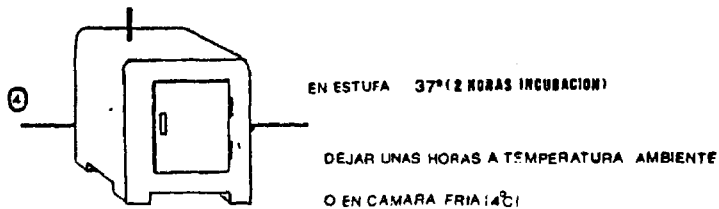
**TECNICA DE CENTRIFUGOFLOTACION(METODO DE FAUST)  
CONCENTRACION COCCIDIANA**



TEST DE AGLUTINACION DIRECTA PARA TOXOPLASMOSIS



N° del POCILLO	Testigo antigen	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Seroalbumina bovina + PBS	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A
③	Suero tratado y no tratado	-	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A
	ANTIGENO	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A	25A
	DILUCION	-	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048



92

RESULTADOS

A.) ESTUDIO COPROPARASITOLÓGICO DE UNA POBLACION DE GATOS (Felis domestica)

De la muestra estudiada, 600 gatos en total, procedentes de los pueblos de los alrededores de Madrid y Provincias limítrofes, cinco presentaron medidas que se corresponden con las del *T. gondii* o *H. hammondi*, mediante biopruebas pudimos constatar que tres gatos presentaban parasitología toxoplásmica, ya que sus oquistes, una vez administrados a ratones, causaron grave sintomatología y se aislaron taquizoitos del bazo de los ratones infectados, como muestra la microfotografía de la página 151.

El porcentaje fue de un 0,5%, dato que está en concordancia con otros estudios realizados, como muestra el cuadro de la página 109.

En este estudio coprológico hemos podido obtener la parasitología más frecuente del gato, tanto coccidiana como helmíntica.

Para Toxocara cati 220 gatos fueron positivos en un porcentaje del 33,6%.

Para Cestodos 15 fueron positivos con un porcentaje del 2,5%. Todas las especies aisladas se correspondieron con *Hidatigera taeniformis*.

Para Strongyloides Sp. 5 fueron positivos con un 0,8% de porcentaje.

Para Trichiuris Serrata 32 fueron positivos con un porcentaje del 5,3%.

Hemos podido ver que el porcentaje mayor, en cuanto a parásitos se refiere, los representan los coccidios.

Cystoisospora felis representó ser positiva en 75 ejemplares de la muestra, lo que representa un 12,5%.

Cystoisospora rivolta: 85 ejemplares fueron positivos con un 14,1%.

Oocystes isosporoides: 32 ejemplares fueron positivos con un 5,3%.

Hammondia hammondi: 2 gatos fueron positivos con un 0,33%.

Eimeria Sp.: 15 ejemplares fueron positivos con un 2,5%.  
Correspondiéndose estos hallazgos con un parasitismo espúreo.

Los otros dos coccidios aislados que poseían medidas similares al *T. gondii* ( $12 \times 10 \mu m$ ) al ser inoculados al ratón, no le causaron sintomatología, ni formaron quistes tisulares en cerebro, dando posteriormente una serología muy baja a *T. gondii*, como se corresponde en este tipo de animales que, presentando reacción cruzada con *T. gondii*, su título suele ser muy bajo (Dubey, 1977). Títulos comprendidos entre 1/8 y 1/16 a los 60 días posteriores a la infección.

Al incrementar nuestro estudio coprológico en un subgrupo de 100 gatos de la población estudiada durante siete días consecutivos, no obtuvimos mayores porcentajes de los reflejados con una sólo visualización diaria.

#### B.) COPROPASITOLOGIA EN UNA POBLACION DE FELIDOS SALVAJES

De las 11 especies de félidos encontradas en el Zoológico de Madrid, en los estudios coprológicos realizados resultaron ser negativas desde el punto de vista coccidiano, ningún félido presentó coccidias en sus heces. La gran mayoría de ellos resultaron ser positivos para *Ascaris* (*Toxascaris leonina*), visualizándose en sus heces huevos y larvas.

Un número pequeño resultó ser positivo a *Toxocara cati* (*Panthera leo* y *Lynx lynx*), así como para *Strongyloides* Sp. en el caso de *Panthera leo*. Todos estos datos quedan reflejados en los cuadros que figuran en las páginas 120-121.

C.) ESTUDIO MICROMORFOMETRICO COCCIDIANO

En el estudio morfológico coccidiano llevado a cabo durante el tiempo en que duró nuestro trabajo, hemos podido diferenciar los distintos cóccidios que habitualmente posee el gato en su intestino y establecer de una manera clara sus medidas, referidas tanto a los ooquistes como a los esporoquistes, así como dar unas diferencias morfológicas externas, referidas a forma ooquistica, membrana del ooquiste, forma de los esporoquistes, etc.

Todas estas medidas y formas fueron comparadas con los huevos de *Toxocara cati*, presentes habitualmente en las deyecciones del gato.

Así podemos resumir que las dimensiones medias de los coccidios existentes en el gato son:

	<u>Ooquiste (<math>\mu</math>m)</u>	<u>Esporoquiste (<math>\mu</math>m)</u>
1.) <i>Cystoisospora felis</i>	38,4 x 32	23 x 19
2.) <i>Cystoisospora rivolta</i>	25,5 x 13	16 x 12
3.) <i>Ooquistes isosporoides</i>	24 $\phi$	11 x 10
4.) <i>Hammondia hammondi</i>	13 x 11	7 x 6
5.) <i>Toxoplasma gondii</i>	13 x 12	7 x 4,5
6.) <i>Eimeria Sp.</i>	17,5 x 13,4	6 x 4

Las medidas de *Toxocara cati* fueron de 76 x 64  $\mu$ m.

El resto de las características morfológicas están expresadas en el cuadro que figura en la página 110

Las microfotografías correspondientes a cada uno de los coccidios presentes en este estudio, vienen reflejadas en las páginas 146 a 150, ambas inclusive.

D.) ESTUDIO SEROLOGICO EN UN SUBGRUPO DE LA POBLACION DE GATOS ESTUDIADA.

De la muestra estudiada coprológicamente, tomamos al azar un subgrupo para la realización de su estudio serológico. Este subgrupo comprendió a 106 gatos, los cuales fueron protocolizados serológicamente mediante el test de Aglutinación directa.

Hemos dividido en tres grupos los resultados obtenidos, dependiendo del título observado:

- Títulos débiles: Comprendidos entre las diluciones 1/4 a 1/32.
- Títulos medios: Comprendidos entre las diluciones 1/64 - 1/128.
- Títulos altos: A partir de la dilución serica 1/256.

De los gatos estudiados, por tanto, serológicamente, 39 fueron positivos a *Toxoplasma gondii*, lo que representa un

porcentaje del 36,7%, cifra que se ajusta a las endemias mundiales en población de gatos.

Pero hay que aclarar que este porcentaje es global, considerando todos los títulos de los tres grupos antes mencionados.

Como nosotros no hemos considerado significativos a aquellos títulos por debajo de 1/32 como quedó expresado en el apartado de METODOS, el porcentaje baja algo con respecto al global, quedando finalmente en una positividad de 27 con un porcentaje del 25,4%, dato que se acerca con mucho a la endemia humana española estudiada serológicamente comprendida entre un 30-40%. Hay que tener en cuenta que nuestro país está encuadrado dentro de los países de endemicidad media, como queda reflejado en el cuadro de la página 38.

Por tanto, considerando por separado los tres grupos serológicos, las positividades y porcentajes son los siguientes:

- Con título débil resultaron ser positivos 12, lo que representa un 11,3%.
- Con título medio 14 fueron positivos, lo que representa un porcentaje del 13,2%

- Finalmente, con título alto 13 resultaron positivos, correspondiéndose a un 12,2%.

La muestra de gatos estudiada comprendió edades entre los 6 meses y 7 años.

Todos estos datos quedan reflejados en el cuadro que figura en la página 50.

El número de gatos que pudieran haber representado un mayor índice de riesgo son los 13 correspondientes a títulos altos, ya que estos se corresponderían bien con infecciones recientes, con lo cual el número de ooquistes expulsados sería mayor en el caso de considerar a todos estos gatos infectados con cepas ooquisticas y no quistógenas. Pero también pudiera corresponderse con recrudescimientos de una fase de latencia, dando origen a una fase aguda de la infección, con lo que el número de ooquistes expulsados sería nulo.

Los gatos de título medio, 14 en nuestro estudio, no representarían un papel tan importante epidemiológicamente hablando, pues esto se correspondería con infecciones antiguas, con lo que la emisión de ooquistes en sus heces sería de una manera esporádica.

**E.) INTERRELACION ENTRE LOS DATOS COPROLOGICOS Y SEROLOGICOS  
DE LA MUESTRA DE GATOS ESTUDIADA**

Ségún puede verse, si comparamos los datos obtenidos mediante estudios coprológicos y serológicos, vemos el gran desfase existente entre los valores serológicos de aquellos obtenidos mediante coprología.

Hay que tener en cuenta, que la evidencia real de la importancia que el gato pudiera o no tener en cuanto a la epidemiología de la Toxoplasmosis, está en relación directa con su capacidad de expulsar ooquistes.

Si consideramos que no todas las cepas existentes de *Toxoplasma* tienen capacidad de inducir ooquistes en el gato cuando éste ha ingerido quistes tisulares de animales infectados, podremos comprender fácilmente este desfase entre ambos valores.

Por tanto un gato puede dar positivo a la Toxoplasmosis y no haber expulsado ooquistes o haberlos expulsado durante un período corto de su vida.

No es, por tanto, de extrañar, la gran diferencia existente entre los valores coproparasitológicos y serológicos.

Hay que considerar que el gato es un animal que se inmuniza mal, el simple hecho de haber pasado la infección no le protege de infecciones posteriores, por todo esto vemos que, en la mayoría de estudios realizados en todo el mundo sobre la Inmunología de Gatos, los valores son elevados, si los comparamos con los estudios ceprológicos realizados paralelamente.

- - - - -

F.) ESTUDIO SEROLOGICO DEL PERSONAL QUE TRABAJA CON FELIDOS DE  
ESTA FACULTAD.

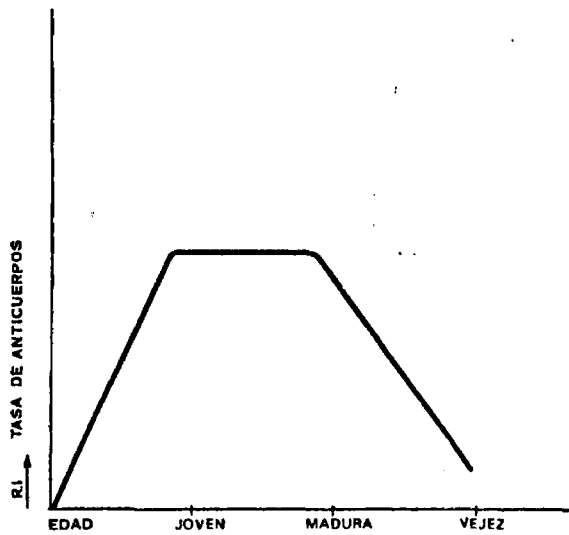
De los 25 sueros estudiados pertenecientes al personal que durante un tiempo estuvo en contacto con gatos, tiempo que osciló, como hemos visto, entre 1 y 5 años, sólo 5 de ellos resultaron positivos (20%), tanto a la prueba de Aglutinación directa como a la Inmunofluorescencia indirecta, el resto resultó negativo para ambas pruebas.

