



UCR FM 09:50 20/06/13

Revista de **BIOLOGÍA TROPICAL**

International Journal of TROPICAL BIOLOGY and CONSERVATION

18 de junio del 2013
RBT-048-2013

Señor
Dr. Luis Bernardo Villalobos Solano
Decano
Facultad de Medicina

Estimado Dr. Villalobos:

Cada dos años la Revista de Biología Tropical otorga el Premio Familia Girolami, por un monto de \$2000, a los autores del mejor artículo en el área de la biomedicina.

El contrato vigente especifica que el artículo ganador debe ser elegido por un jurado designado por los Decanos de Microbiología, Medicina y Farmacia, y por el Director de la Escuela de Biología.

Los dos artículos escogidos para su evaluación son los siguientes:

"Caracterización molecular y resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Clostridium perfringens* de diferentes orígenes en Costa Rica" por María del Mar Gamboa, Silvia Mau & Evelyn Rodríguez

"Efecto inmunosupresor de la infección por *Trypanosoma musculi* (Mastigophora: Trypanosomatidae) en la toxoplasmosis experimental" por Loretta Piccolo-Johanning, Vivian Kellerman-Guterman, Idalia Valerio-Campos & Misael Chinchilla-Carmona

Por lo anterior, muy respetuosamente le solicitamos su apoyo para que los documentos adjuntos sean debidamente evaluados por una persona de su elección, y la documentación completa entregada en nuestra oficina en el lapso de un mes. Cuando se anuncie el premio, se dará el debido reconocimiento a ustedes.

Agradeciendo su atención, me despido de ud. muy atentamente,

Julián Monge-Nájera
Director
REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL



CC: Archivo

PREMIO FAMILIA DE GIROLAMI 2013

Formulario de Evaluación

Artículo	Puntaje obtenido (del 1 al 100)
“Caracterización molecular y resistencia antimicrobiana de aislamientos de <i>Clostridium perfringens</i> de diferentes orígenes en Costa Rica” por María del Mar Gamboa, Silvia Mau & Evelyn Rodríguez	
“Efecto inmunosupresor de la infección por <i>Trypanosoma musculi</i> (Mastigophora: Trypanosomatidae) en la toxoplasmosis experimental” por Loretta Piccolo-Johanning, Vivian Kellerman-Guterman, Idalia Valerio-Campos & Misael Chinchilla-Carmona	

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Caracterización molecular y resistencia antimicrobiana de aislamientos de *Clostridium perfringens* de diferentes orígenes en Costa Rica

María del Mar Gamboa-Coronado*, Silvia Mau-Inchaustegui & Evelyn Rodríguez-Cavallini

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca 2060, San José, Costa Rica; maria.gamboa@ucr.ac.cr, silvyamau@gmail.com, evelyn.rodriguez@ucr.ac.cr

* Correspondencia

Recibido 25-X-2010. Corregido 20-II-2011. Aceptado 23-III-2011.

Abstract: Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Clostridium perfringens* isolates of different origins from Costa Rica. *Clostridium perfringens*, a Gram positive, spore-forming anaerobe, is widely distributed in nature. Based upon their production of four major toxins α , β , ϵ and ι , *C. perfringens* is classified into five toxinotypes (A-E). Some strains produce an enterotoxin (CPE), encoded by the *cpe* gene, which causes diarrhea in humans and some animals. *C. perfringens* strains that had been previously isolated and been kept at -80°C were analyzed for the presence of toxin genes and for antimicrobial resistance: 20 from soils, 20 from animal, 20 from human origin and 21 from food non related to outbreaks. According to PCR results, all strains were classified as *C. perfringens* type A, since only α toxin gene was detected, while *cpe* was detected in two strains (2.5%) isolated from food, as it has been described in other world regions. Antibiotic resistance to at least one antibiotic was detected in 44% of the strains, 41% was resistant to clindamycin, 25% to chloramphenicol, 22% to penicillin and 20% to metronidazole. Soils strains showed the highest resistance percentages to almost all antibiotics. Multiresistance (to three or more antibiotic groups) was detected in the strains from soil (40%), human origin (30%), food (14%) and animal origin (5%). The high resistance rates found may be explained by the widespread use of antimicrobials as growth promoters in plants and animals; also these resistant strains may act as reservoir of resistance genes that may be transferred between bacteria in different environments. Rev. Biol. Trop. 59 (4): 1479-1485. Epub 2011 December 01.

Key words: *Clostridium perfringens*, enterotoxin, toxinotypes, antimicrobial resistance.

