

Infectio

Asociación Colombiana de Infectología

www.elsevier.es/infectio



ORIGINAL

Aislamiento de *Toxoplasma gondii* a partir de líquido cefalorraquídeo de dos pacientes VIH positivos

Liliana Jazmín Cortés*, Adriana Arévalo y Sofía Duque

Grupo de Parasitología, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia

Recibido el 20 de octubre de 2012; aceptado el 2 de septiembre de 2013

PALABRAS CLAVE

Toxoplasmosis;
Virus de
inmunodeficiencia
humano;
Modelo animal;
Líquido
cefalorraquídeo;
Aislamiento;
Colombia

Resumen

Introducción: El aislamiento de *T. gondii* a partir de líquido cefalorraquídeo permite el diagnóstico confirmatorio de toxoplasmosis cerebral, considerada la segunda infección oportunistas más importante en pacientes VIH positivos.

Objetivo: Aislar *Toxoplasma gondii* a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo de dos pacientes VIH positivos con toxoplasmosis cerebral.

Materiales y métodos: Se realizó la inoculación intraperitoneal del sedimento de LCR de dos pacientes VIH positivos con toxoplasmosis cerebral en ratones ICR, se llevaron a cabo 5 pases sucesivos ciegos hasta la observación de taquizoítos de *T. gondii* en el exudado peritoneal mediante examen directo y coloración de extendidos con Romanowsky modificado.

Resultados: A los 43 días los 4 ratones de trabajo presentaron piloerección, hepato-esplenomegalia, letargia y en el exudado peritoneal se observaron taquizoítos de *T. gondii*, hallazgo que fue confirmado al examinar los extendidos coloreados con Romanowsky modificado. Estos aislamientos fueron crioconservados y fue confirmada la viabilidad poscongelamiento de los mismos.

Conclusiones: A pesar de que las técnicas de detección directa de *T. gondii* en LCR tienen una baja sensibilidad (38%) el presente trabajo permitió obtener dos aislamientos de *T. gondii* de dos pacientes VIH positivos con toxoplasmosis cerebral.

© 2013 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jcortes@ns.gov.co (L.J. Cortes).

KEYWORDS:

Toxoplasmosis;
Human
Immunodeficiency
Virus;
Animal model;
Cerebrospinal fluid;
Isolation;
Colombia

Isolation of *Toxoplasma gondii* from cerebrospinal fluid of two human immunodeficiency virus-seropositive patients

Abstract

Background: Isolation of *T. gondii* from cerebrospinal fluid enables confirmatory diagnosis of cerebral toxoplasmosis, considered the second most important opportunistic infection in HIV-positive patients.

Objective: To isolate *Toxoplasma gondii* from samples of cerebrospinal fluid from 2 HIV-positive patients with cerebral toxoplasmosis.

Materials and methods: Imprinting control region (ICR) mice were intraperitoneally inoculated with CSF sediment from 2 HIV-positive patients with cerebral toxoplasmosis. Five of the inoculations were performed blind to successive passes. *T. gondii* tachyzoites were observed in these 5 inoculations in the peritoneal exudate through direct examination of the modified-Romanowsky-stained smears.

Results: After 43 days, 4 mice showed piloerection, hepatosplenomegaly and lethargy. The peritoneal exudate exhibited *T. gondii* tachyzoites, a finding that was confirmed by examining the modified-Romanowsky-stained smears. These isolates were cryopreserved and their viability was confirmed after freezing.

Conclusions: Although direct detection techniques of *T. gondii* in CSF have low sensitivity (38%), this study was able to yield 2 *T. gondii* isolates in 2 HIV-positive patients with cerebral toxoplasmosis.

© 2012 ACIN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Según cifras de la Organización Mundial de la Salud, 34 millones de personas viven con el VIH/ SDA en el mundo; en Colombia para el 2007 se reportaron 170.000 personas entre adultos y niños viviendo con el VIH^{1,2}, quienes son afectados por infecciones oportunistas, dentro de estas se encuentra la toxoplasmosis cerebral (TC), segunda infección más común que afecta el sistema nervioso central (SNC) en pacientes infectados por VIH³. En nuestro país, estudios relacionados con TC y VIH como el de Silva et al.⁴ describen 27 casos de encefalitis durante los primeros años de la epidemia en Bogotá registrada entre 1988 y 1993. Otro estudio como el de Corral et al.⁵ describe 33 casos presentados entre 1988 y 1994 en Cali. Es importante resaltar que el riesgo de desarrollar TC oscila entre 30-40% en los pacientes con anticuerpos frente a *Toxoplasma gondii*⁶ (60% de pacientes VIH positivos), por lo que en Colombia se pueden esperar entre nueve a doce mil casos de TC³ cuyo diagnóstico es difícil sin el uso de técnicas invasivas, lo que ha llevado a la práctica de la terapéutica presuntiva basada en hallazgos clínicos y radiológicos y su confirmación en la respuesta favorable a estos⁷. Sin embargo, el diagnóstico parasitológico definitivo se debe realizar evidenciando la presencia del parásito, por lo que el aislamiento de *T. gondii* a partir de cualquier muestra biológica contribuye a confirmar la infección activa⁸.