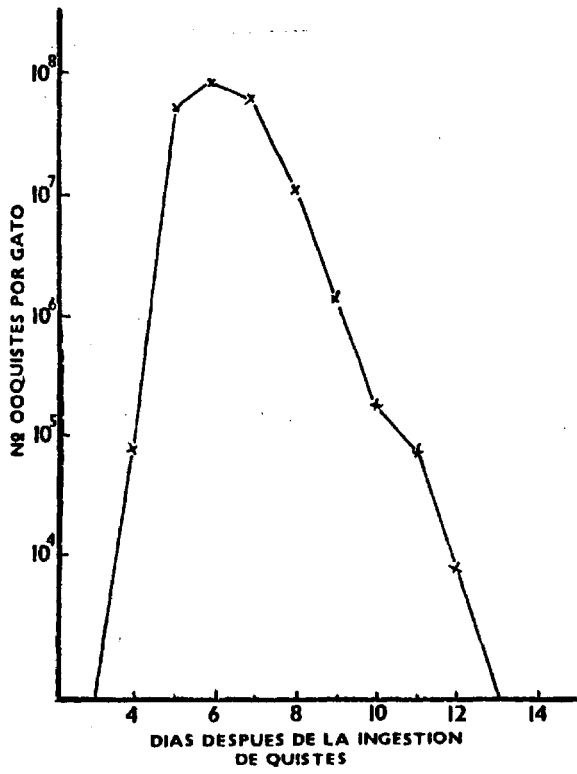
Los títulos obtenidos fueron parecidos en ambos test, lo que demuestra la inter-relación de dichas pruebas serológicas; en ningún caso se obtuvieron títulos elevados que se hubieran correspondido con infecciones recientes, los títulos oscilaron para la prueba de Aglutinación directa entre 1/32 y 1/64, títulos débiles (1/32) y comienzo de moderados (1/64), para la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. Se obtuvieron títulos comprendidos entre 1/50 y 1/200, títulos que se corresponden con valores débiles.

Esto nos hace pensar que los títulos obtenidos se refieren a infecciones lejanas, que cursaron en todos los casos de manera totalmente asintomática, como pudimos observar por el historial de estas personas.

Los valores de ambas pruebas están representados en los cuadros de las páginas 123 y 124.

**RESPUESTA INMUNE (R.I.) a T. Gondii  
EN LAS DIFERENTES EDADES DE LA VIDA**





## Serología mundial en gatos.

AÑOS	PAISES	POSITIVOS %
1953-59	U.S.A	33-57
1957-69	Inglaterra	13-14
1957	Holanda	27-46
1959	Australia	0,0*
1959-60	Checoslovaquia	76-82
1966	Mejico	52.2
1967-69	Italia	27-58
1967-72	Japon	44-60
1967	Malasia	21
1971-73	Hawai	14-20
1972	Nam luc(PACIFICO)	86
1972	España	54
1972	Brasil	51
1973	Colombia	62
1974	Rhodesia	11
1976	Indonesia	41
1976	Egipto	40
1982	ESPAÑA*	25,4

\* Estudio sobre 29 animales

\* Nosotros

PARASITOLOGIA DEL GATO  
(Quistes tisulares)

Años	Autores	Países	Positivos%
1957	JONES & Colab.	USA	21.7
1959	COOK & POPE	Australia	3.0
1959	EYLES & Colab.	U.S.A	26.3
1959	HAVLIK & HUBNER	Checoslovaquia	8.7
1963	GROULADE	Francia	84.5
1967	KATSUBE & Colab.	Japon	68.0
1972	WARNER & WALTON	Japon	11.8
1972	SAN MARTIN & AYALA	Colombia	0.8

PARASITOLOGIA DEL GATO: SEROLOGIA

Gatos examinados	POSITIVOS	TITULO DEBIL $\frac{1}{4} - \frac{1}{32}$ +	TITULO MEDIO $\frac{1}{64} - \frac{1}{128}$ +	TITULO ALTO $\frac{1}{256} - \frac{1}{4096}$ +	EIDADES
	%	%	%	%	
106.	27 25,4	12 11,3	14 13,2	13 12,2	6 MESES A 7 AÑOS

**PARASITOLOGIA del GATO**  
ESTUDIO COPROLOGICO

600		Gatos examinados
%	+	
33,6	220	TOXOCARA CATI
12,5	75	CYSTOISOSPORA FELIS
14,1	85	CYSTOISOSPORA RIVOLTA
5,3	32	OOQUISTES ISOSPOROIDES
0,33	2	HAMMONDIA HAMMONDI
2,5	15	EIMERIA SP.*
0,5	3	TOXOPLASMA GONDII
2,5	15	HIDATIGERA TAENIFORMIS
0,8	5	STRONGYLOIDES SP
5,3	32	TRICHIURIS SERRATA

(\*) Paratitismo espureo

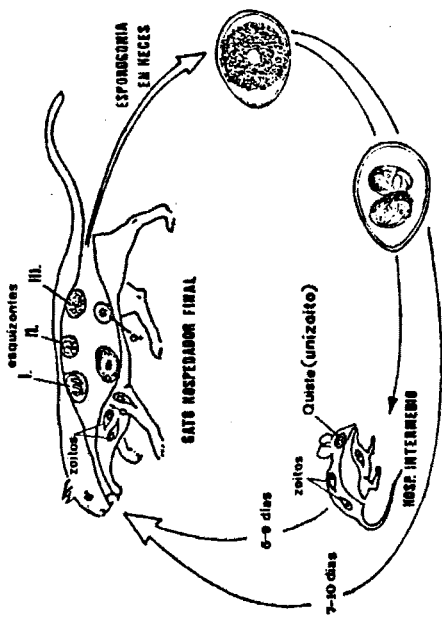
PARASITOLOGIA DEL GATO (OOQUISTES)

AÑO	AUTORES	PAISES	Nº Animales	POSITIVOS	PORCENTAJE
1971	WALLACE	Hawai	1023	6	0,58
1972	WERNET y WALTON	Japon	90	1	1,11
1972	APARICIO-GARRIDO y col	España	169	1	0,59
1973	NERY-GUIMERAS y LAGE	Brasil	185	1	0,54
1977	DUBEY y col	U.S.A	1000	7	0,70
1982	NOSOTROS	España	600	3	0,50

MEDIDAS COMPARATIVAS DE LAS DIFERENTES COCCIDIAS  
DEL GATO(en  $\mu$ m)

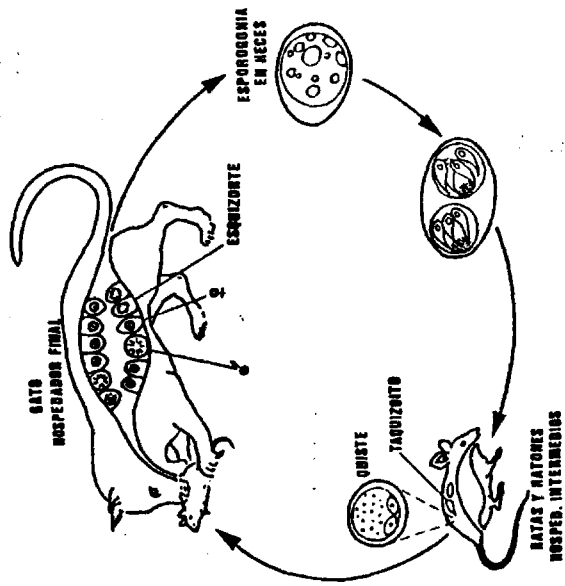
	C. FELIS	C. RIVOLTA	Oocistes Isosporidae	N. HAMMOND	T. BONDI	EIMERIA sp.	TOXOCARA CATI
OOQUISTE	ovoide 38,4x32 pared gruesa no micropilo	ovoide 25,5x13 pared gruesa no micropilo	esferica 24 $\mu$ ovoide pared gruesa no micropilo.	esferica 13 x 11 ovoide pared fina	esferica 13x12 ovoide pared fina	ovoide 17,5 x 13,4 no micropilo	76 x 84
ESPOROQUISTE	23x19 Residuo presente	16 x 12 Residuo presente	11 x 10 Residuo presente	7x8 Residuo a veces presente	7 x 4,5 Residuo a veces presente	6x4 Residuo presente	

(\*) Parasitismo esporico

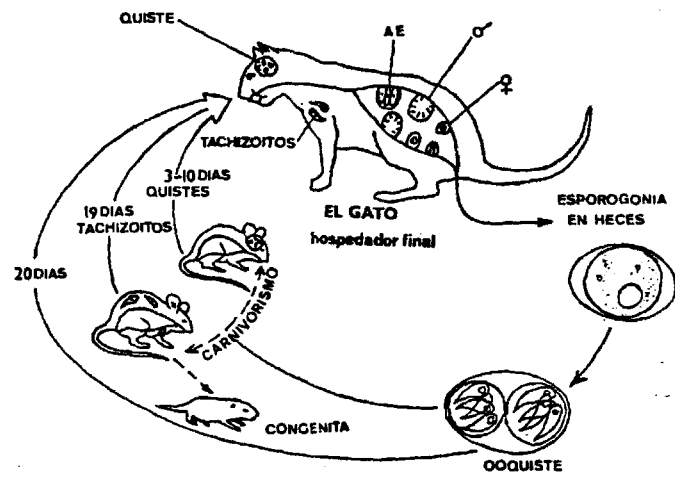


Ciclo vital de la *Cystoisospora felis*

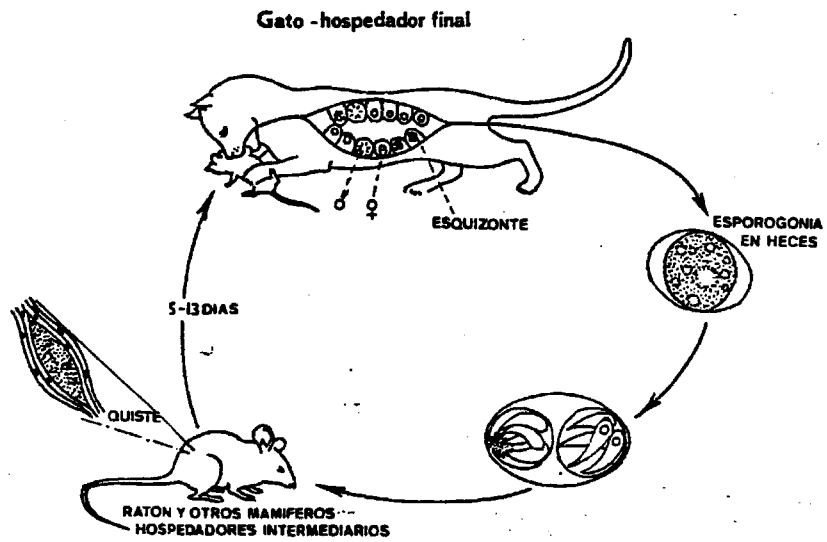




Ciclo de *Besnoitia wallacei*: Quistes en tejidos conectivos de hosped. intermedios



**Ciclo biologico de la *Toxoplasma gondii***  
 Periodos prepatentes que varian con el estado de *T. gondii* ingerido



**Ciclo de Hammondia hammondi (2 hospedadores obligatorios)**  
 no invade organos extraintestinales del gato  
 sin infeccion congenita en ningun hospedador

**DIFERENTES ESPECIES DE COCCIDIAS  
EN GATOS**

ESPECIES	DIMENSIONES (µ)		HUESPED intermediario natural	Modo de Transmision en Gatos
	OOQUISTES	ESPOROQUIST.		
<i>Cystoisospora felis</i> (HEMUD 1922)	40 × 30 38-31-27-30		Desconocido	Fecal
<i>Cystoisospora rivolta</i> (GRASSI 1973)	25 × 20 21-23-18-23		Desconocido	Fecal
<i>Besnoitia besnoiti</i> MARTTEL 1912	15 × 13 14-10-12-14		BOVINOS	Carnivorismo
<i>Besnoitia wallacei</i> TABORS-LARHAN 1973	17 × 12 18-18-10-13		RATÓN	Carnivorismo
<i>Toxoplasma gondii</i> NICOLLE-BANGE/JOUKI/BOU	12 × 10 11-13-9-11		MAMIFEROS AVES	Carnivorismo Fecal
<i>Hammondia hammondi</i> FRENKEL-BOBEY (1975)	12 × 11 11-13-10-12		Desconocido	Carnivorismo
<i>Sarcocystis hirsuta</i> (MULLER 1858)		12 × 8 11-14-7-9	BUEY	Carnivorismo
<i>Sarcocystis tenella</i> (RAILLET 1816)		12 × 8 11-14-8-9	OVEJA	Carnivorismo
<i>Sarcocystis porcifelis</i> (BOBEY 1978)		13 × 8 13-14-7-8	CERDO	Carnivorismo
<i>Sarcocystis muris</i> BLANCHARD 1885		10 × 8 9-12-7-9	RATÓN	Carnivorismo
<i>Sarcocystis</i> sp. JANITSCHKE VERNER (1974)		13 × 9 11-15-8-12	GACELA	Carnivorismo
<i>Sarcocystis leporum</i> (CRAWLEY, 1914)		14 × 9 8-11-13-17	CONEJO	Carnivorismo