Clostridium perfringens es un bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio, que con frecuencia se encuentra en suelos y aguas negras y en tracto gastrointestinal de animales y humanos como miembro de su microbiota intestinal (Petit *et al.* 1999). Es responsable de una variedad de enfermedades en seres humanos y animales (Labbe 2001). Su patogenicidad se asocia con la producción de muchas toxinas, de las cuales las principales son la alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) e iota (ι). *C. perfringens* se clasifica en cinco toxinotipos (A-E) de acuerdo con los tipos de toxina que produzca; el tipo A produce solo toxina α , el B produce α , β y ϵ , el

C produce α y β , el D produce α y ϵ , el tipo E produce α y ι (Petit *et al.* 1999). Cada toxinotipo se asocia con una enfermedad en particular, por lo que su determinación es importante para el diagnóstico y el estudio epidemiológico de los cuadros clínicos (Petit *et al.* 1999).

Además de estas toxinas, algunas cepas de *C. perfringens*, que generalmente pertenecen al tipo A, producen una enterotoxina (CPE) que causa diarrea en seres humanos y en algunos animales y que es codificada por el gen *cpe* (Baums *et al.* 2004). Tradicionalmente la clasificación de las cepas de *C. perfringens* se ha realizado por seroneutralización utilizando

ratones o cobayos (Heikinheimo & Korkeala 2005). Sin embargo, estos métodos son costosos, toman tiempo y son cuestionados éticamente por utilizar animales, por lo que en los últimos años han sido reemplazados por métodos moleculares (Baums *et al.* 2004), a pesar de que la demostración de los genes que codifican por las diferentes toxinas no implica necesariamente, que la proteína codificada esté siendo producida (Van Asten *et al.* 2009).

La producción de la CPE por parte de *C. perfringens* solo ocurre durante la esporulación y debido a que esta bacteria esporula mal en los medios de cultivo, su detección se dificulta (Petit *et al.* 1999). El uso de técnicas moleculares ha permitido, por lo tanto, solventar estos inconvenientes y poder determinar cuáles cepas son las que tienen el gen (Baums *et al.* 2004).

Por otra parte, el conocimiento del perfil de sensibilidad a los antibióticos de *C. perfringens* de diferentes orígenes, incluyendo suelos, alimentos, animales y seres humanos, puede contribuir a una utilización más racional de los antibióticos tanto para tratamiento clínico, como para usos agropecuarios, y la detección de cepas con resistencia antimicrobiana podría alertar sobre una posible transferencia de genes entre bacterias de diferentes orígenes.

En Costa Rica, *C. perfringens* ha sido aislado de numerosos ambientes: del 88% de suelos aledaños a plantas procesadoras de carne, del 93% de contenidos intestinales de ganado, del 55% de la carne en canal, del 75% de carnes molidas, del 36% de carnes en trozos para la venta al detalle y de 3% de carnes cocidas mantenidas en baños termo-regulables (Rodríguez *et al.* 2002). Sin embargo, en ausencia de conocimientos más específicos, este estudio aborda una caracterización fenotípica y genotípica de cepas costarricenses de diferentes orígenes, con el fin de contribuir al conocimiento de su distribución epidemiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *C. perfringens*: De la colección de bacterias anaerobias del Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia

(LIBA), Universidad de Costa Rica se analizaron 81 cepas de *C. perfringens*: 20 de suelos, 20 de origen animal, 20 de origen humano y 21 de alimentos cocidos no relacionados con brotes alimentarios. Todas habían sido aisladas previamente siguiendo las metodologías estándar y se habían conservado a -80°C (Rodríguez *et al.* 2002). Cada una de las cepas se recuperó en medio carne picada PRAS (Holdeman *et al.* 1977), el cual se incubó a 35°C por 24-48hr y posteriormente se inoculó en agar sangre para verificar su pureza.

Aislamiento del ADN total: El ADN se purificó según la metodología de Murray & Thompson (1980). Brevemente, cada cepa se creció en medio carne picada PRAS a 35°C por 24hr. Las bacterias por se concentraron centrifugación a 6 000g por 10min, se resuspendieron en 567µL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) y se incubaron a 37°C por 1hr después de añadir 30µL de duodecil sulfato de sodio al 10% y 3µL de proteinasa K (20mg/mL en agua destilada). Luego se agregó 100µL de solución de NaCl5M y 80µL de solución CTAB-NaCl (cetiltrimetil bromuro de amonio al 10% en NaCl0.7M) y se incubó a 65°C por 10min. Con solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) se hizo una extracción de ADN y se precipitó con etanol absoluto por incubación a -20°C toda la noche; luego se centrifugó a 12 000g por 20min, se lavó con alcohol de 70% y se resuspendió en 100µL de buffer TE, después de que fue secado a 37°C. El ADN se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Caracterización molecular por PCR: Para detectar las toxinas alfa (α), beta (β) y epsilon (ε) se empleó un PCR múltiple y los primers diseñados por Yoo *et al.* (1997). La mezcla contenía 12.5µL de Master Mix (Fermentas®), 7.5µL de agua para PCR, 1.0µL de cada uno de los 5 primers (10µM) y 1.0µL de ADN. El Master Mix (2X) contenía Taq polimerasa (0.05U/µL), MgCl₂ (4mM) y una mezcla de dNTPs (0.4mM de cada uno). Para la amplificación del ADN se incubó 5min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1min a 55°C,

