

Análisis de los parámetros hemáticos y su relación con los perfiles de anticuerpos en la toxoplasmosis caprina a partir de un modelo experimental

Conde de Felipe M.; Rodríguez Ponce E.; Molina Caballero J.M.; Ruiz Reyes A.; González Pérez J.; González Díaz O.¹

Unidad de Parasitología. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de G.C.

¹ Departamento de Química. Universidad de Las Palmas de G.C.

Análisis de los parámetros hemáticos y su relación con los perfiles de anticuerpos en la toxoplasmosis caprina a partir de un modelo experimental

Palabras clave: Toxoplasmosis experimental caprina; perfil serológico; parámetros hematológicos.

Keys words: Toxoplasmosis in goats; specific antibodies levels; haematic parameters.

RESUMEN: Con el objeto de profundizar en el conocimiento de la Toxoplasmosis en la especie caprina, se realizó un estudio detallado de los parámetros hemáticos y de la respuesta inmune humoral generada frente a *T. gondii* en 24 cabritos, pertenecientes a la Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.), que habían sido infectados experimentalmente con el citado protozoo. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS 8.0 para Windows 95, tratando de relacionar la respuesta serológica para los isotipos IgG e IgM con las diferencias observadas entre animales inoculados y testigos en distintos parámetros hemáticos.

SUMMARY: In order to analyze the evolution of Toxoplasmosis in goats, a study on specific antibodies levels against *Toxoplasma gondii* antigens and on evolution of haematological parameters have been performed on A.C.C. goat kids, which were experimentally inoculated with the parasite. Also, after statistical processing of serology and haematology results with SPSS 8.0 for Windows 95, evolution of IgG and IgM levels have been related with haematological parameters differences between infected and control group.

Introducción

La Toxoplasmosis es una de las zoonosis parasitarias más difundida a nivel mundial, y a pesar de que suele cursar de forma asintomática, en la especie humana, la infección, congénita o adquirida después del nacimiento, puede ser muy grave en mujeres que se infectan por primera vez durante la gestación (abortos, malformaciones congénitas, etc.) y

en individuos cuyo sistema inmune está comprometido, como en los enfermos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), los pacientes que hayan recibido terapias inmunosupresoras, etc.

Por este motivo, el estudio de la Toxoplasmosis en la Agrupación Caprina Canaria, uno de los mayores recursos de nuestra región, es de gran importancia, por ser una de las especies ganaderas más susceptibles

a *Toxoplasma gondii* y una de las principales fuentes de transmisión de la enfermedad a la especie humana a través del consumo de carne poco cocinada o de la leche no pasteurizada (10,19, 21,24, 25, 28).

Como ocurre en la mayoría de las infecciones provocadas por protozoos, *T. gondii* favorece el desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular (3,14) siendo ambas responsables del control de la multiplicación y diseminación del parásito en el hospedador, repercutiendo significativamente tanto sobre el curso de la infección como en la presentación de las manifestaciones clínicas.

Ante estas circunstancias, y teniendo en cuenta que en la isla de *Gran Canaria*, se ha detectado una alta seroprevalencia de la *Toxoplasmosis* en la especie caprina además de en la bovina y en la especie humana (23) las investigaciones realizadas en este sentido tienen interés tanto desde el punto de vista ganadero como el de la Salud Pública.

Material y métodos

En este estudio se utilizaron 24 cabritos de un mes de vida, pertenecientes a la Agrupación Caprina Canaria (A.C.C.), que fueron infectados experimentalmente con la cepa RH de *T. gondii*.

Antes y durante la experiencia se extrajeron, de forma seriada, mues-

tras de sangre y suero de cada uno de los animales con el objeto de estudiar diferentes parámetros hemáticos, así como su respuesta inmune humoral. A estas tomas se les denominó control, siendo efectuados un total de catorce controles, como se puede apreciar en la Tabla 1.

Perfil serológico

La respuesta humoral de los cabritos inoculados fue estudiada mediante sendos métodos E.L.I.S.A. para la detección de los niveles de IgG e IgM anti-*T. gondii*, utilizándose, en el caso de la IgG, la técnica estandarizada descrita por CALAMEL y LAMBERT (1988) (6) y en el caso de la IgM, el protocolo desarrollado por LE BRETON (1991) (13) con algunas modificaciones.