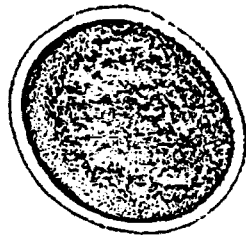
Características de diferentes Coccidias encontradas en felidos

ESPECIE	Huesped intermediario	Localizacion quistes	Tipo de quiste	Nº organismos per quiste	Pared quistica	Esquizogonia en H.definitivo	Gametogonia en H.definitivo	Esperulacion	Ciclo Extraintestinal H.definitivo	Modos de transmision	
										H.definitivo	H.intermed.
Toxoplasma	Amplia distribucion	Muchos organos	No Septado	Numerosos	Fine	Presente	Presente	Suelo	Presente	Carnivorismo Fecal	Carnivorismo Fecal Congenita
Hammondia	Amplia	Musculo	No Septado	Numerosos	Fine	Presente	Presente	Suelo	Ausente	Carnivorismo	Fecal
Cystoisospora	Amplia	Muchos organos	No Septado	Una	Gruesa	Presente	Presente	Suelo	Presente	Carnivorismo Fecal	Fecal
Besnoitia	Amplia	Muchos organos	No Septado	Numerosos	Gruesa	Presente	Presente	Suelo	Ausente	Carnivorismo Congenita dudosa	Carnivorismo Fecal Congenita dudosa
Sarcocystis	Oveja Cerdo Vacuna	Musculo	Septado	Numerosos	Variable	Ausente	Presente	En el hospedador	Ausente	Carnivorismo	Fecal

**COCCIDIAS CUYOS OOQUISTES TIENEN MEDIDAS SIMILARES**

ESPECIE	CATEGORIA	HOSP. INTERMED.		FECHA DE CLASIFICACION	MED. OOQUISTES	LOCALIZACION OOQUISTES	PERIODO PREPATENTE	ESTADOS INFECCIOSOS	
		DEFINITIVO	EXPERIMENTAL					EN HOSP. INTERM.	EN HOSP. INTERM.
HAMMONDIA REYNOLDI	Heteroxeno obligatorio	Gato	Raton Rata Cobaya Hamster Perro	desconocido	1975 (Frenkel, Dubey) 11x13µ 2esporooquistes 4esporoozitos	Musculatura esquelética y cardíaca (300x05µ) Raros en cerebro 20x25µ	5-14 días	quistes tisulares	ooquistes
HAMMONDIA REYNOLDI = COCCIDIUM LEGERIANA (2a especie)	Heteroxeno facultativo?	Perro Gato	Perro?	Bovinos	1976 Tadros y Laarman 10-14x7.5-9µ 2esporooquistes 4esporoozitos	Musculatura bovina	7-15 días	quistes tisulares	ooquistes
SARCOCYSTIS MESCHERIANA	Heteroxeno obligatorio	Carnívoros	Raton	Herbívoros Reptiles Aves Roedores	1888 Lankester 12x13 2esporooq. 4esporooz.	Muchos tejidos de pocas µ a varios cm. alargados	9-10 días	quistes tisulares	esporooquistes
TOKOPLASMA GOWDI	Euriseno Heteroxeno facultativo	Felidos	Raton Conejo	Mamíferos Aves	1909 Nicolle Manceaux 10x9µ	En todo el cuerpo	3-10 días (infect. quistes) 19 días (infect. ooquistes) 20 días (esquistes)	ooquistes quistes pseudooquistes	ooquistes
RESNOLIA RESNOLII	Heteroxeno facultativo	Gato	Raton Hamster	—	(1913) Henry 12x17µ (sin esporooz.)	Intestino delgado	—	quistes tisulares	ooquistes
FRENKELIA BUTEOUS	Heteroxeno	Buteo buteo (Aguija californiana)	Raton	Microtus agrestis M. modestus	(1934) Findlay J. Middleton 12.5x8.8µ esporooquistes	Cerebro	7-57 días	quistes	esporooquistes

**Coccidias frecuentemente encontradas en felinos comparadas  
con un huevo de T.cati**



**TOXOCARA CATI**



**I. felis**



**I. rivolta**



**T.gondii**



**H.hammondi**



**Besnoitia spp.**

TITULOS DE ANTICUERPOS a T.GONDII en relacion con la edad y tipo de gato

EDAD	TIPO	NEGATOS	% seropositivos	TITULO ANTICUERPOS	
				1:2 a 1:32	1:64 y >
4-10 semanas	Domestico	302	8,6	26*	0
11-26 semanas	Domestico	80	16,2	1*	12
6 meses	Domestico	128	37,5	27	21
6 meses	Callejero	157	57,9	42	49

de DUBEY(1973)

(\*) ANTICUERPOS PASIVOS  
desaparecen despues de 12-14 semanas

I.

**ESTUDIO COPROPARASITOLÓGICO REALIZADO EN EL PARQUE ZOOLOGICO DE MADRID  
REFLEJANDO LA PARASITOLOGIA DE LOS SIGUIENTES FELIDOS**

FECHA: 15 NOV. 1978

	<b>FELIDOS</b>	<b>PARASITOLOGIA</b>
1	PANTHERA ONCA (Jaguar) <sup>o</sup>	Larva de Toxascaris leonina 750 $\mu$ longitud
2	PANTHERA LEO (Leon del Atlas)	Toxocara cati (huevos) y Strongyloides sp.
3	PANTHERA LEO (Leon)	Toxascaris leonina (huevos)
4	LYNX LYNX (Lince) <sup>o</sup>	Toxocara cati
5	FELIS TIGRINA (Gato margay)	Negativo
6	ACYNONIX JUBATUS (Guepardo)	Toxascaris leonina (huevos)
7	PANTHERA PARDUS (Leopardo) <sup>o</sup>	Negativo
8	FELIS CONCOLOR (Puma) <sup>o</sup>	Toxascaris leonina (huevos)
9	PANTHERA PARDUS (Pantera negra)	Toxascaris leonina (huevos)
10	PANTHERA TIGRIS (Tigre de Bengala)	Toxascaris leonina (huevos)
11	PANTHERA PARDUS (Pantera china)	Negativo

120

(<sup>o</sup>) Huesped definitivo descrito

2.

**ESTUDIO COPROPARASITOLÓGICO REALIZADO EN EL PARQUE ZOOLOGICO DE MADRID  
REFLEJANDO LA PARASITOLOGIA DE LOS SIGUENTES FELIDOS**

FECHA: 2 FEB. 1979

	<b>FELIDOS</b>	<b>PARASITOLOGIA</b>
1	PANTHERA ONCA (Jaguar)*	Negativo
2	PANTHERA LEO (Leon del Atlas)	Negativo
3	PANTHERA LEO (Leon)	Toxascaris leonina (huevos)
4	LYNX LYNX (Lince)*	Toxascaris leonina y Toxocara cati (huevos)
5	FELIS TIGRINA (Gato margay)	Negativo
6	ACYNONIX JUBATUS (Guepardo)	Toxascaris leonina (huevos)
7	PANTHERA PARDUS (Leopardo)*	Negativo
8	FELIS CONCOLOR (Puma)*	Toxascaris leonina
9	PANTHERA PARDUS (Pantera negra)	Toxascaris leonina
10	PANTHERA TIGRIS (Tigre de Bengala)	Negativo
11	PANTHERA PARDUS (Pantera china)	Negativo

(\*) Huesped definitivo descrito

SEROLOGIA EN ANIMALES DE ZOOLOGICO  
AVES

CICONIFORMES			ANSERIFORMES		
EXAMINADOS	+	%	EXAMINADOS	+	%
85	14	16,5	341	88	25,8
GALLIFORMES			FALIFORMES		
91	17	18,7	79	10	12,6
COLUMBIFORMES			PSITACIFORMES		
63	24	35,3	179	35	19,6
PASERIFORMES			ALIA		
76	12	15,8	306	28	9,2

## MAMIFEROS

MACROPODIDOS			SIMIOS			CARNIVOROS no felidos		
EXAMINADOS	+	%	EXAMINADOS	+	%	EXAMINADOS	+	%
48	5	10,2	87	8	11,9	113	14	12,4
FELIDOS			ROEDORES			PERISODACTILOS		
123	13	10,6	87	13	19,4	61	10	16,4
ARTIODACTILOS			CERVIDOS			CAPRINOS		
247	50	20,7	200	45	22,5	191	43	22,5

RELACION INFECCION-CONVIVENCIA CON GATOS.  
ESTUDIO SEROLOGICO (A.D)

Muestra estudiada	Positivos %	TITULO DEBIL	TITULO MEDIO	TITULO ALTO	Tiempo de trabajo con gatos
		$\frac{1}{4} - \frac{1}{32}$ +	$\frac{1}{64} - \frac{1}{128}$ +	$\frac{1}{256} - \frac{1}{4096}$ +	
25	5* 20	3 12	2 8	0 0	1-5 años

(\*) TITULOS COMPRENDIDOS ENTRE  $\frac{1}{32}$  Y  $\frac{1}{64}$

RELACION INFECCION-CONVIVENCIA CON GATOS.  
ESTUDIO SEROLOGICO (IFA)

Muestra estudiada	Positivos %	TITULO DEBIL	TITULO MEDIO	TITULO ALTO	Tiempo de trabajo con gatos
		1/50 - 1/400	1/500 - 1/2000	> 1/2000	
25	5 20	5* 20	0 0	0 0	1-5 años

(\*) TITULOS COMPRENDIDOS ENTRE 1/50 Y 1/200

125

D I S C U S I O N

A la vista de los resultados obtenidos, podemos sacar algunas conclusiones concernientes al papel que el gato y los félidos en general representan en la epidemiología de la Toxoplasmosis.

Hay que tener en cuenta que de los numerosos mecanismos de transmisión por los cuales la infección puede contraerse, quizás los que representen una mayor importancia epidemiológica sean la ingestión de carne semicruda que lleve en su interior quistes con bradizoitos, o la ingestión de alimentos contaminados con ooquistes expulsados por gatos.

El papel, por tanto, de los ooquistes es fundamental para la transmisión de la Toxoplasmosis, al menos de un punto de vista teórico.

Si la fuente de transmisión ooquiste-hombre podemos considerarla de poca importancia en la epidemiología, ya que exceptuando medios muy concretos, esta transmisión representaría un papel de escasa importancia a la hora de dilucidar un camino de contagio que explicase la amplia distribución que este parásito tiene en la naturaleza.

Pero si bien esta ruta directa: ooquiste-hombre no nos convence como explicación epidemiológica, hay que tener en cuenta que todos los animales herbívoros necesitan del ooquiste expulsado por los félidos para comenzar a contraer la infección

y formar posteriormente quistes en los diferentes tejidos de su cuerpo, estos animales que representan la fuente de infección fundamental de los carnívoros sí podrían explicar en cierta manera el mecanismo de transmisión.

Hemos considerado por tanto que el papel del gato como diseminador de ooquistes tiene una importancia real, ya que se da prácticamente como seguro que ningún otro animal, de los muchos estudiados, expulsa ooquistes en sus deyecciones.

Por todo esto, podemos establecer de una manera clara que el gato y félidos en general juegan el papel de hospedadores específicos y no de definitivos como algunos autores lo hacen figurar dentro del ciclo biológico, ya que dentro de él se cumplen los procesos de división asexual (Esquizogonia, endodiogenia y endopoligenia) y sexual (gametogonia y esporulación). De tal manera que si sólo quedara una familia de animales sobre el Planeta, los félidos, la infección no desaparecería. Es aquí, por tanto, donde radica la importancia epidemiológica del gato.

