
TRABAJO FINAL

*Modelo Murino de Inmunidad contra la
Toxoplasmosis Congénita.*

*I- Datación de la Concepción por Tapón Mucoso,
Producción de Quistes, Transmisión Lactogénica y
Transmisión Crónica.*

Estudiante: *Br. Fabián Safern.*

Tutor: *Prof. Agdo. Dr. Alvaro Freyre, D.T.*

Año: *2003.*

009 TG

Modelo murino d



FV/26147



Trabajo Final.

Datos del estudiante responsable.

Nombres y Apellidos: Fabián Federico Saferm Langer.
Cédula de identidad: 3.044618-3.
Teléfono y fax: 7109118.
E-mail: ffsf@adinet.com.uy

Datos del Tutor.

Nombres y Apellidos: Alvaro Freyre Mc Call.
Teléfono y fax: 6221696. fax: 6280130.
E-mail: freyre.alvaro@hotmail.com

Datos del trabajo final.

Título: Modelo murino de inmunidad contra la toxoplasmosis congénita. Datación de la concepción por tapón mucoso, producción de quistes, transmisión lactogénica y transmisión crónica.
Duración (meses): 12
Disciplina: Veterinaria.
Subdisciplina: Parasitología.

Indice

	<u>Pag.</u>
Resumen.	1
1. Introducción.	2
2. Materiales y métodos.	3
2.1. Materiales.	3
2.1.1. Animales.	3
2.2. Método para la detección de la infección trasplacentaria (Bioensayos).	5
2.3. Método para la obtención de quistes toxoplásmicos, su numeración e infección de nuevos ratones.	5
2.4. Medidas para la protección biológica de las personas involucradas en el proyecto.	5
2.5. Experimentos.	6
2.5.1. Experimento N°1: Datación de la concepción. Determinación de la eficacia del método de detección del tapón mucoso.	6
2.5.2. Experimento N°2: Optimización de la obtención de quistes toxoplásmicos.	6
2.5.3. Experimento N°3: Interferencia de la infección lactogénica.	7
2.5.4. Experimento N°4: Transmisión congénita durante la etapa crónica de la toxoplasmosis.	7
3. Resultados.	7
3.1. Experimento N°1.	7
3.2. Experimento N°2.	8
3.3. Experimento N°3.	8
3.4. Experimento N°4.	8
4. Discusión.	12
5. Conclusiones.	13
Referencias.	14

Resumen.

Para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita, es necesario contar con modelos animales. En el presente trabajo, se efectuaron diversos experimentos para refinar un modelo murino.

El primer experimento que se realizó, consistió en hallar un método que permitiera la datación de la gestación de las ratonas. El método analizado consistió en la visualización del tapón mucoso (vaginal). No resultó útil para la datación de la gestación, al contrario de lo afirmado por otros autores. Subsiste la necesidad de encontrar un método eficaz para la datación de la gestación.

Respecto a la producción de quistes cerebrales en ratones DM2 y C57 con infección toxoplásmica crónica, necesarios para realizar las infecciones experimentales, surgió que las combinaciones más favorables cuando se necesitan dadores con gran cantidad de quistes son de 4 quistes en DM2 o 35 quistes en C57. En cambio, cuando se necesita disponibilidad de ratones para inoculación en sucesivos días, conviene más utilizar ratones de la raza C57 inoculados con dosis más bajas de quistes toxoplásmicos.

Un diseño experimental de la toxoplasmosis congénita en ratones Balb/c, comprendiendo el uso de madres adoptivas, como fue efectuado por otros investigadores, resultó impracticable en nuestras manos. Esto se debió a que 9 de 13 madres canibalizaron a los neonatos que les fueron ofrecidos para anodrirar. Por lo tanto, no se pudo así concluir si la transmisión lactogénica puede interferir con la interpretación de los resultados de la transmisión congénita.

La tasa de transmisión de *Toxoplasma* de una madre con una infección crónica de *Toxoplasma* a sus fetos, es muy baja. Esto confirma los resultados de otros investigadores, y viabiliza el modelo murino de toxoplasmosis.