Parámetros hemáticos

Con la finalidad de realizar un seguimiento de los parámetros hemáticos, se recogieron 5 ml de sangre en tubos con EDTA tripotásico, procediéndose de la siguiente forma:

- Se realizaron frotis sanguíneos, que fueron teñidos mediante un método Panóptico Rápido (QCA), con el objetivo de elaborar la Fórmula Leucocitaria a partir de un total de 200 leucocitos.
- Mediante el empleo de un contador hematológico (Sysmex F-800), se obtuvo, de cada uno de los controles, los valores relativos a recuento de eritrocitos y recuento total de leucocitos, además de la concentración de hemoglobina y valor hematocrito.

Procesado estadístico: comportamiento temporal de los diferentes parámetros hemáticos y su relación con los perfiles de anticuerpos

Con la intención de estudiar de una forma gráfica, sencilla y de manera diferencial, la tendencia en el



▲ Foto 1.

tiempo y el comportamiento de los diferentes parámetros hemáticos, se procedió mediante transformación y a efectos estadísticos, a la definición de las variables “diferencias”, siendo estas la diferencia entre las medias de los parámetros hemáticos encontrados para el grupo de los animales inoculados frente a la de los no inoculados.

Estas variables “diferencias” pueden ser fuertemente positivas, con lo que el valor del parámetro estudiado en cada uno de los casos presentará un valor más grande en animales inoculados, o bien negativa, si sucede el caso contrario. Todo ello nos va a permitir ver cómo evoluciona la diferencia de cada uno de los parámetros hemáticos en el transcurso de los días post-inoculación y de esta forma relacionarlos con los resultados serológicos.

El nombre de las variables diferencias es igual que el nombre genérico, anteponiendo el prefijo di. Así, si hematocrito es **hemat**, la diferencia es **dihemat**. Estos nombres de

variables son los que se han dado para poder procesar los datos con el paquete estadístico SPSS 8.0 para Windows 95.

Para las representaciones gráficas y, debido al distinto recorrido de las variables, hemos optado por representar la evolución temporal (días post-inoculación) de las variables hemáticas una vez tipificadas o normalizadas (normalización por su media y desviación típica).

Resultados

Perfil serológico

Los animales inoculados mostraron un incremento significativo de anticuerpos una semana después de la infección para el caso de la IgM específica y a las dos semanas en el caso de la IgG, alcanzándose un valor máximo a los 14 días y a los 35 días post-inoculación, respectivamente, como se puede apreciar en el Gráfico 1.

Parámetros hemáticos

En cuanto a los parámetros hemáticos obtenidos en los cabritos inoculados, sólo se detectó una disminución progresiva en la concentración de hemoglobina mientras que en el nivel de eosinófilos

Tabla 1. Recogida de muestras (Control) a lo largo del experimento (días post-inoculación -d.p.i.-).

Nº de Control	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Día post-inoculación (d.p.i.)	0	2	4	7	14	21	28	35	42	49	56	63	77	91

se observó una tendencia lineal al alza siendo la tasa de crecimiento por día de 3.25 unidades de eosinófilos por término medio y día transcurrido tras la inoculación.

Procesado estadístico: Comportamiento temporal de los diferentes parámetros hemáticos y su relación con los perfiles de anticuerpos

Antes de las representaciones gráficas es conveniente estudiar las correlaciones entre las variables "diferencias" de los diferentes parámetros hemáticos y los niveles de IgG anti-*Toxoplasma gondii*. Las relativas a IgM mostraron menos interés dado que ésta variable alcanza un pico durante las primeras semanas del experimento (14 d.p.i.) y posteriormente disminuyen hasta alcanzar valores próximos a cero.

Las variables diferencias en hemoglobina (**difhemog**) y diferencia en recuento de linfocitos (**diflinfo**) están fuertemente correladas, al 95% de significación, con la variable IgG, mientras que las variables diferencia de eosinófilos (**difeos**) y diferencia de eritrocitos (**diferitr**) al ser significativas al 90% se encuentran al borde de la significación.

Los resultados estadísticos se han agrupado en varias gráficas que en orden de importancia estadística van desde las variables con fuerte correlación a las que menos correladas se encuentran.

En los Gráfico 2 y 3 se muestran los valores tipificados o normalizados en el eje de ordenadas de los parámetros hemáticos que tienen una correlación más elevada y los niveles de anticuerpos específicos que se indican en el cuadro de leyendas del gráfico. Una normalización en una variable continua significa $[z = (x - \bar{x})/s]$, donde \bar{x} es la media de la muestra y s es la desviación típica muestral].