En cuanto a la vía de transmisión congénita, vía en la que más o menos está establecido el mecanismo real de transmisión, representa un papel escasísimo en toda la epidemiología de la enfermedad, ya que según numerosos autores, entre los que se cuentan J.P. Gauley y G.W. Comstock (1980), sólo uno entre 1.000 nacimientos se malogran debido a la Toxoplasmosis.

Nos quedan, no obstante, los numerosos estudios serológicos que reflejan cómo la convivencia con animales y en particular con félidos, hace aumentar los títulos serológicos medios, así como el régimen de vida de las personas presentan valores significativos de anticuerpos.

Así Rey Calero y cols. (1969) estudiaron primoinfecciones en la Provincia de Cádiz, en las que encontraron un 47,7% de positividades en personas de vida rural, frente a un 26,7% en los que vivían en la costa, creyendo en la existencia de factores ligados a la estrecha relación con animales.

En Islas del Pacífico figuran zonas de intensa contaminación, como la Isla de Pascua, Tahiti, etc., en las que se llega a la totalidad de la población adulta. (Wallace, G.D. -1969-).

Sin embargo, otros autores como Gaulcy y Comstock (1980), señalan que la exposición de personas con animales de granja y personas que viven en casas viejas pueden representar factores importantes a la hora de adquirir títulos positivos al Toxoplasma gondii.

Schnurrenberger et al. (1964) encuentran una significativa asociación mediante la intradermo-reacción de Frenkel (skin-test) entre personas que vivían en estrecho contacto con animales.  
(Cit. por Cordero, 1973).

Hay otro factor importante a considerar, ya que desde que las heces de gato son depositadas habitualmente fuera de las casas, y desde que los ooquistes pueden permanecer viables durante largos períodos de tiempo en el suelo, las características de la población, que comprende costumbres, ocupación y condiciones higiénicas, así como la posesión de gatos, puede representar un alto riesgo en contraer la infección.

Pero también hay que tener en cuenta que los ooquistes son distribuidos por el gato de una manera dispersa en la naturaleza y el hecho de contraer la infección es más una cuestión de edad y no del contacto estrecho con estos animales. Gauley y Comstock (1980).

Hay que señalar también, como lo hacen Faust E.C., Giraldo, L.E., Caicedo, G. et al (1961) (Cit. por Cordero -1973-) que una posibilidad final de consideración es que los títulos obtenidos mediante inmunofluorescencia como positivos, no necesariamente reflejan exposición a *T. gondii*, desde que otras isosporas como *Isospora hominis* e *Isospora belli* presentes en el hombre pudieran dar bajos títulos, reflejando reacciones cruzadas con estos organismos.

Con este último punto no estamos de acuerdo, ya que la distribución de estos coccidios en el hombre es escasísima y los bajos títulos observados se corresponderían más a reacciones inespecíficas que a un verdadero problema de reacciones cruzadas. (Cordero, 1973).

Otro punto interesante en cuanto a la infección del gato, lo representan los numerosos trabajos que reflejan la baja incidencia en determinadas edades y modo de vida. (Dubey, J.P. 1977a.)

Normalmente gatos menores de 6 meses presentan muy baja incidencia, seguramente debido a su régimen de alimentación, ya que estos gatos no presentan un exacerbado hábito por la caza, como ocurre en edades superiores, así como el tipo de gato a estudio (doméstico o rural), presentan destacadas diferencias con respecto a la infección.

Gatos domésticos presentan una más baja incidencia que los rurales, ya que estos últimos tienen un régimen de vida mixto, con un espectro alimenticio más amplio, (DUBEY, J.P. 1977). Todo esto queda reflejado en el cuadro de la página 119.

Pero los parámetros alimentación y contacto con félidos no siempre reflejan alta incidencia en las poblaciones sometidos a éstos, así J.K. Lovelace, M.A.P. Morales y E. Hagerloy (1977), en el que se estudiaron un grupo étnico que por sus características de aislamiento y hábitos alimenticios y la no presencia de félidos, en sus inmediaciones, no era presumible que presentaran infecciones al *T. gondii* o, al menos, reflejaran cifras no significativas.

De 408 habitantes de cinco poblados al Oeste del Brasil (indios Ticuna), presentaron una incidencia a *T. gondii* del 39%. Señalamos que el régimen alimenticio de esta población es fundamentalmente piscívora y frugívora, no conociéndoseles actividades agrícolas ni ganaderas, aunque hay que destacar que la mayoría de ellos no presentaron títulos por encima 1/64 mediante la prueba de Inmunofluorescencia indirecta.

Presentando títulos por encima o iguales a 1/2048 un 10% del porcentaje global.

Por otro lado el estudio paralelo llevado a cabo en animales de zoológico, nos hace pensar que estos animales no se infectan en igual medida que el gato doméstico, seguramente debido al régimen de vida distinto, y aunque las condiciones de stress a que son sometidos estos animales durante su transporte, pudieran haber evidenciado infecciones pasadas, como queda reflejado en algunos casos en la literatura, o el régimen alimenticio a que están sometidos en cautividad (animales de granja, etc.) pudieran aumentar la positividad; no lo reflejan tan evidentemente como el gato. (Ippen, R., Kozojed, V. et al -1981-).

Por todo esto podemos pensar que el félido salvaje no tiene la importancia epidemiológica que tiene el gato, debido seguramente a sus costumbres alimenticias y régimen de vida, ya que el carácter solitario de estos animales, así como el mínimo acercamiento a poblados humanos le hacen de escasa importancia

epidemiológicamente hablando.

Test serológicos son de escasa significación en gatos, ya que éstos pueden estar en la etapa activa de expulsión ooquistica, dando resultados negativos en cuanto a serología. Los anticuerpos aparecen lentamente y a bajos títulos, en comparación con otros animales y el hombre (J.K. Frenkel, 1978).

Los gatos no adquieren generalmente anticuerpos a *T. gondii* hasta que adquieren sus hábitos cazadores, aproximadamente a los seis meses.

En cuanto a la incidencia de la infección en animales de Zoológico, vemos según indica el cuadro de la página 122 que es muy variada según el grupo de animales estudiado. (Ippen, R., Kozojed, V. et al -1981-).

Así la incidencia más alta la presenta el grupo de las Columbiformes con un 35,3% de positividad, seguido de las Anseriformes con un 25,8%, a continuación vendrían los grupos de Cérvidos y Caprinidos con un 22,5%, siendo los Carnívoros y Omnívoros los que en suma presentan los valores más bajos.

Otro punto de particular interés lo representan la convivencia o el estrecho contacto con gatos en cuanto a la incidencia de la infección, como hemos apuntado en apartados anteriores

pero ciertos trabajos confirman lo contrario. (J.P. Gauley, 1980) que considera no concluyente la correlación entre personas seropositivas y su contacto con gatos.

Fisher y Reid (1973) tampoco han encontrado asociación entre seropositivos y posesión de gatos; datos que están en concordancia con nuestro estudio, de 25 personas estudiadas por nosotros que durante un período de tiempo que osciló entre 1 y 5 años han trabajado con gatos sólo el 20% dieron positividads siendo en todos los casos a título débil. (Cit. por Cordero, 1973).

Según J.P. Gauley (1980) estos datos conflictivos en cuanto a la epidemiología sugieren que, si el gato es el hospedador específico (definitivo) del *Toxoplasma gondii* debe haber otros factores que influyan fuertemente en la transmisión de la enfermedad a los humanos.

En cuanto a la posición taxonómica del *Toxoplasma* hay que hacer algunas consideraciones:

El microgametocito de *T. gondii* produce escaso número de microgametos (no superior a 25), esto contrasta con los microgametos producidos por el género *Isospora felis* de número más numeroso (2000 microgametos), el tamaño del microgametocito de *Isospora felis* es 200 veces superior al de *T. gondii*.

Por el contrario en *Isospora rivolta*, el número de microgametos producidos no sobrepasa los 70, aunque el tamaño de estos microgametos es superior a los de *T. gondii* e *Isospora felis*, teniendo el mismo tamaño que *T. gondii* en cuanto al microgametocito (13,4 x 8,7  $\mu$  m) (Mahrt, 1967) cit. por Hutchison, W.M. (1971).

En cuanto al proceso reproductor de *T. gondii* vemos algunas diferencias importantes con respecto a las coccidias.

La presencia de Endodigenia y Endopoligenia, la formación de pseudoquistes (colonias terminales) y quistes tisulares nos hace ser cautos a la hora de intentar cambiar la denominación genérica, por el momento es aconsejable mantener retenido el género *Toxoplasma* para este parásito hasta que queden dilucidadas todas las lagunas referentes a epidemiología y ciclo biológico.

Lo que queda en la actualidad perfectamente definido es la diferenciación de los dos ciclos dentro del gato: por una parte el ciclo Toxoplasmico único para esta especie, con la presencia de pseudoquistes y quistes tisulares, formas que no se dan en las coccidias y el ciclo intestinal típico coccidiano, con los procesos de esquizogonia, gametogonia y esporulación (Hoare, C.A., 1972).

Hay que señalar también un proceso de división apuntado por Frenkel y citado por J.P. Dubey (1977) denominado Splitting, que podría traducirse por hendimiento, con lo que el esquema del ciclo biológico se nos complica aún más.

Pero quizás la prueba más concluyente en el que un grupo de autores se basan para retener el nombre genérico, sea en lo concerniente a los diferentes períodos prepatentes presentes en el gato cuando se infecta mediante ooquistes, pseudoquistes o quistes tisulares. Hemos visto en apartados anteriores que prácticamente todos los gatos expulsaban ooquistes, cuando previamente habían ingerido carne que contuviera quistes tisulares, siendo éste el medio más extendido de infección en los félidos, como creemos que ocurre en el hombre. Pero si el gato ingiere pseudoquistes u ooquistes, menos de la mitad de ellos expulsarían ooquistes en sus deyecciones, con lo cual vemos que la fase del *Toxoplasma* ingerida tiene una gran importancia a la hora de establecer la epidemiología en estos hospedadores singulares. (Dubey-1977)

Si todo esto lo comparamos con las coccidias pertenecientes al género *Isospora*, vemos relevantes diferencias, ya que las verdaderas *Isosporas* inducen formación de ooquistes en el hospedador definitivo, cuando estos han ingerido ooquistes y esto ocurre en la totalidad de casos, al contrario de lo que hemos visto en el *Toxoplasma*. (Dubey, J.P., 1977).

Otros autores como Tadros y Laarman (1982) consideran que todos los coccidios existentes en el gato pertenecen al género *Isospora*, y que los géneros dados con anterioridad son sinónimos de éste.

Debemos tener presente finalmente que el gato aunque se inmuniza mal y que teóricamente puede estar expulsando ooquistes indefinidamente, esto es en un plano eminentemente teórico ya que el gato una vez pasada la primo-infección puede seguir expulsando ooquistes a intervalos irregulares de muy difícil control, aunque generalmente el número de estos es ostensiblemente menor que en una primera infección (Overdulve, J.P., 1976)

En otro eslabón epidemiológico, como viene reflejado en varios trabajos, sobre todo por autores americanos, el papel de los artrópodos en cuanto a diseminadores de ooquistes es una hipótesis de escaso peso epidemiológico ya que únicamente bajo un punto estrictamente experimental, se han conseguido algunos resultados, como apuntan Chinchilla, M. y Ruiz, A. (1976) refiriéndose al papel de las cucarachas en la diseminación ooquistica.

Por último vemos como queda establecido en el cuadro de la página 110 que el número de coccidias en felinos no salvajes es muy numeroso, y que la única forma de establecer el diagnóstico certero es por un estudio micromorfométrico cuidadoso y que sólo con la perfecta identificación de las coccidias en fase sin esporular y esporulada podemos llegar a su perfecta clasificación, en casos de gran similitud morfológica como ocurre con *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi*, la identificación correcta se realizará mediante biopruebas, esto es

mediante inoculación del producto ooquistico en ratones, único animal fiable para realizar el diagnóstico de certeza.