1. Introducción.

La rata ha sido la especie de elección para el modelo de la toxoplasmosis congénita, a consecuencia de la similitud de su resistencia a la toxoplasmosis, con la de los humanos. (Dubey y Shen, 1991; Zenner et al, 1993, 1999; Freyre et al, 2001, 2003).

Es importante además, contar con más de un modelo para testar inmunógenos, ya que ha sido encontrado repetidamente que diferentes especies animales tienen respuestas inmunes divergentes al mismo inmunógeno (Gupta y Siber, 1995). En este sentido, para este propósito se testaron otras especies, particularmente los ratones Balb/c (Roberts y Alexander, 1992; Roberts et al, 1994; Thouvenin et al, 1997; Elsaid et al, 2001).

Sin embargo, el modelo murino se halla todavía lejos de su consolidación. Así, es todavía necesario un método con alta eficacia para la datación de la concepción. Este es un punto importante en la metodología, ya que la transmisión de una infección toxoplásmica es más frecuente cuando la inoculación con bradizoítos es llevada a cabo dentro de los días 10-15 de gestación (Roberts y Alexander, 1992; Roberts et al, 1994; Elsaid et al, 2001). También es necesario investigar la transmisión lactogénica de *Toxoplasma* durante la etapa aguda de la infección. Esta clase de transmisión podría entorpecer la interpretación de los resultados de transmisión congénita de futuros experimentos. Asimismo, conviene ampliar los antecedentes experimentales existentes, en el sentido de determinar si existe transmisión congénita de *Toxoplasma* durante la etapa crónica de la infección. Esta circunstancia podría ser inconveniente cuando se usan inmunizaciones prototípicas con *Toxoplasma* antes de la gestación, transcurriendo el estado crónico durante la preñez. El eventual pasaje congénito de toxoplasmas utilizados para inmunizar, en vez de los zoítos usados para desafiar, claramente oscurecería la interpretación de los resultados. También se hace necesario optimizar las cantidades de quistes toxoplásmicos que se obtienen por cada ratón al que se le ha inducido una infección toxoplásmica crónica. Estos quistes son necesarios para la inmunización y/o el desafío de animales en el modelo de toxoplasmosis congénita en el ratón.

De acuerdo a lo expresado, el **objetivo general** del presente trabajo fué optimizar el modelo ratón para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita.

Los **objetivos particulares** fueron: **1.** Determinar la eficacia del método del tapón mucoso, para la datación de la concepción en la ratona. **2.** Optimizar la obtención de dadores crónicos de quistes de *Toxoplasma*. **3.** Indagar la transmisión lactogénica de *Toxoplasma* durante la etapa aguda de la infección. **4.** Investigar la transmisión congénita durante la etapa crónica de la infección.

2. Materiales y métodos.

2.1. Materiales.

2.1.1. Animales.

Se utilizaron ratones Balb/c ByJ (y ocasionalmente la raza AJ) de 18 gramos para los experimentos de transmisión de la toxoplasmosis; ratones Balb/c DM2 y C57 J/BL6 de 18 gramos para los experimentos de producción de quistes toxoplásmicos y ratones CF-1 de 20 gramos para los bioensayos respectivamente. Se importaron del Laboratorio Jackson, Main Harbor, Michigan. Los ratones Balb/c ByJ fueron elegidos a causa de resultados favorables en experimentos previos de toxoplasmosis congénita con ellos (Roberts y Alexander, 1992; Roberts et al 1994; Thouvenin et al, 1997; Fux et al, 2000; Elsaid et al, 2001). Los ratones AJ fueron seleccionados por su resistencia a la toxoplasmosis. Los ratones Balb/c DM2 y C57 J/BL6 fueron elegidos por su mayor susceptibilidad a la toxoplasmosis.

Se enjaularon juntos, ratones Balb/c ByJ, hembras y machos (4:1), para aparearse. Cuando se detectaba que una hembra estaba preñada, era enjaulada individualmente en una caja con un piso hecho de alambres de 2 mm de diámetro con una separación de 6 mm, y suspendida a una altura de 3 cm desde el fondo de la caja, para que los recién nacidos fueran automáticamente separados de su madre al momento del parto,

previniendo así cualquier transmisión lactogénica de la toxoplasmosis. Estas cajas fueron denominadas "cajas de parición".