En el Gráfico 2, se muestran los parámetros hemáticos de la fórmula leucocitaria (linfocitos y eosinófilos), junto con el recuento total de leucocitos que presentan correlación con la evolución en el tiempo con la concentración de IgG específica.

En dicha Figura se puede observar como se produce el primer aumento en las tres variables diferencia coincidente con el pico de IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Posteriormente se aprecia un segundo aumento entre los 56 y 63 d.p.i., siendo en este caso mayor que el primero.

En la Gráfico 3, se muestran los parámetros hemáticos relacionados con la serie roja.

En ella, se puede observar varios aspectos:

1. El recuento de glóbulos rojos, sufre una fuerte disminución que coincide en el tiempo con el pico de IgM específicas. Sin embargo el número de eritrocitos oscila a lo largo de todo el período post-inoculación.

2. La hemoglobina tiende a disminuir en los individuos inoculados.
3. El porcentaje de hematocrito experimenta una tendencia similar a la hemoglobina.

A la hora de analizar si existe algún modelo que sea capaz de relacionar el comportamiento de las curvas IgG e IgM encontradas experimentalmente con las diferencias en los parámetros hemáticos entre los individuos inoculados y los del lote control. Para ello, utilizamos la herramienta estadística de regresión múltiple que nos va a permitir, mediante el procedimiento escalonado de introducción de variables, decidir cuáles de ellas explican el mayor porcentaje de varianza, utilizando como variables independientes las nueve variables diferencia en los parámetros

Gráfico 1. Evolución de los niveles de inmunoglobulinas IgG (U.I./ml) e IgM (U./ml) anti-*Toxoplasma gondii* (* */n) en el transcurso de la infección.

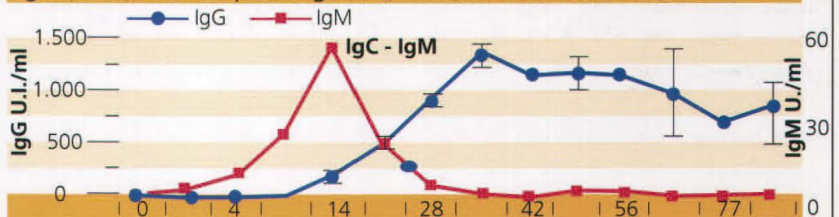
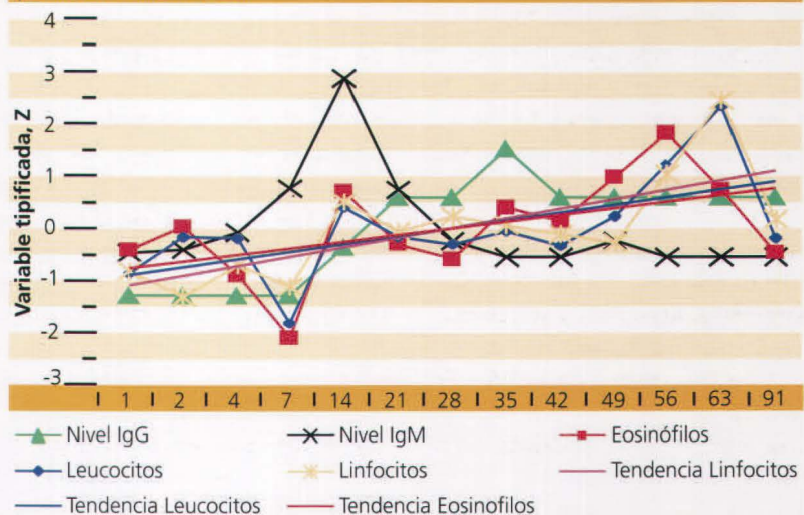


Gráfico 2. Diferencias entre Inoculados y No Inoculados de algunos parámetros hemáticos.



▲ Evolución de las variables hemáticas tipificadas relacionados con la serie roja (Recuento de Eritrocitos, Concentración de Hemoglobina y Valor Hematocrito) y niveles séricos de IgG e IgM específicas. Así mismo se representa la tendencia de la evolución de la variable diferencia del valor hematocrito y la concentración de hemoglobina.

tros hemáticos y como dependientes los valores en unidades de IgG e IgM específicas.