Pasado un tiempo, que puede oscilar entre 30 y 120 días, estos animales son sacrificados y sometidos a pruebas anatomopatológicas de diferentes partes del cuerpo (cerebro, musculatura esquelética, hígado, bazo, etc.).

Hay que tener en cuenta que los quistes tisulares en cerebro en el caso de que los ooquistes inoculados fueran de *T. gondii* no aparecen hasta los 30 ó 40 días que siguen a la infección, el cerebro en el caso de *T. gondii* es el órgano que alberga la mayoría de quistes tisulares (alrededor del 90%). (Dubey, J.P., 1977).

Para *Hammondia hammondi* el número de quistes en cerebro es muy escaso o prácticamente inexistente, localizándose de preferencia en músculos abdominales. (Dubey, J.P. -1977-).

Los ooquistes de *Hammondia hammondi* no son infectivos oralmente a gatos, estos se contagian obligatoriamente por la ingesta de quistes tisulares, como se aprecia en el dibujo de la página 114. (Dubey, J.P. -1977-).

Los resultados por tanto obtenidos en el estudio coproparasitológico y los datos obtenidos posteriormente una vez identificadas todas las coccidias que fueron apareciendo a lo largo del

trabajo mediante técnicas micromorfométricas, concuerdan con los trabajos de Zaman, V. (1970), quedando de esta manera establecida la parasitología coccidiana en estos animales.

Vemos si hacemos la correlación entre el estudio coproparasitológico y serológico un gran desfase que nos sorprende a primera vista, pero que si lo analizamos detenidamente queda explicado en muchos aspectos, como hemos señalado ya en apartados anteriores. Las características de las distintas cepas (ooquisticas y quistógenas) y la serología poco clara en estos animales explicaría a groso modo el desfase aparecido.

Pero aunque este mecanismo de transmisión no esté aún dilucidado, en vista a los datos recogidos en diferentes países y a los nuestros propios, nos hace pensar que deben existir otros factores que intervengan más fuertemente en la epidemiología toxoplásmica y que la importancia epidemiológica real de los félicos en general y del gato en particular es de escasa importancia y significación.

A la hora de valorarlos en ese eslabón primordial de la cadena epidemiológica deberemos ser cautos a la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

- - - - -

RESUMEN y CONCLUSIONES

A la vista de los resultados del presente trabajo, obtenemos las siguientes conclusiones:

- 1.) El porcentaje de gatos que expulsaron ooquistes de *Toxoplasma gondii* fue de escasa significación, tres fueron positivos lo que se corresponde con una incidencia del 0,5%.
- 2.) Lasseropositividades observadas en la muestra estudiada representan un 25,4%.
- 3.) En nuestro trabajo dos gatos resultaron ser positivos para *Hammondia hammondi*, lo que se corresponde con una incidencia del 0,33%.
- 4.) La incidencia para *Cystoisospora rivolta* fue ligeramente superior que para *Cystoisospora felis*, con valores del 14,1% y 12,5%, respectivamente.
- 5.) En nuestro estudio hemos podido constatar que gatos con títulos altos ( superiores a la dilución 1/256 ) no fueron diseminadores de ooquistes aún encontrándose en un período agudo de - - infección.
- 6.) El gato debe expulsar ooquistes durante cortos momentos de su vida y a intervalos irregulares, teniendo en cuenta que las sucesivas reinfecciones van a hacer prácticamente nulas - -

repetidas expulsiones ooquisticas, como puede deducirse por la baja incidencia ooquistica obtenida.

- 7.) En el ratón blanco el bazo y el peritoneo son las zonas de preferencia al *Toxoplasma gondii* en estadios agudos de - - infección siendo el cerebro el preferido en estadios crónicos.
- 8.) La forma parasitaria ingerida por el gato tiene importancia epidemiológica, gatos alimentados con taquizoitos procedentes de una infección aguda no expulsaron ooquistes, como - - hemos podido constatar.
- 9.) A la vista de los resultados obtenidos el porcentaje de cepas quistógenas del gato debe superior a las ooquisticas.
- 10.) La única certeza de que los ooquistes aislados sean de - - *Toxoplasma gondii* es mediante inoculación al ratón, para posteriormente efectuar estudios histoserológicos y así diferenciarlos de los de *Hammondia hammondi*.
- 11.) El seguimiento, durante varios días consecutivos, para evidenciar ooquistes de *Toxoplasma gondii* en heces de gato, y de esta manera aumentar el número de positividades, no presenta ninguna ventaja sustancial en una encuesta coproparasitológica.

- 12.) Ratonos inculados con ooquistes de *Hammondia hammondi* oralmente presentaron inmunidad cruzada con *Toxoplasma gondii*, aunque los títulos obtenidos son de escasa significación, no sobrepasando la dilución 1/16 mediante la prueba de aglutinación directa.
- 13.) El estudio coprológico realizado en las once especies de félidos salvajes del Zoológico reflejó una nula incidencia coccidiana.
- 14.) La convivencia durante largos períodos de tiempo con - - gatos no parece que tenga una relevancia significativa con respecto a la infección. En nuestro estudio sólo el 20% del personal que ha estado en contacto con estos félidos resultó ser seropositivo, aunque en todos los casos con títulos débiles, correspondiéndose seguramente estos datos con infecciones antiguas.
-

143

MICROFOTOGRAFIAS



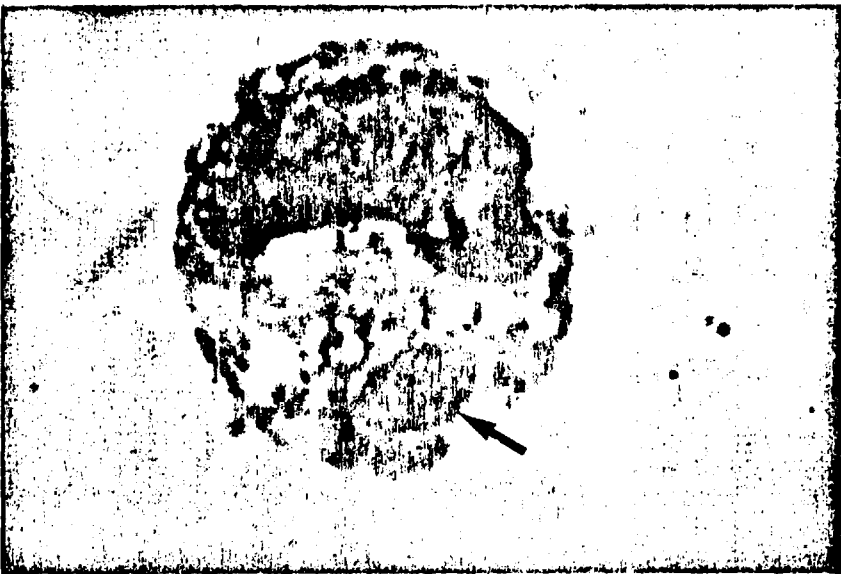
1. Pseudoquiste de Toxoplasma gondii en el que puede apreciarse un tachizoite en proceso de división (Endodiogenia). (x 1.000)



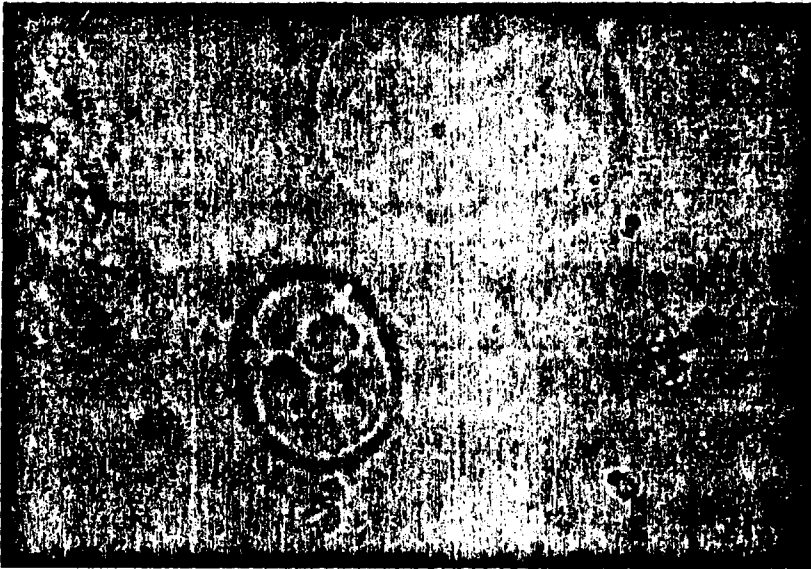
2. Pseudoquiste de Toxoplasma gondii con tres tachizoitos intracitoplásmicos. (x 1.000).



3. Tachyzoitos de Toxoplasma gondii (exudado peritoneal de ratón)  
(x 1.000)



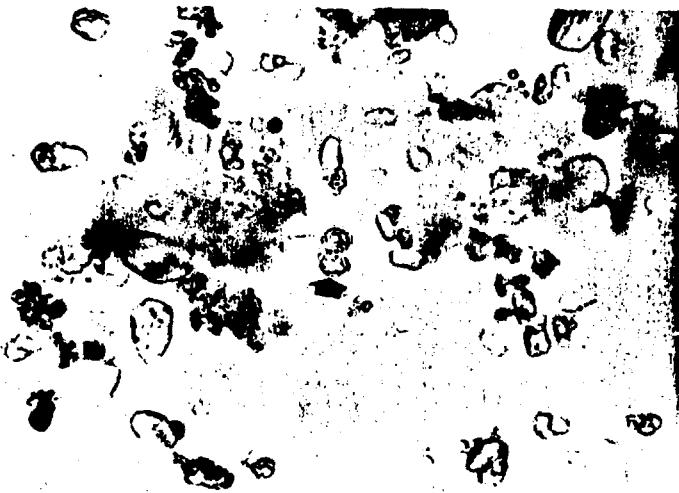
4. Pseudoquiste de Toxoplasma gondii con un tachizoito en su interior. (x 1.000).



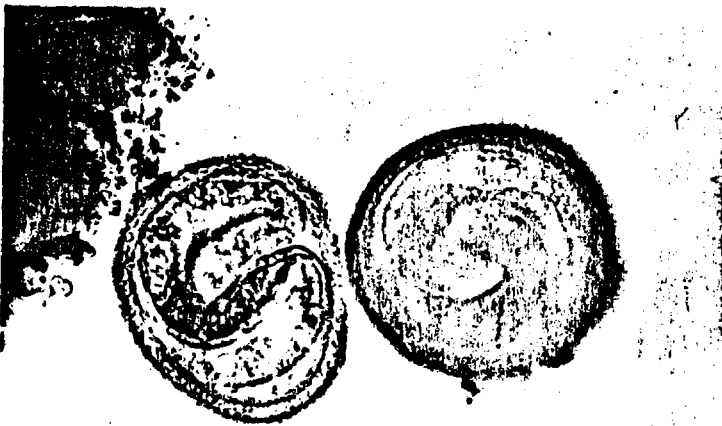
5. Eimeria Sp. Oocyste esporulado comparado con otro de Cyathospora felis. (x 400).



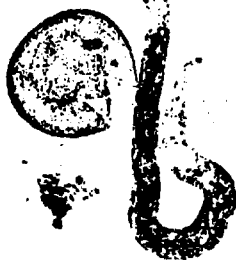
6. Toxoplasma gondii. Oocyste sin esporular. C-I (x 400).