Para el aislamiento de *T. gondii* a partir de tejidos o fluidos corporales, la inoculación en ratones ha sido considerada como el método más sensible, en comparación con el cultivo celular e inoculación en embriones de pollo⁹. El objetivo de esta comunicación breve es documentar el aislamiento de dos cepas de *T. gondii* a partir de pacientes con VIH y diagnosticados por hallazgos clínicos y

paraclínicos con TC, ya que en Colombia se han reportado muy pocos aislamientos de *T. gondii* a partir de muestras biológicas¹⁰.

Materiales y métodos

Muestras biológicas

Se obtuvo líquido cefalorraquídeo (LCR) de dos pacientes VIH positivos con toxoplasmosis cerebral (previo consentimiento informado de los pacientes y autorización de uso de muestras biológicas en estudios posteriores) y cuyas pruebas serológicas (inmunofluorescencia indirecta, IFI) fueron positivas con títulos de anticuerpos IgG frente a *T. gondii* de 1/2.048 y 1/4.096, respectivamente (el resultado se considera positivo a partir de 1/16).

Obtención del aislamiento clínico "in vivo"

Se centrifugó el LCR de cada paciente a 1.000 rpm durante 15-20 minutos con el fin de concentrar los parásitos, en caso de que se encontraran presentes en la muestra. Se eliminó el sobrenadante y a partir del sedimento se realizó observación directa en microscopio de luz (400x), elaboración de frotis a partir del sedimento y coloración del mismo con Romanowsky modificado e inoculación del sedimento en ratones cepa ICR-CD1.

Animales

Se utilizaron ratones machos ICR-CD1, colonia no consanguínea, nombre científico: *Mus musculus*, status sanitario: convencional, origen: Centre Anticancereux Romand. Dr. De Coulon. Lausanne-Suiza, procedencia: Charles River

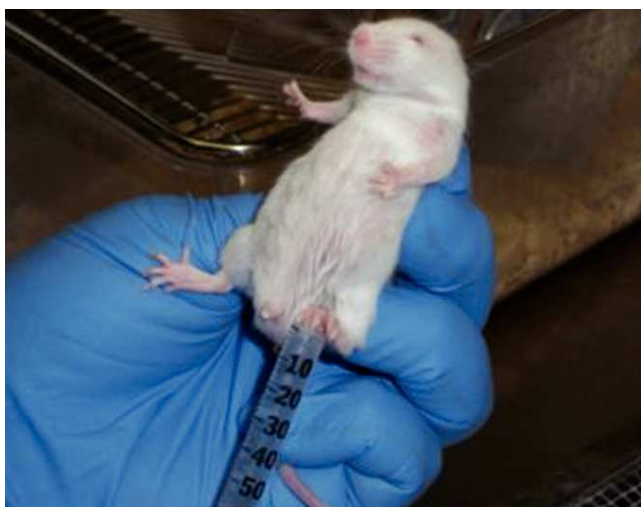


Figura 1 Inoculación intraperitoneal de ratón ICR-CD1 con sedimento de LCR de los pacientes estudio.

Laboratories. EE. UU., CrI: CD-1(ICR) BR, color: blanco (albino), de 20 días de edad suministrados por el Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

Inoculación en ratón

Se siguieron las normas para el cuidado y uso de animales^{11,12} para el aislamiento de *T. gondii* y se tuvieron en cuenta todas las normas de bioseguridad para el manejo

de muestras biológicas, lo que incluye el empleo de los elementos de protección personal, la aplicación de los esquemas de vacunación fundamentales y la adecuada eliminación de material contaminado. Se inoculó los ratones ICR vía intraperitoneal (fig. 1) con 0,4 ml del sedimento obtenido luego de centrifugar el LCR (2 ratones por cada muestra y 1 ratón control sin inocular). Se observaron los ratones inoculados durante 2 semanas, tiempo en el cual no se presentó ninguna sintomatología compatible con infección. Al cabo de este tiempo los 6 ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂, se hizo extracción de exudado peritoneal con 2 ml de solución salina estéril (fig. 2) y este se concentró por centrifugación a 1.000 rpm por 15-20 minutos para su observación directa, elaboración y coloración de frotis con Romanovsky modificado e inoculación haciendo pase en ciego a otros 6 ratones. A partir de este material se realizaron 5 pases sucesivos (6 ratones por pase), hasta la positivización (presencia de taquizoítos de *T. gondii*).