Respecto al modelo obtenido con el paquete estadístico SPSS, y en concreto para la el isotipo IgG, el mejor modelo es el que corresponde a la inclusión de tan sólo dos variables independientes (denominadas predictores). Estas dos variables se corresponden con la diferencia en el hematocrito, que va disminuyendo con los días post inoculación en los individuos inoculados, y con la diferencia en el nivel de eosinófilos que

va aumentando con el tiempo en los sujetos que fueron inoculadas con *Toxoplasma gondii*. El resultado del ajuste nos conduce a un modelo de la forma que se expresa en la Ecuación 1. En la que se muestra el error estadístico en cada parámetro obtenido.

$$IgG_{(Unidades)} = (313.37 \pm 113) - (81.61 \pm 27.47) \cdot \Delta Hemat + (1.262 \pm 0.458) \cdot \Delta Eos \quad (1)$$

Donde $\Delta Hemat$ y ΔEos representan, respectivamente, las variables diferencia en el valor hematocrito y

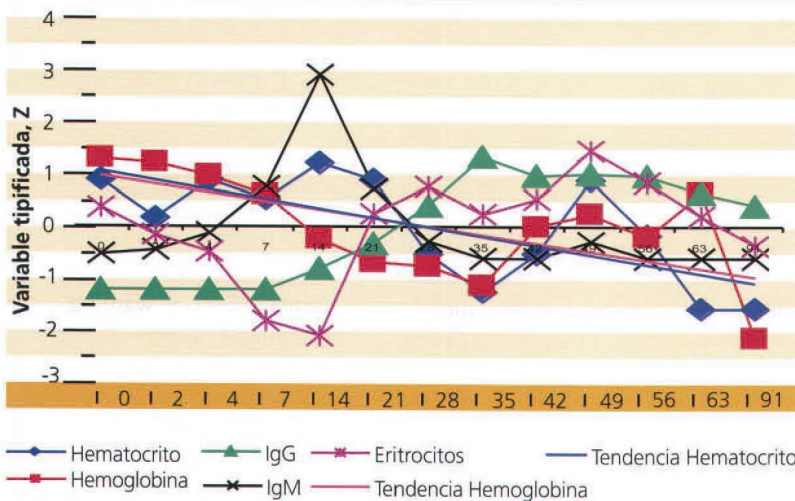
en el nivel de eosinófilos, antes mencionadas. El parámetro de la bondad del ajuste F tiene un valor de 9.669 y la significación es de 0.005. Para ver mejor el ajuste, el gráfico 4 nos muestra los valores de la IgG experimental comparados con los obtenidos por el ajuste a partir del modelo. Se puede observar que el modelo es bueno en líneas generales. No obstante, durante los períodos iniciales de la experiencia predice valores de IgG más altos que los reales, lo que podría explicarse por que en esos períodos iniciales los animales inoculados presentaban unos recuentos diferenciales de eosinófilos elevados.

En el caso de la evolución de los niveles IgM específicos, el número de predictores necesarios para explicar el comportamiento de esta variable en el tiempo post-inoculación aumenta a cuatro. En este caso son las variables diferencia en el recuento de eritrocitos, que sufren una fuerte caída en los inoculados en el momento en el que se incrementan los niveles de IgM pero que luego permanecen oscilando en torno a un valor determinado; respecto al valor hematocrito, este experimenta una disminución en los animales inoculados, los linfocitos tienen a aumentar; y por su parte, la concentración de hemoglobina sufre una fuerte disminución. El ajuste nos da un valor de F superior al anterior 24.316, lo que es de prever un mejor ajuste y una significación de 0. La ecuación 2 nos muestra la forma matemática del modelo lineal múltiple:

$$IgM_{(Unidades)} = (3.164 \pm 1.318) - (0.0000043 \pm 0) \cdot \Delta Erit + (3.633 \pm 0.583) \cdot \Delta Hemat + (2) + (0.003 \pm 0.001) \cdot \Delta Lin - (5.914 \pm 1.923) \cdot \Delta Hemog$$