7. Toxoplasma gondii. Oocisto esporulado. C-I (x 400)



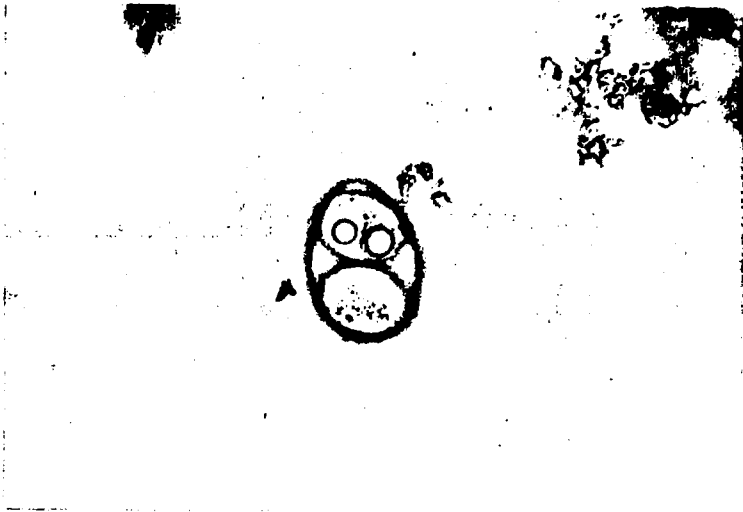
8. Huevos de Toxocara cati embrionados. (x 400).



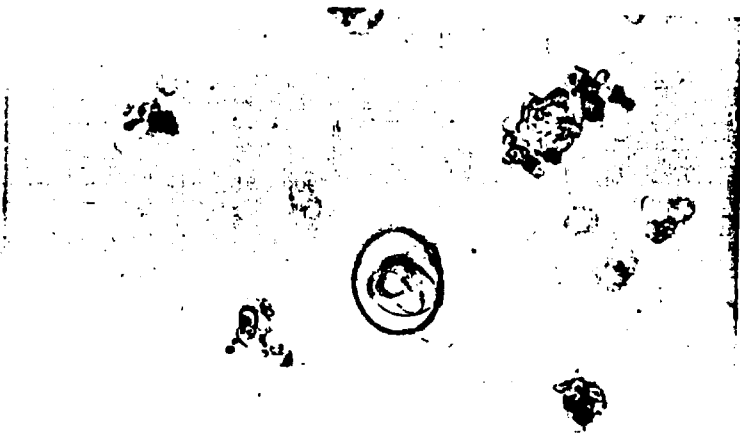
9. Eclosión de un huevo de Toxocara cati (larva de segundo estadio).  
(x 400).



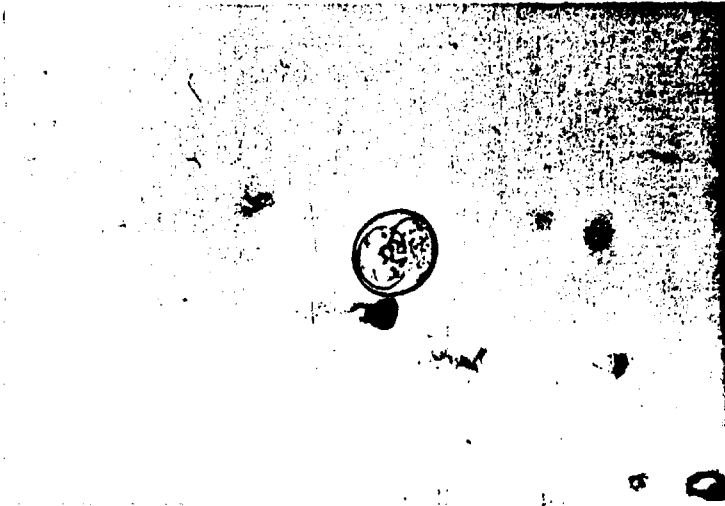
10. Cystoisospora felis (ooquiste sin esporular) (x 400).



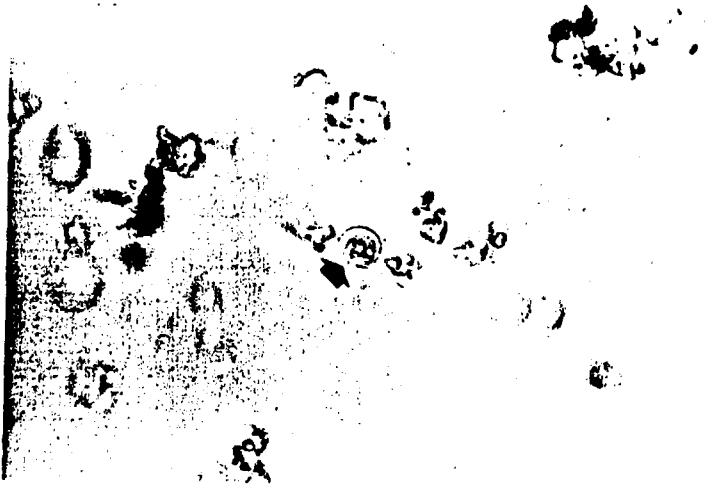
11. Cystoisospora felis. Oocisto esporulado. (x 400).



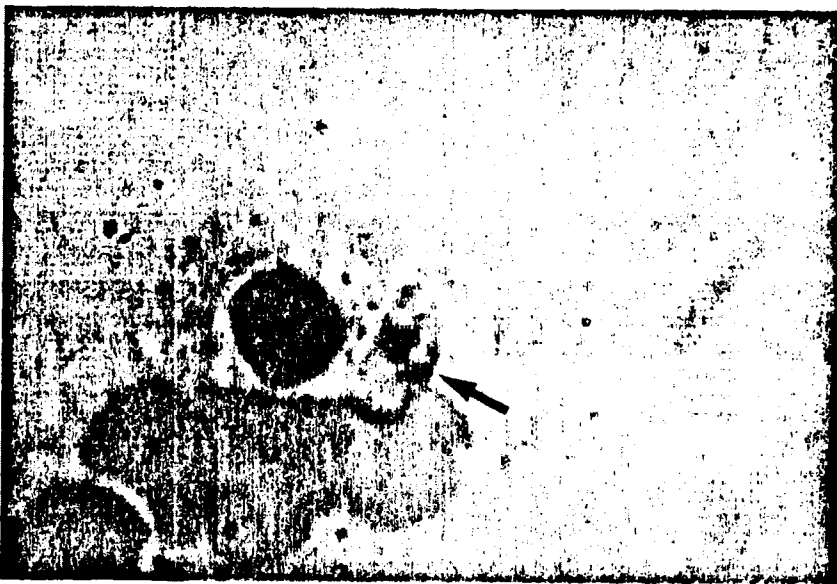
12. Cystoisospora rivolta. Oocisto esporulado. (x 400)  
-donde se visualiza un sólo esporocisto-.



13. Cystoisospora rivolta. Oocisto esporulado. (x 400).  
-con dos esporocistos-



14. Hammondia hammondi. Oocisto esporulado. (x 400).



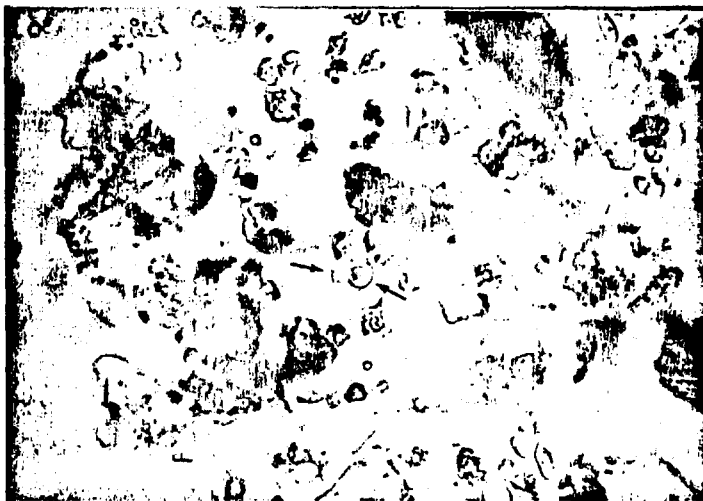
15. Impronta esplénica de un ratón infectado con oocistos de Toxoplasma gondii. (Obsérvese taquizoito extracelular en división). (x 1.000)



16. Impronta esplénica de un ratón infectado con oocistos de Toxoplasma gondii. (Obsérvese taquizoito extracelular) (x 1.000)



17. Extendido de homogeneizado de Bazo de ratón infectado oralmente con oocistos de *T. gondii*. (x 1.000)



18. Oociste de *Toxoplasma gondii*, esporulado. C-II (x 400).

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Al-Khalidi, N.W. (1972). Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* Oocysts to Ponies, *Amer. J. vet. Res.* (41), 9, 1549-1556.
- 2 - Aparicio, G.J. (1968). Estudios sobre la epidemiología de la Toxoplasmosis: la infección entre animales de consumo. Encuegtas serológicas en Madrid. *La Medicina Tropical.* (48), 11-23.
- 3 - Aparicio, G.J. (1972). Estudios sobre "El problema de la Toxoplasmosis en España: su investigación". *An R. Acad. Nac. Med.* (85), 91-162.
- 4 - Aparicio, G.J. (1972). Estudios sobre la epidemiología de la Toxoplasmosis: Infección del gato en los alrededores de Madrid. *La Med. Trop.* (48), 24-39.
- 5 - Aparicio, G.J. (1972). Aislamiento de una cepa de *Toxoplasma gondii* de su medio natural. Heces de gato. *Rev. Diagn. Biol.* 135-142.
- 6 - Aparicio, G.J. (1978). *Toxoplasmosis.* Ed. Marban.
- 7 - Beverley, J.K.A., Hunter, D., Henry, L. (1978). Experimental Toxoplasmosis in young Piglets. *Research in Veterinary Science* (24), 2, 139-142.
- 8 - Beverley, J.K.A. (1976). Toxoplasmosis in animals. *The veterinary Record.* (99), 7, 123-134.

- 9 - Beyer, T.V. (1972). Life Cycles and Systematic position of the Toxoplasms. Parazitologiya (11), 5, 382-386.
- 10 - Bravery, I. (1978). Method of Mass Cultivation of Toxoplasma gondii in cell culture Tropenmedizin und Parasitologia. (29), 4, 27-34-
- 11 - Cole, C.R., Sanger, V.L., Farrell, R.L. (1954). The present status of Toxoplasmosis in Veterinary medicine . N.Am.vet. (53), 265-270.
- 12 - Colley, F.C., Zaman, V. (1970). Observations on the endogenous stages of Toxoplasma gondii in the cat ileum. II. Electron microscope Study. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health. (1), 465-480.
- 13 - Copeland, D. (1979). Effects of Toxoplasma gondii (Gleadle Strain) on the host-parasite relation-ship in trichinosis. International journal for Parasitology. (9), 3, 205-214.
- 14 - Cordero, D.C.M. (1973). Sobre la Epidemiologia de la Toxoplasmosis. Rev. Iber. Parasitol. (33), 347-406.
- 15 - Chalupsky, J. (1981). Application of the India ink immuno-reaction for the diagnosis of Toxoplasmosis. Folia parasitologica (28), 2, 131-136.

- 16 - Chessum, B.S. (1972). Reactivation of *Toxoplasma* oocysts production in the cat by infection with *Isospora felis*. Brit. vet. J. (128), 33-36.
- 17 - Chhabra, M.B. (1979). Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in Zebu cattle in India. Trop. anim. Health and Product. (11), 1, 27.
- 18 - Chinchilla, M., Frenkel, J.K. (1978). Mediation of Immunity to intracellular infection (*Toxoplasma* and *Resnoitia*) within somatic cells. Infection and Immunity. (19), 3, 999-1003.
- 19 - Chinchilla, M., Ruiz, A. (1976). Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. J. Parasitol. (62), 140-142.
- 20 - Christie, E., Dubey, J.P. (1978). Ultrastructure of excystment of *Toxoplasma gondii* oocysts. The journal of Protozool. (25), 4, 65-72.
- 21 - Christie, E., Dubey, J.P. (1977). Cross-Immunity between *Hammondia* and *Toxoplasma* infections in Mice and Hamsters. Infection and Immunity (18), 2, 412-415.
- 22 - D-Aneshbod, K. (1978). Localized lymphadenitis Due to - - - *Leishmania* simulating *Toxoplasmosis*. Value of Electron microscope for differentiation. Amer.Jour. of Clinical Pathol. (69), 4, 462-471.