Los ratones se alojaron en condiciones de aislamiento que permitieron asegurar una mínima carga microbiana, mediante la esterilización de jaulas, tapas de jaulas, bebederos, camas y ración. Se utilizó agua corriente hervida para los bebederos. También contaron con condiciones de humedad (50%) y temperatura (20°C) controladas. Fueron alojados en un recinto separado del bioterio general. Se empleó cambio de calzado y túnica para el ingreso al mismo.

Los ratones recibieron un suplemento polivitamínico (Dayamineral, Laboratorios ABBOT), 0.5 ml de la presentación jarabe, por litro de agua corriente hervida. En instancias posteriores, este suplemento se integró por aspersion a la ración.

Los ratones estaban libres de infección toxoplásmica, lo que fué comprobado con la reacción de aglutinación directa (AD) para toxoplasmosis de Desmonts y Remington (1980).

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

Toxoplasma.

Se utilizó la cepa Prugniaud de *Toxoplasma* en los experimentos para inmunización y para desafío. Elegimos esta cepa porque otros autores (Zenner et al, 1993, 1999; Freyre et al, 2001, 2003) ya la habían usado en experimentos de transmisión congénita en la rata; además, esta cepa se mostró adecuada en experimentos previos no publicados del Laboratorio de Toxoplasmosis, en ratones Balb/c.



2.2 Método para la detección de la infección trasplacentaria (Bioensayos).

Una vez nacidas las camadas, los recién nacidos fueron sacrificados por dislocación cervical. Se utilizó los fetos de la mitad de las camadas que tuvieron ocho o más fetos, y de toda la camada si tuvieron menos de ocho fetos. Se homogeneizaron en PBS y 1000 UI de penicilina y 0,1 mg de estreptomicina por ml en un homogeneizador de laboratorio, de aspas. Los homogeneizados se inocularon i.p. en 2 a 4 ratones por camada. Al cabo de 30 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de aglutinación directa (AD) en el suero de los ratones. Se consideró que los fetos estuvieron protegidos, cuando las subinoculaciones de tejidos de recién nacidos resultaron negativas para *Toxoplasma*.

2.3 Método para la obtención de quistes toxoplásmicos, su numeración e infección de nuevos ratones.

El método para obtener los quistes cerebrales fue el descrito por Freyre et al (2001). Se procedió a la apertura de la bóveda craneana de un ratón al que se le indujo previamente una infección toxoplásmica crónica, y se extrajo una pequeña muestra (1/20) de su cerebro. Dicha muestra se colocó sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, realizando así un aplastado. Se observó al microscopio a 200 x la presencia o ausencia de quistes toxoplásmicos. Si se encontraban suficientes quistes (=5 o más) se procedía a homogeneizar ese cerebro en jeringa con 1 cc de solución de PBS. A partir de ese homogeneizado se tomó una alícuota con pipeta automática de 25 microlitros, y se procedió a contar al microscopio la cantidad de quistes contenidos en ese volumen.

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

Se aplicaron escrupulosamente las directivas de la Organización Mundial de la Salud para la salvaguardia de las personas involucradas en el presente proyecto de trabajo, contra el

riesgo de infección toxoplásmica (Organización Mundial de la Salud. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 1994), así como las Normas de Bioseguridad del Laboratorio de Toxoplasmosis (Dpto. Parasitología, Fac. de Veterinaria de Montevideo).

2.5. Experimentos.

2.5.1. Experimento N°1: Datación de la concepción.

Determinación de la eficacia del método de detección del tapón mucoso.

Se utilizó el método de la detección del tapón mucoso o tapón vaginal para la datación de la gestación. Este método se basó en la afirmación que el tapón vaginal es un indicador de apareamiento (Foster et al, 1983). Se alojaron ratonas y machos juntos en relación 4:1. Se inspeccionó la presencia del tapón vaginal cada 12 horas. Luego que se confirmó la monta por el método precedente, se alojó las hembras individualmente en cajas separadas, y se registró el parto.