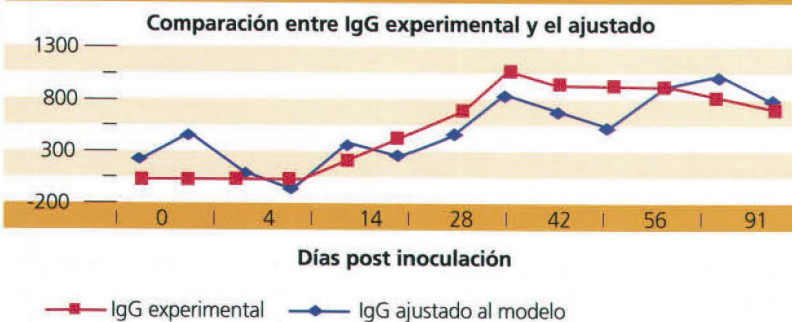
Tal y como se describió para el caso anterior el símbolo D representa la diferencia entre sujetos inoculados y no inoculados para los parámetros hemáticos: Eritrocitos, *Erit*; Hematocrito, *Hemat*; Linfocitos, *Lin*; y, finalmente, Hemoglobina, *Hemog*. El Gráfico 5, nos ilustra de una manera gráfica la bondad del ajuste.

Gráfico 3. Diferencias entre Inoculados y No Inoculados Hematocrito y Hemoglobina. Comparación con IgG e IgM.

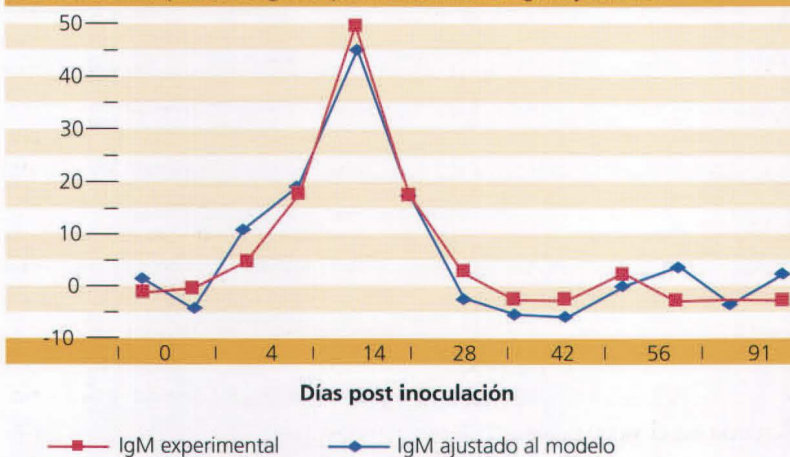


▲ Evolución de los variables hemáticas tipificados relacionados con la serie roja (Recuento de Eritrocitos, Concentración de Hemoglobina y Valor Hematocrito) y niveles séricos de IgG e IgM específicas. Así mismo se representa la tendencia de la evolución de la variable diferencia del valor hematocrito y la concentración de hemoglobina.

Gráfico 4. Comparación entre IgG experimental y el ajustado.



▲ Representación gráfica de la evolución de los niveles de IgG específicos obtenidos en condiciones experimentales y la obtenida a partir de la ecuación 1 con los predictores “diferencia del valor hematocrito” y “recuento de eosinófilos”.

Grafico 5. Comparación IgM experimental con el IgM ajustado.

▲ Representación gráfica de la evolución de los niveles de IgM específicos obtenidos en condiciones experimentales y la obtenida a partir de la ecuación 2.

Discusión

El método E.L.I.S.A., a pesar de ser una técnica muy utilizada en el diagnóstico de la Toxoplasmosis en el ganado caprino y en el establecimiento de la seroprevalencia de esta infección en distintas zonas geográficas (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 26, 27), no se ha utilizado con la misma frecuencia a la hora de analizar la evolución de los niveles de Igs específicas en el transcurso de la infección, lo que podría aportar datos interesante como los referidos a estudios comparativos entre los mismos y otros parámetros que sufren modificaciones en el curso de la infección. Es el caso del estudio comparativo entre diferentes parámetros hemáticos y la evolución en el tiempo de estos con el perfil serológico de las inmunoglobulinas G y M específicas utilizando el programa estadístico SPSS 8.0 para Windows 95 llevado a cabo en el presente trabajo.

Aunque esta forma de procesar los datos obtenidos es, en cierta medida novedosa, el empleo de la misma podría ser interesante no solo en el estudio de la Toxoplasmosis sino también en otras parasitosis, favoreciendo por lo tanto, la interpretación más en profundidad de las posibles relaciones entre la respuesta serológica y hematológica.