- 23 - D-Haese, J., Mehlhorn, H., Peters, W. (1977). Comparative electron microscope study of pellicular structures in coccidia (Sarcocystis, Besnoitia and Eimeria). International journal for Parasitology. (7), 6, 505-509.
- 24 - Dubey, J.P. (1980). Persistence of Encysted Toxoplasma gondii in Caprine livers and Public Health significance of toxoplasmosis in Goats. J. Amer. Vet. Med. Assoc. (2), 17, 1203-1207.
- 25 - Dubey, J.P. (1980). Prolonged excretion of toxoplasma gondii in semen of goats. Amer. J. Vet. Res. (41), 5, 794-799.
- 26 - Dubey, J.P. (1979). Direct Development of Enteroepithelial stages of Toxoplasma in the intestines of cats fed cysts. American journal of veterinary Research (40), 11, 1634-1638.
- 27 - Dubey, J.P. (1977). Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis and other tissue cysts-forming Coccidia of Man and Animals. Parasitic Protozoa. A.P. (London) L.T.D. (3), 101-238.
- 28 - Dubey, J.P. (1979). Porcine Toxoplasmosis in Indiana. J. of the Amer. Vet. Med. Assoc. (173), 6, 604-609.
- 29 - Dubey, J.P. (1978). Toxoplasmosis. The Practicing Veterin. (49), 3, 10-45.

- 30 - Dubey, J.P. (1977). Attempted transmission of *Toxoplasma gondii*. Infection from pregnant cats to their kittens. *Journal of the American Veterinary medical association*, (170), 5, 538-540.
- 31 - Dubey, J.P. (1976). Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cat. *Nature* (262), 5565, 213-217.
- 32 - Dubey, J.P., Christie, E., Pappas, P.W. (1977). Characterization of *Toxoplasma gondii* from the feces of Naturally infected cats. *The Journal of Infections Diseases*. (3), 136, 432-437.
- 33 - Dubey, J.P., Frenkel, J.K. (1972a). Cyst induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* (19), 155-177.
- 34 - Dubey, J.P., Streitl, R.H. (1976a). Further studies on the transmission of *Hammondia hammondi* in cats. *J. Parasitol.* (62), 548-551.
- 35 - Dubey, J.P., Frenkel, J.K., (1976). Feline Toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.* (23), 4, 537-546.
- 36 - Dubey, J.P., Hoover, E.A., Walls, K.W. (1977a). Effects of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* (24), 184-186.

- 37 - Dubey, J.P. (1967a). Distribution of *Toxoplasma gondii* in the tissues of infected cats I. Isolation in mice. *Trop. Geogr. Med.* (19), 199-205.
- 38 - Dubey, J.P. (1975a). Immunity to *Hammondia hammondi* infection in cats. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* (167), 373-377.
- 39 - Dubey, J.P. (1976). Effect of freezing on the infectivity of *Toxoplasma* cysts to cats. *J. Amer. Vet. Assoc.* (165), 534-536.
- 40 - Dubey, J.P. (1968a). *Toxoplasma* infections in English cats, *Vet. Rec.* (82), 377-379.
- 41 - Dubey, J.P., Swan, G.V., Frenkel, J.K. (1972). A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of cats. *The journal of Parasitology.* (58), 5, 1005-1006.
- 42 - Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. (1974). Immunity to feline *Toxoplasmosis*: Modification by administration of corticosteroids. *Vet. Pathol.* (11), 350-379.
- 43 - Dubey, J.P. (1977c). Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cat. *Journal of Parasitology.* (63), 156-157.

- 44 - Edith, D.B. (1970). Atoxoplasma associated with an isosporan oocysts in Canaries. J. Protozool. (3), 17, 396-399.
- 45 - Ferguson, D.J.P. (1979). Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of Toxoplasma gondii. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. Act. Pathol. Microbiol. Scand. (87), 4, 29-32.
- 46 - Ferguson, D.J.P. (1979). Ultrastructural studies on the - - - sporulation of toxoplasma gondii. I. Development of the zygote and formation of the sporoblasts. Act. Pathol. Scand. Sect. B. (87), 171-181.
- 47 - Ferguson, D.J.P. (1979). Ultrastructural studies on the sporulation of Toxoplasma gondii. II. Formation of the sporocysts and structure of the sporocyst wall. Act. Pathol. Microb. Scand. Sect. B. (87), 183-190.
- 48 - Ferguson, W.W. (1979). Toxoplasmosis in a calf. The Veterinary Record. (104), 17, 63-69.
- 49 - Ferreira-Jamra, L.M. (1979). Frequency of Antibodies to Toxoplasma in pregnant women and their newborns in Sao Paulo city, Brasil. Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas. (12), 4-5, 279-283.

- 50 - Flynn, J. (1979). Epidemiology of Toxoplasmosis in the west of Ireland. Irish journal of Medical Science (148), 7-8, 248-252.
- 51 - Frenkel, J.K., Hoff, R.L., Cessna, J.E. (1972). Spherical heads as filters: separation and size determination of coccidia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (140), 3, 747-749.
- 52 - Frenkel, J.K. (1978). Toxoplasmosis in cats: diagnosis treatment, Comp. immun. microb. and infect. diseases. (1), 1-2, 37-49.
- 53 - Frenkel, J.K. (1978). Toxoplasmosis. Current veterinary therapy. (6), 1318-1326.
- 54 - Frenkel, J.K. (1978). The demonstration of Toxoplasma and other organisms by immunofluorescence. J. Infec. Dis. (2), 138, 265-268.
- 55 - Frenkel, J.K. (1971b). Toxoplasmosis. Mechanisms of infection laboratory diagnosis and management. Curr. Top. Pathol. (54), 29-75.
- 56 - Frenkel, J.K. (1975). Toxoplasmosis in cats and man. Feline Pract. (5), 28-41.

- 57 - Frenkel, J.K., Dubey, J.P. (1972c). Effect of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.* (59), 587-588.
- 58 - Fulton, J.D., Turk, J.L. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii* lancet. (11), 1068-1069.
- 59 - Garnham, P.C.C.; Bird, R.G. et al (1961). Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites. II. The fine structure of the sporozoite of *Laverania*. (*Plasmodium*) *falcipara*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (55), 98-102.
- 60 - Ganley, J.P. (1980). Association of cats and Toxoplasmosis, *Amer. J. of Epidem.* (3), 2, 238-242.
- 61 - Gradkouskaya, N.V. (1978). Application of the Passive Hemagglutination test for Toxoplasmosis Diagnosis. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii. Immunob.* 8, 106-109.
- 62 - Gustafson, P.V.; Agar, H.D. y Cramer, D.L. (1954). An electron microscope study of *Toxoplasma*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (3), 1008-1021.
- 63 - Hagiwara, T. (1977). Toxoplasmosis of Animals in Japan. *Intern. J. Zoon.* (4), 2, 56-70.
- 64 - Hagiwara, T. (1978). Latent infection of *Toxoplasma* in sheep and goats. *J. of Nutrit.* (108), 8, 455-460.

- 65 - Hammond, M. - Long, P.L. (1973). The coccidia (*Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related genera). University Park Press
- 66 - Handler, R.P. (1979). Ocular Toxoplasmosis *Annals of Internal Medicine*. (91), 2, 324-327.
- 67 - Harmeson, J., Lai, C.H. and Tizard, I.R. (1978). Prevalence of serum Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Ontario Mammals. *Canadian J. of Comparative Med.* (42), 2, 177-190.
- 68 - Hartley, W.J. (1976). Sporozoa in animals, with particular reference to *Toxoplasma* and *sarcocystis*. *New Zealand Veterinary J.* (24), 1-2, 1-14.
- 69 - Hoare, C.A. (1972). The developmental stages of *Toxoplasma*. Wellcome Museum of Medical Science, London 56-59.
- 70 - Hoff, R.L., Dubey, J.P., Behbehani, A.M. and Frenkel, J.K. (1977). *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture. *New Biologic evidence. J. Parasitol.* (63), 6, 27-39.
- 71 - Huber, T.W. (1979). Diagnosis of Toxoplasmosis by Electron Microscope. *Fine-Structural Analysis. Amer. J. Clin. Pathol.* (72), 2, 225-231.
- 72 - Hudlt, G. (1979). On the Epidemiology of human Toxoplasmosis in scandinavian specially in children. *Act. Paediatr. Scandin.* (68), 5, 46-51.

- 73 - Hutchison, W.M. (1960). Behavioural abnormalities in *Toxoplasma* infected mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. (3), 74, 104-108.
- 74 - Hutchison, W.M. (1979). *Toxoplasma gondii*: Scanning electron microscope studies on the small intestine of infected and - - uninfected cats. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* (87), 6, - - 393-397.
- 75 - Hutchison, W.M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 206, 961-962.
- 76 - Hutchison, W.M. (1967). The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61, 80-89.
- 77 - Hutchison, W.M., Dunachie, J.F. and Work, K. (1968). The fecal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Acta. Pathol. Microb. Scand.* 74, 462-464.
- 78 - Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Sim, J.C., and Work, K. (1969). Life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.*, 4, 806.
- 79 - Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Sim, J.C. and Work, K. (1970). Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.* (1), 142-144.

- 80 - Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Work, K., and Sium, J.C., (1971). The life cycle of the coccidian parasite. *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (65), 380-399.
- 81 - Ippen, R., Kojojez, V. and Jira, J. (1981). Toxoplasmosis in Zoo animals. *Folia Parasitol.* (28), 109-115.
- 82 - Ito, S., Tsunoda, K., Nishikawa, H. and Matsui, T. (1974a). Small type of *Sisospora bigemina* isolation from naturally infected cats and relations with *Toxoplasma* oocysts. *Nat. Inst. Anim. Health. Quart.* (14), 137-144.
- 83 - Jacobs, L. (1964). The occurrence of *Toxoplasma* infection in the absence of demonstrable antibodies. *Proc. 1st. Int. Congr. Parasitol.* (1), 176-177.
- 84 - Jacobs, L. (1967). *Toxoplasma* and Toxoplasmosis. In *advances in Parasitology* (B. Daws, ed.) Academic Press. New York and London 1 - 45.
- 85 - Jacobs, L. (1973). New knowledge of Toxoplasmosis. In *advances in Parasitology* (B. Daves, ed.). Academic Press, New York and London. (11), 631-669.
- 86 - Jacobs, L. and Melton, H.L. (1954). Modification in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various host. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (3), 447-457.

- 87 - Jacobs, L., Remington, J.S. and Melton, M.L. (1960a). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* (46), 11-21.
- 88 - Jacobs, L. (1967). *Toxoplasma* and *Toxoplasmosis*. *Adv. Parasitol.* (5), 1-45.
- 89 - Janitschke, K. (1979). Transmission of *Toxoplasma* oocysts from domestic cats to Rabbits. *Zentralblatt* (245), 4, - - - 544-549.
- 90 - Jones, T.C. (1974). Macrophages and intracellular parasitism. *Res. J. Reticuloendothelial Soc.* (15), 439-450.
- 91 - Kean, B.H., Kimbal, A.C. (1977). Complement Fixation Test in Diagnosis of Congenital *Toxoplasmosis*. *Amer. J. Dis. of Child* (13), 1, 77-82.
- 92 - Khodr, G., Matossian, R. (1978). Hydrops fetales and congenital *Toxoplasmosis* value of direct immunofluorescence test *obstetrics and Gynecology* (51), 1, Suppl.
- 93 - Ko, R.C. (1980). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the chinese population of Hong-Kong. *Trans. of the Royal Society of Trop. Med. Hyg.* (3), 74. 351-360.