2.5.2. Experimento N°2: Optimización de la obtención de quistes toxoplásmicos.

La estrategia de este experimento consistió en determinar la mayor dosis de quistes de *Toxoplasma* que, suministrada por vía intraperitoneal a los ratones, originara la mayor cantidad de quistes cerebrales. También era necesaria la sobrevivencia de la mayor cantidad de ratones durante los 30 días subsecuentes, plazo razonable para que exista disponibilidad de ratones dadores de quistes. Se comenzó por dosis de 4 quistes por ratón por vía intraperitoneal, y se fue aumentando en sucesivos experimentos. Se midió y comparó estos resultados en ratones Balb/c DM2 y C57 J/BL6.

2.5.3. Experimento N°3: Interferencia de la infección lactogénica.

Se alojaron ratonas Balb/c con un macho (4:1). A los 12 días de gestación, fueron inoculadas por boca con 10^3 o 10^4 bradizoítos de la cepa Prugniaud de *Toxoplasma*, y alojadas individualmente en cajas de parición. Los recién nacidos se bioensayaron y reemplazaron por recién nacidos de una madre no inoculada. Los recién nacidos anodrizados se bioensayaron 3 días después. Este será el lapso que podrían quedar lactando los recién nacidos antes de ser subinoculados, si la infección lactogénica no interfiriera. Esta dilación permitiría mayor comodidad de trabajo durante la semana. En especial, permitiría sortear la inoculación de recién nacidos en fines de semana.

2.5.4. Experimento N°4: Transmisión congénita durante la etapa crónica de la toxoplasmosis.

Las hembras Balb/c fueron inoculadas por boca con 10^4 bradizoítos de la cepa Prugniaud de *Toxoplasma*. Cuarenta y cinco días después, fueron alojadas con un macho (4:1). Cuando estaban preñadas, eran alojadas individualmente en cajas de parición. Los recién nacidos se bioensayaban en ratones, inmediatamente luego del nacimiento.

3. Resultados.

3.1. Experimento N°1.

Treinta ratonas Balb/c se examinaron por el método del tapón mucoso. El mismo permitió la detección de la gestación en el 30% de ellas. En las hembras restantes, la presencia de un tapón mucoso no fue seguida de gestación. El veinte por ciento de los tapones mucosos se observaron solamente en una de las dos inspecciones diarias. Cuatro de cinco ratonas AJ presentaron tapones mucosos, y resultaron subsecuentemente preñadas.

3.2. Experimento N°2.

Los resultados del experimento: "Optimización de la obtención de quistes toxoplásmicos", están resumidos en la tabla 1. Se obtuvo una buena producción de quistes cerebrales (100 a 300 quistes por ratón) en todas las ocasiones, y muy buena producción de quistes (más de 300 quistes por ratón) en 2 de las combinaciones de razas y dosis efectuadas.

3.3. Experimento N°3.

Los resultados del experimento: "Interferencia de la infección lactogénica", están resumidos en la Tabla 2. Los neonatos de las madres no infectadas fueron anodrizados solamente por 4 de las 13 madres en lactación infectadas con *Toxoplasma*. Ninguna de ellas transmitió *Toxoplasma* por la leche, a los cachorros adoptivos, aunque 2 de ellas transmitieron la infección a sus fetos, vía trasplacentaria. Las 9 madres restantes canibalizaron a los neonatos que les fueron ofrecidos para anodrizar.

3.4. Experimento N°4.

Los resultados del Experimento: "Transmisión congénita durante la etapa crónica de la toxoplasmosis", están resumidos en la Tabla 3. Se puede apreciar que hubo transmisión de *Toxoplasma* durante la etapa crónica de la infección en 2 de 10 camadas. Debe destacarse además, que ocurrieron mortinatos en 4 de 8 camadas, de las cuales *Toxoplasma* no fue aislado.

Tabla 1.

Experimento 2. Optimización de la Obtención de quistes toxoplásmicos.

<u>Raza</u>	<u>Nº inoc.</u> (1)	<u>Dosis</u> (2)	<u>Salud</u> (4)	<u>Quistes</u> (3)	<u>Sobreviven</u>	<u>%Sobrv.</u>	<u>Días de sobrev.</u>
DM2	7 M	4	R	MB	2	28	38
DM2	11 H	4	B	B	5	82	38
C 57	5 M	8	B	B	4	80	81
C 57	3 H	10	B	B	2	67	44
C 57	19 M	35	R	MB	4	21	81

(1) M: machos, H: hembras.