Con la determinación del grado de correlación entre el nivel de IgG anti-*Toxoplasma gondii* y cada una de las variables hemáticas se pretende conocer que relación guarda aquella con éstas. El rango de correlación oscila entre -1 y $+1$, siendo positivo para aquellas variables diferencia que aumentan a medida que lo hace la IgG, y negativo en caso contrario.

La evolución en el tiempo de las variables diferencia del recuento de leucocitos y del nivel de linfocitos y eosinófilos (difleuco, diflinfo, difeos) coinciden con los resultados expresados con respecto a los lotes de cabritos inoculados, detectándose por ambos métodos una tendencia al alza en los leucocitos, linfocitos y eosinófilos a lo largo de la experiencia como ocurre con los niveles de IgG específicos, además de apreciarse un descenso brusco en las tres variables entre los días 56 (difeos) y 63 (difleuco, diflinfo) con respecto al final del estudio (91 d.p.i.).

En el caso del recuento de eritrocitos, aunque se mantiene dentro del rango fisiológico y de forma estable a lo largo de la experiencia en los animales inoculados, al definir la variable diferencia, diferir, tipificarla y normalizarla, se detecta en la misma una fuerte disminución que

coincide en el tiempo con los niveles más elevados de IgM específica a los 14 d.p.i., siendo por ello uno de los predictores que se relacionan de forma más precisa con la evolución de la IgM.

Al comparar los resultados obtenidos en la concentración de hemoglobina y en el valor hematocrito en los animales inoculados con las diferencias en hemoglobina (difhemog) y las diferencias en hematocrito (difhemat) vemos que con el tratamiento estadístico se aprecia mejor la tendencia al descenso en el tiempo de ambas variables.

Bibliografía

- 1.- Berdal, B. P., Olsvik, O., Almlid, T., Larsen, H. J. y Lorentzen-Styr, A. M. (1983): *Comparison between ELISA and Dye Test for detection of naturally acquired Toxoplasma gondii antibodies in the goat*. Acta Vet. Scand.; 24: 65-73.
- 2.- Bisson, A., Maley, S., Rubaire-Akiiki, C. M. y Wastling, J. M. (2000): *The seroprevalence of antibodies to Toxoplasma gondii in domestic goats in Uganda*. Acta Trop.; 76: 33-38.
- 3.- Brinkman, V., Remington, J. S. y Sharma, S. D. (1987): *Protective immunity in toxoplasmosis: Correlation between antibody response, brain cyst formation, T-cell activation, and survival in normal and B-cell-deficient mice bearing the H-2k haplotype*. Infect. Immunol.; 55(4): 990-994.
- 4.- Calamel, M. (1984): *Calibration of ELISA and its application to epidemiological surveys of toxoplasmosis in sheep and goats*. Les maladies de la chevre. Colloque International, Niort, Francia. Les Colloques de l'INRA; 28: 169-176.
- 5.- Calamel, M. (1985): *Use of a 4-stage ELISA technique to titrate Toxoplasma reference antiserum from all animal species in comparison with the human international standard*. Revue Med. Vet.; 136: 887-895.