- 94 - Krick, J., Remington, J. (1978). Current concepts in Parasitology. Toxoplasmosis in the adult. An Overview, The New England J. of Med. (298), 10, 550-562.
- 95 - Kuhn, D., Juhr, N., Rommel, M. y Boch, J. (1974). Experimentelle Toxoplasmosis. Infektionen beider katze. III. Entwicklungsstadien nach. Oraler Toxoplasma -Oozysten-Infektion in Darm der Katze Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. (87), 41-46.
- 96 - Kumar, P.S., Kumar, R., Mohapatra, L.N. (1978). Purification of Toxoplasma Haemagglutination Antigen. The Indian J. Med. Research (68), 44-48.
- 97 - Levine, N.D. and Ivens, V. (1981). The coccidian Parasites (Protozoa, Apicomplexa of Carnivores). Illinois biological monographs, n<sup>o</sup> 51, 97-154.
- 98 - Levine, N.D. (1970). Taxonomy of the Sporozoa. J. Parasitology. 56, 208-209.
- 99 - Levine, N.D. (1973). Protozoan Parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Company.
- 100 - Long, P.L. (1982). The biology of the coccidia, edited by P.L. Long.

- 101 - Levelace, J.K. (1978). Toxoplasmosis among the ticuna Indians in the state of Amazonas. Brazil. Tropical and Geographical Medicine. (30), 3, 295-300.
- 102 - Mahmowd, A.A., Warren, K.S., Strickland, G.T. (1976). Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. Nature (London). (263), 56-57.
- 103 - Marchiondo, A. (1976). Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals of New Mexico, Arizona and Colorado, J. of wild life Diseases. (12), 2, 226-234.
- 104 . Markvart, K. (1979). Laboratory Epidemic of Toxoplasmosis J. of Hyg. Epidem. Microb. and Immun. (22), 4, 120-129.
- 105 - Matuschka, F.R. (1978). Freeze-Etching observation on *Toxoplasma gondii* cysts from Brain of *Mastomys Natalensis*. Proto plasma (94), 1-2, 145-152.
- 106 - Mehlhorn, H. (1980). Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris* and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of Mice. J. Parasitol. (66), 1, 47-61.
- 107 - Michel, R. (1979). Fine-structure changes in *Toxoplasma gondii* trophozoites after Depp-freezing with Dimethyl Sulphoxide. Parasitenkunde. (58), 3, 211-213.

- 108 - Moirachi, A., Ruggenini, T. and col. (1978). The immune response during Toxoplasmic infection. *Bollettino Dell'Instituto sieroterapico milanese*. (57), 2, 140-149.
- 109 - Munday, B.L. (1978). Congenital Toxoplasmosis in Tasmania. *Med. J. of Australia* (1), 2, 28-32.
- 110 - Nguyen, B.T. (1979). Modes of Entry of *Toxoplasma gondii* trophozoites into normal mouse peritoneal macrophage and HeLa cell monolayers. A phase contrast microcinemat. Study. *Parasitenkunde*. (60), 2, 135-142.
- 111 - Nicolle, C., Manceaux, L. (1909). Sur un Protozoaire nouveau du Gondi. *Hebd. Seances Acad. Sci.* (148), 369-372.
- 112 - Nishri, Z. (1978). Toxoplasmosis in Israel. Evaluation of Laboratory data, 1970-73. *Israel Journal of Medical Sciences* (14), 10, 1039-1047.
- 113 - Omata, Y. (1979). Different appearance of Parasitized Erythrocytes in Blood between normal and *Toxoplasma* infected rats after infection of *Plasmodium berghei*. *Zentralblatt*. (244), 2-3, 150-160.
- 114 - Overdulve, J.P. (1978). Studies on the life cycle of *Toxoplasma gondii* in germfree gnotobiotic and conventional cats (11). (communicated by Prof. J. Lever). *Proceedings*. (81), 1, 33-37.

- 115 - Overduyn, J.P. (1978). Excretion of *Toxoplasma gondii* by non-immunized and immunized cats, its role in the epidemiology of Toxoplasmosis. (communicated by Prof. J. Lever). Proceedings (81), 1, 1-9.
- 116 - Overduyn, J.P. (1970). The probable identity of *Toxoplasma* and *Isospora* and the cat in the transmission of Toxoplasmosis Tijdschr. Diergeneesk deel (95), 2, 149-155.
- 117 - Pelster, B. (1979). Ultrastructural changes in mouse peritoneal exudate cells during infection with *Toxoplasma gondii*. Zentralblatt. (244), 2-3, 225-232.
- 118 - Petrak, M., Carpenter, J. (1965). Feline Toxoplasmosis. J. Amer. vet. Med. Assoc. (146), 728-734.
- 119 - Pettersen, E.K. (1977). Destruction of *Toxoplasma gondii* by HCl solution. Act. Pathol. Microb. Scand. (87), 4, 217-222.
- 120 - Pettersen, E.K. (1977). Experimental toxoplasmosis in mice and rabbits. Virulence and cyst formation of *Toxoplasma gondii*. Act. Pathol. Microbiol. Scand. (85), 1, 85-92.
- 121 - Piekarski, G. (1978). Effects of a latent *Toxoplasma* infection on the learning Ability in white laboratory Rats and mice. Parasitenkunde. (57), 1, 45-51.

- 122 - Porchet, E., Torpier, G. (1977). Freeza fracture study of Toxoplasma and Sarcocystis infective stages. Parasitenkunde (54), 2.
- 123 - Raisanen, S. (1978). Toxoplasmosis transmitted by Blood transfusions. Transfusion (18), 3, 329-334.
- 124 - Raisanen, S.A. (1978). The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: survival and pathogenity of toxoplasma gondii trophozoites in liquid media. Medical - - Hypothesis. (4), 4, 367-372.
- 125 - Reikram, A. (1976). Virulence of different strains of Toxoplasma gondii and host response in mice. Nature. (261). 5560, 508-512.
- 126 - Remington, J.S. (1979). Longitudinal studies of lymphocyte response to T. gondii antigens in humans infected with - - T. gondii. J. of Clin. and Labor. immunol. (2), 4, 293-296.
- 127 - Remington, J.S. (1979). Activity of Human Blood Leukocytes against Toxoplasma gondii. The Journal of Infections Diseases (140), 6, 890-898.
- 128 - Rey Calero, J., Mira, G. (1966). Tipos de anticuerpos (IgM, IgA, IgG) responsables de las reacciones serológicas en la Toxoplasmosis. Rev. Ibérica Parasitología (26), 4, 391-403.

- 129 - Rey Calero, J., Mira, G. (1967). Encuesta serológica de Toxoplasmosis en la provincia de Cádiz. *Diagnóstico Biológico*. (16), 314-330.
- 130 - Rey Calero, J., Barea Suárez y Mira, G. (1968). Encuesta serológica de Toxoplasmosis (hemaglutinación de Toxoplasmosis en la Provincia de Cádiz). *Rev. San. e Hig. Pub.* (42), 11-12, 699-740.
- 131 - Rey Calero, J., Mira Gutiérrez, Barea Suárez y Otero Puime. (1969). Estudio epidemiológico de la primoinfección toxoplásmica en la Provincia de Cádiz. *Rev. Clin. Española.* (112), 2, 135-140.
- 132 - Rey Calero, J., Mira Gutiérrez, Barea Suárez y Otero Puime (1969). Estudio epidemiológico de la infección toxoplásmica en escolares y jóvenes de la Provincia de Cádiz. *Rev. Pediat. Escol.* 11-28.
- 133 - Ricciardi, I.D. (1978). Seroepidemiological study on the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil. *Revista de Microbiología.* (9), 4, 181-189.
- 134 - Roberts, W.L. y Hammond, D.M. (1970-a). Ultrastructural and cytological studies of sporozoites of four Eimeria species. *J. Protozool.* 17, 76-86.

- 135 - Rondria, V. (1979). Elimination of Oocysts of *Toxoplasma gondii* investigated in cats. *Veterinari Medicina* (24), 1, 59-65.
- 136 - Ruiz, A., Frenkel, J.K. (1977). Isolation of *Toxoplasma* from cat feces deposited in false attics of homes in Costa Rica. *The Journal of Parasitology*. (5), 63, 931-939.
- 137 - Scholtyssek, E., Mehlorn, H. y Friedhoff, K. (1970). The fine structure of the conoid of sporozoa and related organisms. *Z. Parasitenk.* (34), 69-94.
- 138 - Scholtyssek, E. (1979). Fine structure of parasitic protozoa. Springer-verlag. Berlin. Heidelberg. New York.
- 139 - Scholtyssek, E., y Mehlhorn, H. (1970). Ultrastructural study of characteristic organelles (paired org., micronemes, micropores) of Sporozoa and related organisms. *Z. Parasitenk.* 34, 97-127.
- 140 - Senaud, J. (1976). *Toxoplasma* and Toxoplasmosis: Developmental Cycle of *Toxoplasma gondii* (ultrastructure). *Bulletin de la Societé Zoologique de France* (101), 5, 64-79.
- 141 - Shali, H.L. (1971). The life cycle of *Isospora felis*. Wenyon 1923, a coccidium of the cat. *J. Protozool.* (18), 3-17.

- 142 - Sheffield, H.G., Melton, M.L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* (54), 209-226.
- 143 - Sheffield, H.G. and Melton, M.L. 1974. Immunity to *Toxoplasma gondii* in cats. In: Proceedings of the Third International congress of Parasitology. Munich. Vol. 1 pp. 106-107. Facta Publications Vienna.
- 144 - Siim, J.C. (1979). An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathologica et microbiologica Scandinavica* (87), 5, 277-286.
- 145 - Siim, J. Ch., Hutchison, W.M., Work, K. (1969). Transmission of *Toxoplasma gondii*. Further studies on the Morphology of the cystic form in cat faeces. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* (77), 756-757.
- 146 - Straypedersen, B. (1980). Prospective study of acquired toxoplasmosis among 8043 pregnant women in the Oslo area. *Amerc. J. Obst. Gynecol.* (136), 3, 399-407.
- 147 - Tadros, W. and Laarman, J.J. (1982). Current concepts on the Biology. Evolution and Taxonomy of tissue cyst-forming Eimeriid coccidia. *Advances in Parasitology.* 20, 293-412.

- 148 - Tryon, J.C. (1979). *Toxoplasma gondii*: Ultrastructure and antigenicity of purified Tachyzoite Pellicle. *Experim. Parasitol.* (48), 2, 198-221.
- 149 - Turner, G.V.S. (1976). Toxoplasmosis as a Public Health Hazard, *J. of the South Afric. Veter. Assoc.* (47), 3, 227-241.
- 150 - Vivier, E. y Hennere, E. (1965). Ultrastructure des stades vegetatifs de la coccidie coelotropha durchoni. *Protistologica*, 1, 89-104.
- 151 - Vivier, E.; Devauchelle, G.; Petitprez, A. et al. (1970). Observations de cytologie comparée chez les sporozoaires. I. Les structures superficielles chez les formes vegetatives. *Protistologica*. 6, 127-150.
- 152 - Vráblic, J. (1977). Contribution to the understanding of macromogony and oogony of *Toxoplasma gondii*. *Biologia* (32), 11, 837-846.
- 153 - Wallace, G.D. (1969). Serologic and epidemiologic observations on Toxoplasmosis on three pacific atolls. *Amer. J. Epidemiol.* (90), 103-111.
- 154 - Wallace, G.D. and Frenkel, J.K. (1975). *Besnoitia* species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae): Recognition of cyclic transmission by cats. *Science* 188, 369-371.

- 155 - Weiland, G. (1979). Serological Cross-Reactions between *Toxoplasma* and *Hammondia*. *Zentralblatt* (244), 2-3, 18-23.
- 156 - Work, K., Hutchison, W.M. (1969). A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* (75), 191-192.
- 157 - Yilmaz, S.M.; Hopkins, S.H. (1972). Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* (58), 938-939.
- 158 - Zaman, V., Coltery, F.C. (1970). Observations on the endogenous stages of *Toxoplasma gondii* in the cat ileum, I. Light microscope study. *South Asian. J. Trop. Med. Publ. Health.* (1), 457-464.
- 159 - Zaman, V. (1970). Morphology of *Toxoplasma* oocysts and its comparison with other cat coccidia. *South Asian. J. Trop. Med. Public. Hith.* (1), 3, 329-335.
- 160 - Zardi, O., (1980). *Toxoplasma gondii* in wild mammals of a Mediterranean biotope of Tuscany Italy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (74), 3, 409-413.
- 