1min a 72°C y 1min a 94°C, y un paso final de extensión de 5min a 72°C. Como controles se utilizaron las cepas *C. perfringens* tipo A ATCC 13124 y *C. perfringens* tipo B ATCC 3226. El análisis de los productos de amplificación se hizo por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para detectar el gen *cpe* se siguió la metodología así como los primers P145 y P146 descritos por Fach & Popoff (1997), los cuales amplifican un fragmento de 426pb; se empleó la mezcla para PCR Master Mix (2X). El programa de amplificación consistió de 5min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C y 30s a 72°C y por último se realizó una extensión de 72°C por 10min. Como controles se utilizaron las cepas *C. perfringens* LIBA 89 (*cpe*⁺) y *C. perfringens* ATCC 13124 (*cpe*⁻).

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos: La galería comercial ATB ANA de la casa Biomeriux® se utilizó siguiendo todas las recomendaciones del fabricante para su inoculación, incubación e interpretación.

RESULTADOS

Las 81 cepas de *C. perfringens* de diferentes orígenes: animales, humanos, alimentos cocidos y suelos, fueron clasificadas como *C. perfringens* tipo A, debido a que sólo se les detectó el gen de la toxina alfa (α), mientras que el gen de la enterotoxina (*cpe*) se encontró solamente en dos de las 81 cepas estudiadas (2.5%), las cuales habían sido aisladas de alimentos cocidos.

El 44% de todas las cepas fue resistente a algún antibiótico; en el Cuadro 1 se muestran los resultados de resistencia a los antibióticos que presentaron las cepas de *C. perfringens*. Respecto a la clindamicina el 41% fue resistente: 70% de las cepas de origen humano, 40% de las de suelo, 29% de las de alimentos y 25% de las de origen animal. Además, el 20% de todas las cepas fue resistente al metronidazol: las del suelo presentaron el mayor porcentaje de resistencia (50%), seguidas de las cepas de origen animal y de alimentos (15% y 14%,

CUADRO 1

Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos de cepas costarricenses de *Clostridium perfringens* aisladas de animales (n=20), humanos (n=20), alimentos (n=21) y suelos (n=20)

TABLE 1

Antimicrobial resistance percentage of Costa Rican *Clostridium perfringens* strains isolated from animals (n=20), humans (n=20), food (n=21) and soils (n=20)

	Cepas de animales %	Cepas de humanos %	Cepas de alimentos %	Cepas de suelos %	Total %
Clindamicina	25	70	29	40	41
Metronidazol	15	0	14	50	20
Cloranfenicol	20	30	24	25	25
Penicilina	15	20	14	40	22
Amoxicilina	0	0	0	10	2
Amoxicilina / ác. clavulánico	0	0	0	0	0
Piperacilina	0	5	0	10	4
Piperacilina / Tazobactam	0	0	0	0	0
Ticarcilina	0	0	0	5	1
Ticarcilina / ác. clavulánico	0	0	0	5	1
Cefoxitina	5	0	5	20	7
Cefotetán	5	0	5	20	7
Imipinem	0	0	0	0	0

respectivamente), mientras que ninguna de las de origen humano fue resistente. Con respecto al cloranfenicol, el 25% de todas las cepas fue resistente, y según el origen de las cepas, la resistencia osciló entre el 20 y el 30%. El 22% de las cepas fue resistente a penicilina, el mayor porcentaje de resistencia lo presentó las cepas provenientes de suelo (40%), mientras que solo el 15% de las cepas de origen animal y el 20% de origen humano fue resistente.

En general, al comparar las cepas provenientes de diversos orígenes, las de suelos presentaron los mayores porcentajes de resistencia a casi todos los antibióticos (Cuadro 1). Incluso algunos antibióticos (cefoxitina, cefotetán, piperacilina, amoxicilina, ticarcilina y ticarcilina con ácido clavulánico) a los cuales no se les detectó resistencia en las cepas de animales, de humanos y de alimentos, sí se les detectó en las de cepas de suelo (del 5 al 20%, Cuadro 1).