(2) Nº de quistes administrados vía i.p por ratón.

(3) B: 100 a 300 quistes por ratón. MB: más de 300 quistes por ratón.

(4) Efecto de *Toxoplasma* sobre la salud de los ratones inoculados que sobrevivieron.

Tabla 2.

Experimento N°3. Transmisiones congénita y lactogénica de una infección toxoplásmica en ratonas Balb/c, iniciada por inoculación oral con dosis precisas de bradizoítos, 12 días posconcepción.

Ratona	Dosis de bradizoítos	<u>Resultados en los neonatos.</u>			
		<u>Neonatos vivos</u>	<u>Neonatos muertos</u>	<u>Transmisión congénita</u> ^{(1) (5)}	<u>Transmisión lactogénica</u> ^{(1) (6)}
1	10 ³	6	0	-	-
2	10 ³	7	2	+	-
3	10 ³	2	2	-	-
4	10 ³	5	0	-	na ⁽⁴⁾
5	10 ³	2	6	+	na
6	10 ³	6	1	+	na
7	10 ³	5	0	-	nh ⁽³⁾
8	10 ³	6	0	-	nh
9	10 ³	7	2	+	nh
10	10 ³	2	6	+	nh
11	10 ⁴	3	0	+	-
12	10 ⁴	3	3	nr	na
13	10 ⁴	0	2	+	na
14	10 ⁴	nr ⁽²⁾	nr	-	na
15	10 ⁴	nr	nr	-	na
16	10 ⁴	4	0	-	na
17	10 ⁴	1	1	-	na

⁽¹⁾ Resultados de aglutinación directa de ratones utilizados para el bioensayo de neonatos.

⁽²⁾ No registrado.

⁽³⁾ No hecho.

⁽⁴⁾ No anodrizados.

⁽⁵⁾ Neonatos nacidos de madres inoculadas con *Toxoplasma*.

⁽⁶⁾ Neonatos nacidos de madres no inoculadas, anodrizados durante 3 días por madres inoculadas.

Tabla 3.

Experimento N°4. Transmisión congénita de una infección toxoplásmica en ratonas Balb/c, por inoculación oral con 10⁴ bradizoítos de la cepa Prugniaud de Toxoplasma efectuada 45 días antes de la concepción.

<u>Ratona</u> <u>N°</u>	<u>Neonatos</u>		<u>Resultado</u> ⁽¹⁾
	<u>vivos</u>	<u>muer</u> tos	
1	nr ⁽²⁾	nr	+
2	2	2	-
3	nr	nr	-
4	0	4	-
5	3	0	-
6	0	3	-
7	4	0	-
8	0	3	-
9	4	0	-
10	6	0	+



⁽¹⁾ Resultados de aglutinación directa de ratones utilizados para el bioensayo de neonatos.

⁽²⁾ No registrado.

4. Discusión.

El método del tapón mucoso para la datación de la concepción no fue útil. Este método no permitió una cantidad apreciable de detecciones de gestaciones de 12 días de duración, sino que además condujo a errores diagnósticos de gestación. Este es además un método invasivo, una característica importante cuando se manejan cepas endogámicas de ratones. Es necesario continuar investigando para resolver este diagnóstico eficientemente.

Respecto a la producción de quistes en ratones con infección crónica, se obtuvo cuando menos buena producción de quistes en todas las combinaciones de razas y dosis infectantes. Las combinaciones más productivas fueron dosis de 4 quistes en ratones DM2, de los que sobrevivieron 28% durante 38 días, y dosis de 35 quistes en ratones C57, de los que sobrevivieron 21% durante 81 días. En particular en la raza C57 se advirtió la relación directa entre la dosis infectante y el porcentaje de ratones que sobrevivieron. Como conclusión, cuando la necesidad de quistes para inocular es muy grande, convienen las últimas combinaciones mencionadas. Por el contrario, cuando existe la necesidad de repetidas inoculaciones en distintos días, resultan más adecuadas las dosis infectantes menores, que aseguran mayor porcentaje de ratones sobrevivientes, durante períodos más prolongados.