Preservación de los aislamientos de *Toxoplasma gondii*

Se realizó el mantenimiento de los aislamientos parasitarios a través de pases sucesivos en ratones de la cepa ICR durante 6 meses después de los cuales se crioconservaron en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. La viabilidad poscongelamiento de los aislamientos se confirmó realizando pases sucesivos en ratón a los 10, 40 y 270 días siguientes a la crioconservación¹³.

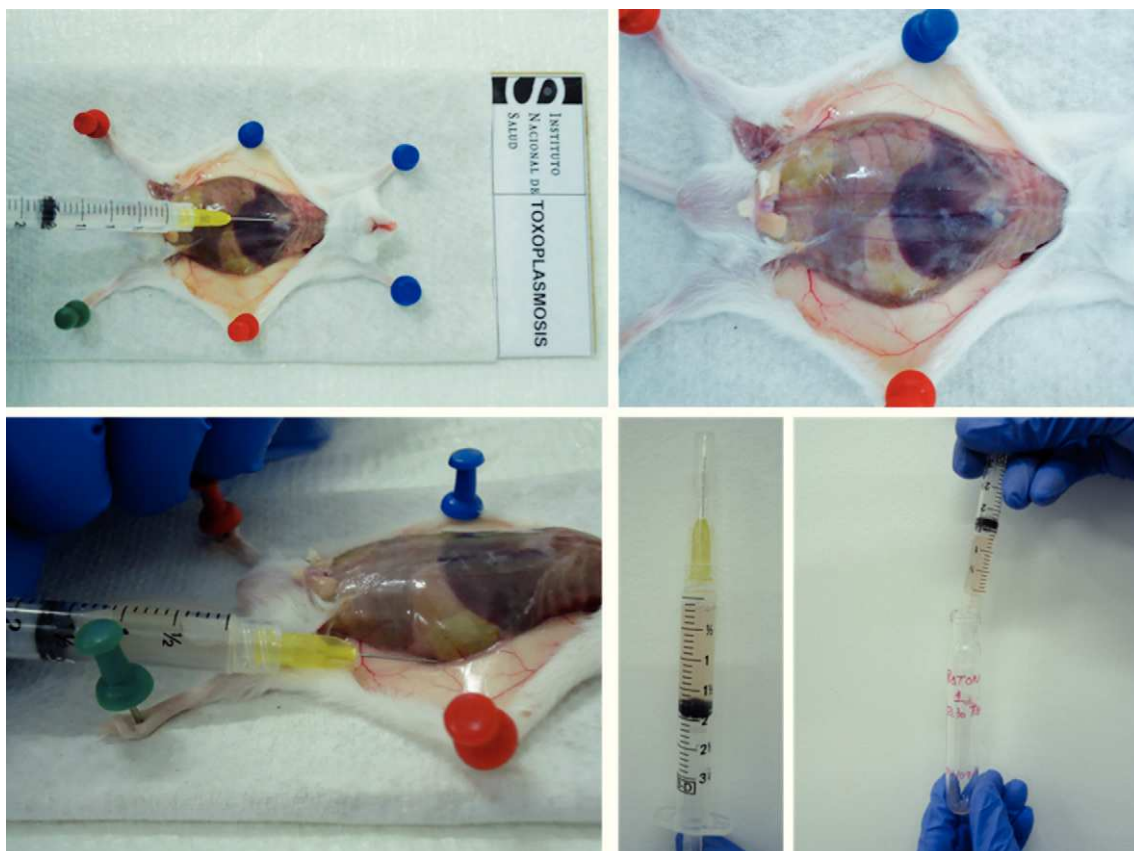


Figura 2 Extracción del exudado peritoneal de ratón ICR-CD1 inoculado con sedimento de LCR de pacientes de estudio.



Figura 3 Izquierda: ratón control ICR-CD1. Derecha: ratón ICR-CD1 de trabajo con piloerección, hepato-esplenomegalia y letargia.