- 6.- Calamel, M. y Lambert, M. (1988): *ELISA standardised technique*. Publicado por: "Laboratoire National de Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles". France.
- 7.- Chen, Y. M., Li, G. D., Liu, W., Guo, Z. G., Ma, J. W. y Du, C. B. (1987): *Application of the avidin-biotin system for detecting Toxoplasma antibody*. Chinese J. Vet. Sci. Technol.; 3: 9-12.
- 8.- Chartier, C., Beziaud, E., Buzoni-Gatel, D., Bout, D., Calamel, M., Russo, P., Pepin, M., Mallereau, M-P., Lenfant, D. y Dufour, P. (1997): *Enquête séro-épidémiologique sur les avortements infectieux des caprins en région Poitou-Charentes*. Revue Méd. Vét.; 148 (6): 489-496.
- 9.- Chartier, C. y Calamel, M. (1998): *Un foyer de toxoplasmosis abortiva en élevage caprin: données épidémiologiques et diagnostiques*. Le Point Veterinaire; 29 (188): 83-87.
- 10.- Chiari, C De A. y Neves, D. P. (1984): *Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 79(3): 337-340.
- 11.- Figueiredo, J. F., Silva, D. A. O., Cabral, D. D. y Mineo, J. R. (2001): *Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlandia, Brazil*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 96(5): 687-692.
- 12.- García-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R. y Solorzano-Salgado, M. (1990): *Prevalence of antibodies against Toxoplasma gondii in sheep and goats in three states of Mexico*. Prev. Vet. Med.; 10: 25-29.
- 13.- Le Breton, S. (1991): *Contribution à l'étude des antigènes excrétés/secretés par Toxoplasma gondii impliqués dans le mécanisme d'invasion de la cellule-cible*. These présentée pour obtenir le titre de docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France).
- 14.- Lundén, A. (1994): *Toxoplasma gondii infection in sheep. Studies on epidemiology, food hygiene and vaccination*. Doctoral Thesis. Department of Veterinary Microbiology, Section of Parasitology, and the Department of Cattle and Sheep Diseases. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala (Suecia).
- 15.- Mpizaki, A. y Yantzi, N (1988): *The immunoenzyme ELISA method for detecting toxoplasmosis in sheep and goats*. 4th Hellenic Veterinary Congress, Athens. Abstracts; 185-186.
- 16.- Nishi, S. M., Kasai, N. y Gennari, S. M. (2001): *Antibody levels in goats fed Toxoplasma gondii oocysts*. J. Parasitol.; 87(2): 445-447.
- 17.- Ortega Reyes, M. D. (2001): *Seroprevalencia de la toxoplasmosis en rumiantes de abasto de la provincia de Sevilla*. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal. Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Universidad de Córdoba.
- 18.- Oz, I., Ozyer, M. y Corak, R. (1995): *Study on the prevalence of toxoplasmosis in cattle, sheep and goats in the Adana region with the ELISA and indirect haemagglutination test*. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi; 8 (1-2): 87-99.
- 19.- Patton, S., Strawbridge, S. y Puckett, K (1990): *Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies in nine populations of dairy goats: compared titers using modified direct agglutination and indirect haemagglutination*. J. Parasitol.; 76(1): 74-77.
- 20.- Van Der Puije, W. N., Bosompem, K. M., Canacoo, E. A., Wastling, J. M. y Akanmori, B. D. (2000): *The prevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in Ghanaian sheep and goats*. Acta Trop.; 76(1): 21-6.
- 21.- Riemann, H. P., Meyer, E. M., Theis, J. H., Kelso, G. y Behymer, D. E. (1975): *Toxoplasmosis in an infant fed un-pasteurized goat's milk*. J. Pediatrics; 87: 573-576.
- 22.- Riemann, H., Brooks, D. L., Behymer, D., Jainudeen, M. R., Mahyuddin, M. y Huhn, J. E. (1986): *Caprine herd health: Seroepidemiologic monitoring and clinical signs*. Livestock production and diseases in the tropics. Fifth International Conference on Livestock Production and Diseases in the Tropics held in Kuala Lumpur; 147-176.
- 23.- Rodríguez-Ponce, E., Molina, J. M. y Hernández, S. (1995): *Seroprevalence of goat toxoplasmosis on Gran Canary Island (Spain)*. Prev. Vet. Med.; 24: 229-234.
- 24.- Sacks, J. J., Roberto, R. R. y Brooks, N. E. (1982): *Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk*. J. Am. Vet. Med. Assoc.; 248 (14): 1728-1732.
- 25.- Skinner, L. J., Timperley, A. C., Wightman, D., Chatterton, J. M. W. y Ho-Yen, D. O. (1990): *Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family*. Scand. J. Infect. Dis.; 22 (3): 359-361.
- 26.- Stefanakes, A., Bizake, A. y Krambovites, E. (1995): *Serological survey of toxoplasmosis in sheep and goats on Crete*. Deltion tes ellenikes Kteniatrikes Etairias. Bulletin of the Hellenic Vet. Med. Soc.; 46 (6): 243-249.
- 27.- Vitor, R. W. A., Ferreira, A. M. Y Fux, B. (1999): *Antibody response in goats experimentally infected with Toxoplasma gondii*. Vet. Parasit.; 81: 259-263.
- 28.- Walsh, C. P., Hammond, S. E., Zajac, A. M. Y Lindsay, D. S. (1999): *Survival of Toxoplasma gondii tachyzoites in goat milk: Potential source of human toxoplasmosis*. J. Eukaryot. Microbiol.; 46(5): 73-74.