Aunque la **transmisión lactogénica de *Toxoplasma*** fue negativa en cuatro madres, dos de las cuales transmitieron congénitamente la infección a su propia descendencia, estos resultados no pueden considerarse concluyentes, debido a que se investigó un bajo número de ratonas. El anodrizamiento en ratonas Balb/c resultó ser extremadamente difícil, aún cuando los neonatos fueron empapados con gotas de la orina de la futura madre adoptiva; por lo tanto, el experimento fue descontinuado. Esto confirma además, la dificultad para ejecutar el diseño experimental de Roberts y Alexander (1992) y de Elsaid et al (2001), involucrando el anodrizamiento de los fetos recién nacidos por madres no infectadas, para prevenir la transmisión lactogénica, y la mayor practicidad del método de la jaula con piso falso en el presente estudio.

Es importante testar la **transmisión de *Toxoplasma* en el modelo ratón, durante la etapa crónica de la infección**, para que se puedan ejecutar ensayos de protección prototípica usando *Toxoplasma* vivo como inmunógeno. Este aspecto fue previamente investigado por Roberts y Alexander (1992). Ellos no encontraron transmisión o mortinatos. Además, Fux et al (2000) observaron hipertrofia del endometrio y del miometrio en ratonas Balb/c inoculadas con *Toxoplasma* antes de la concepción, y sólo 2 de 49 hembras parieron. No se observó transmisión congénita. Las divergencias con el presente trabajo (transmisión 20%) se deben probablemente al hecho de que fueron utilizadas diferentes cepas de *Toxoplasma*. No pensamos que un 20% de transmisión de *Toxoplasma* sea un impedimento para el modelo ratón, siempre que se usen controles apropiados en futuros experimentos.

5. Conclusiones.

En conclusión, en el presente trabajo, hemos encontrado en el modelo ratón, que la transmisión de la infección crónica durante la gestación sucede en una escala tan moderada que no interfiere mayormente los resultados finales. Todavía no hemos podido definir un método eficaz para la datación de la gestación de la ratona. Según otros autores, no sucede la infección lactogénica en ratones balb/c infectados con *Toxoplasma*, pero nosotros no hemos podido comprobar ese extremo. Se determinó además, la mejor combinación de razas de ratones y dosis de *Toxoplasma* para obtener quistes del parásito, según las distintas necesidades. Es necesario continuar las investigaciones para consolidar el modelo murino de toxoplasmosis.

Referencias.

Desmonts G, Remington JJ. Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection. Methods for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol, 11: 562-568,1980.

Dubey JP, Frenkel JK. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. J. Parasitol, 59(3): 505-512, 1973.

Dubey JP, Shen K. Rat model of congenital toxoplasmosis. Infect Immun 59: 3301-3302, 1991.

Elsaid M, Martins M, Frézard F, Braga, EM, Vitor, RWA. Vertical Toxoplasmosis in a Murine Model. Protection after Immunization with Antigens of *Toxoplasma gondii* Incorporated into Liposomes. Mem Inst Oswaldo Cruz; 96: 99-104, 2001.

Foster HL, Small J, Fox JG. The mouse in biomedical research. Vol III. p. 151,1983, Academic Press Inc, London.

Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. Parasitology Res, 87: 915-918, 2001

Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J. Fetal *Toxoplasma* infection after oocysts inoculation of pregnant rats. Parasitology Res, 89 (5): 352-3, 2003.

Fux B, Ferreira AM, Cassali GD, Tafuri, WL, Vitor RWA. Experimental Toxoplasmosis in Balb/c Mice. Prevention of Vertical Disease Transmission by Treatment and Reproductive Failure in Chronic Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 121-26, 2000.

Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13: 1263-76,1995.

Roberts CW, Alexander J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in Balb/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology* 104, 19-23, (1992).

Roberts CW, Brewer JM, Alexander J. Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: Prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine*; 12: 1389-94. 1994.

Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Klein JP, Kient T. Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are Type-2 dependent. *Parassitologia* 39: 279-283,1997.

Zenner L, Darcy F, Cesbron- Delaw M, Capron A. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma* strains to fetuses and protective effects of a chronic infection. *Infect Immun* 61: 360-363,1993.

Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delaw M. Protective immunity on the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasit Immunol* 21: 261-272, 1999.