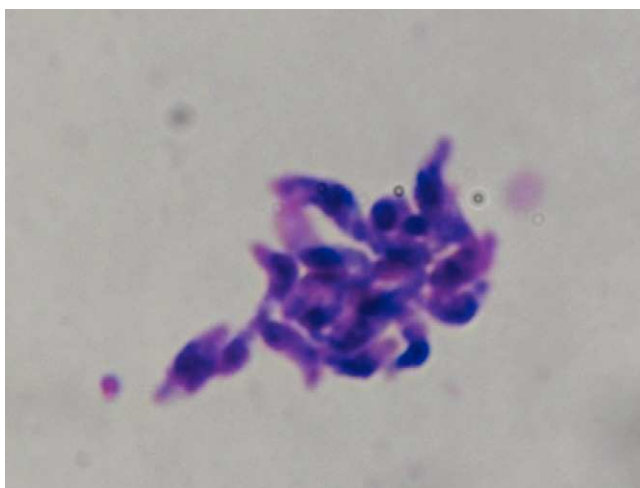


Figura 4 Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, coloración de Romanowsky modificado.

Resultados

Observación del sedimento de líquido cefalorraquídeo

Al realizar la observación directa en microscopio de luz (400x) del sedimento de LCR de cada paciente no se observó ninguna forma parasitaria compatible con *T. gondii*, igual hallazgo se encontró al examinar en microscopio de luz (1.000x) los frotis coloreados con Romanowsky modificado.

Inoculación en ratón

Los ratones inoculados con el sedimento de LCR de los pacientes no presentaron ninguna sintomatología compatible con infección toxoplásmica como piloerección, ataxia del tren posterior, hepato-esplenomegalia, letargia ni diarrea (fig. 3), durante las dos primeras semanas que fueron observados, al igual que los ratones control. Luego de los 5 pases ciegos sucesivos, a los 43 días los 2 ratones control continuaron sin presentar ninguna sintomatología, pero los 4 ratones de trabajo presentaron piloerección, hepato-esplenomegalia, letargia y en el exudado peritoneal se observaron taquizoítos de *T. gondii* sin que se observaran en el exudado de los ratones control, hallazgo que fue

confirmado al examinar los extendidos coloreados con Romanowsky modificado (fig. 4).

Preservación de los aislamientos de *Toxoplasma gondii*

Los ratones ICR inoculados con los aislamientos parasitarios obtenidos presentaron sintomatología clínica compatible con toxoplasmosis a los 3-5 días luego de inoculación intraperitoneal, el exudado peritoneal obtenido fue observado en directo en microscopio de luz (400x) evidenciándose la presencia de taquizoítos de *T. gondii*. Los ratones ICR inoculados para la confirmación de la viabilidad poscongelamiento presentaron síntomas compatibles con toxoplasmosis como hepato-esplenomegalia, piloerección y letargia luego de 8-10 días de inoculación, el exudado peritoneal obtenido a partir de estos ratones fue observado en directo en microscopio de luz (400x) evidenciándose la presencia de taquizoítos de *T. gondii*.

Discusión

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que infecta a vertebrados de sangre caliente y se estima que una tercera parte de la población humana global está crónicamente infectada. La infección inicial ocurre oralmente tras la ingestión de ooquistes o quistes tisulares que se transforman en taquizoítos, los cuales se diseminan ampliamente en el organismo, tras el establecimiento de la respuesta inmune del huésped ocurre la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto en sistemas y órganos específicos como el sistema nervioso central, resultando una infección asintomática crónica; en individuos con inmunodeficiencias como SIDA o con tratamientos inmunosupresivos prolongados como en el caso de trasplantes, la reactivación de la infección puede llevar a una encefalitis toxoplásmica letal¹⁴.

Por lo general la afección del Sistema Nervioso Central (SNC) por *T. gondii* se considera una reactivación de una infección crónica latente que se presenta con frecuencia en pacientes con diagnóstico de SIDA pero en algunos casos es la primera manifestación de este síndrome¹⁵⁻¹⁷. Los protocolos de diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA varían dependiendo de las características clínicas del paciente y de las herramientas tecnológicas con las que se cuenta¹⁸; sin embargo, esta infección es

generalmente letal si el paciente no recibe el tratamiento en forma adecuada y oportuna, por lo que es fundamental un diagnóstico oportuno y confiable basado en hallazgos clínicos y radiológicos¹⁹, teniendo en cuenta que para obtener un diagnóstico de certeza se necesitan pruebas que permitan demostrar en forma directa la presencia del parásito en cerebro (biopsia), o en muestras biológicas (LCR, sangre) a través de cultivos celulares que permiten obtener taquizoítos viables y con la pureza deseable, los cuales son una fuente de parásitos con máximo rendimiento y mínima contaminación de las células del huésped²⁰, de inoculación en animales, técnica más sensible que el cultivo celular⁹ o con la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) en la cual se amplifica el ADN del parásito lográndose una alta sensibilidad (50-65%) y especificidad (95-100%); lamentablemente la falta de laboratorios preparados para realizar estas técnicas y sus altos costos pueden ser limitantes para el diagnóstico²¹.

A pesar de que las técnicas de detección directa del parásito en sangre o LCR tales como el cultivo en células de fibroblastos o la inoculación en ratones de laboratorio consumen mucho tiempo y tienen una baja sensibilidad²¹⁻²³ (38%) el presente trabajo permitió obtener dos aislamientos de *Toxoplasma gondii* de dos casos humanos de toxoplasmosis cerebral que crecen bien en ratón y que pueden ser utilizados por investigadores a nivel nacional e internacional.

Financiación

Este estudio fue financiado en su totalidad por el Instituto Nacional de Salud.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Epidemiological fact sheet on HIV and AIDS Core data on epidemiology and response. Colombia: OMS; 2008.
- Unaid. World AIDS Day Report. 2011.
- Gómez JE, Alvarado F, Hernández C, Cuervo S, Saravia J. Tratamiento de la fase aguda de la toxoplasmosis cerebral con clindamicina-falcidar (pirimetamina-sulfadoxina) en pacientes infectados por VIH. *Infectio*. 2001;5:162-8.
- Silva F, Torres A, Prada G. Encefalitis por toxoplasma y SIDA: análisis de 27 episodios. *Rev Panam Infectol*. 1997;1:4-9.
- Corral RH, Varela A, González I, Gutiérrez MI, Velásquez LH. Toxoplasmosis en pacientes con infección por VIH. *Bol SIE-ISS-Cali*. 1996;2:11-6.
- Gómez Marín JE, Corredor A, Murcia M, López MC, Alvarado F, Anzola I, et al. Valor diagnóstico de la medición de IgG, IgM e IgA anti toxoplasma en pacientes infectados por VIH. *Infectio*. 2000;4:4-10.
- Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *JCM*. 1995;33:2421-6.
- Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:1411-4.
- Dperouin F, Mazon M, Garin Y. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *JMC*. 1987;25:1597-60.
- Gallego C, Castaño J, Giraldo A, Ajzenberg D, Dardé M, Gómez JE. Caracterización biológica y molecular del aislamiento ClB-MUQ/HDC, una cepa colombiana de referencia para *T. gondii*. *Biomédica*. 2004;24:282-90.
- Committee National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011.
- Instituto Nacional de Salud. Resolución No. 0458 de 2011 "por medio de la cual se crea y reglamenta el CICAL del Instituto Nacional de Salud". Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2011.
- Duque S, Santacruz MM, Corredor A. Crioconservación de *Toxoplasma gondii*. *Biomédica*. 1992;12:18-20.
- Ho YC, Sun HY, Chen MY, Hsieh SM, Sheng WH, Chang SC. Clinical presentation and outcome of toxoplasmic encephalitis in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008;41:386-92.
- Vega A, Quintana O, González R, González P. Neurotoxoplasmosis como debut de paciente con SIDA. *AMC*. 2010;4. Disponible en: http://www.actamedica.sld.cu/r4_10/neurotoxoplasmosis.htm.
- Ho YC, Sun HY, Chen MY, Hsieh SM, Sheng WH, Chang SC. Clinical presentation and outcome of toxoplasmic encephalitis in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008;41:386-92.
- Durán E, Mirazo I, Combol A. Toxoplasmosis cerebral en pacientes con SIDA. *Parasitol día*. 1997;21:123-8.
- Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al. Harrison's principles of internal medicine. 14th ed. New York: McGraw Hill, Health Professions Division; 1998. p. 1371-7.
- Priya J, Calderón M, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4499-503.
- Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo B, Maimunah A, Pahmah N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop Biomed*. 2010;27:125-30.
- Lamoril J, Molina JM, De Gouvello A, Garin YJ, Deybach JC, Modai J, et al. Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol*. 1996;49:89-92.
- Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. *AIDS*. 1997;11:177-84.
- Dupon M, Cazenave J, Pellegrin J, Ragnaud J, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1995;33:2421-6.