El 40% de las cepas de suelo fue multiresistente (a tres o más grupos de antibióticos), incluso tres cepas fueron resistentes a cinco de los siete grupos de antibióticos evaluados (penicilina, cefalosporinas, clindamicina, cloranfenicol y metronidazol). Aunque la multiresistencia de las cepas de origen humano fue del 30%, solo una cepa fue resistente a cuatro de los siete grupos de antibióticos evaluados (penicilina, clindamicina, cloranfenicol y metronidazol). La multiresistencia de las cepas de alimentos y de origen animal fue mucho menor (14% y 5%, respectivamente), y solo un aislamiento de cada uno de estos orígenes fue resistente a cuatro de los siete grupos de antibióticos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró una distribución ecológica de *C. perfringens* similar a la de otras regiones, con un predominio del toxinotipo A (Petit *et al.* 1999), tanto en sedimentos marinos como suelos (Fach & Popoff 1997); Li *et al.* (2007) informaron que el 98.8% de las cepas de suelos en Estados Unidos eran tipo A. Este toxinotipo predomina en la flora intestinal de muchos animales, incluyendo el

ser humano (Heikinheimo & Korkeala 2005, Heikinheimo *et al.* 2006) y es responsable de muchos cuadros clínicos en humanos, tales como gangrena, diarrea asociada a antibióticos (Joshy *et al.* 2006), así como cuadros gastrointestinales en otros animales (Petit *et al.* 1999, Baums *et al.* 2004). Finalmente, numerosos estudios realizados en Estados Unidos y Japón han demostrado que la mayoría de las cepas de *C. perfringens* provenientes de alimentos, relacionados o no con brotes alimentarios, son del tipo A (Lin & Labbe 2003, Wen & McClane 2004, Miki *et al.* 2008) tal como se encontró en este trabajo.

El gen de la enterotoxina (*cpe*) sólo se encontró en dos de las cepas estudiadas (2.5%), las cuales habían sido aisladas de alimentos. La frecuencia de este gen en cepas de origen alimentario generalmente es baja, del 0 al 4% en alimentos de origen animal (Lin & Labbe 2003, Wen & McClane 2004, Miki *et al.* 2008, Rahmati & Labbe 2008). En contraste con estos bajos porcentajes, Miwa *et al.* (1998) determinaron que el 17% de las cepas aisladas de muestras de carne y pollo tenían el gen *cpe*. En el presente estudio el 10% de las cepas provenientes de alimentos contenían el gen de la enterotoxina, mientras que previamente en Costa Rica se encontró que el 15% de cepas de alimentos cocidos eran toxigénicas (Gutiérrez *et al.* 1999), desconocemos si esto obedece a razones metodológicas o a cambios reales en el tiempo.

La mayoría de los estudios señalan que las cepas enterotoxigénicas son poco frecuentes en diferentes tipos de muestras; en cepas de heces de individuos asintomáticos varían desde 0 hasta 7.5% (Joshy *et al.* 2006), en cepas de origen animal desde 0 hasta 22% (Tschirdewahn *et al.* 1992, Heikinheimo & Korkeala 2005) y en cepas de suelos desde 0 hasta 7% (Kuske *et al.* 2006, Li *et al.* 2007). A pesar de que la incidencia de cepas enterotoxigénicas de *C. perfringens* sea baja, éstas representan un riesgo porque pueden dar origen a cuadros clínicos o brotes.

Aunque era de esperar que el porcentaje de cepas toxigénicas fuera bajo, es posible que las

cepas hayan correspondido, por azar, a cepas no toxigénicas, porque en una misma muestra puede coexistir un pequeño número de células *cpe*-positivas con un gran número de células *cpe*-negativas (Miwa *et al.* 1997, Heikinheimo *et al.* 2004, Heikinheimo *et al.* 2006).

En el presente estudio el porcentaje de cepas resistentes a algún antibiótico fue del 44%. Aunque existen pocos estudios sobre el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *C. perfringens* de diferentes orígenes, en Tailandia el 62.7% de cepas de heces de humanos y de cerdos, alimentos y del ambiente fue resistente a uno o varios antibióticos (Tansuphasiri *et al.* 2005), lo que indica que en ambos países la resistencia es frecuente y podría explicarse por el uso que se le da a los antibióticos.

La clindamicina es uno de los antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones por anaerobios, por lo que es preocupante que el 41% de las cepas fuera resistente, y particularmente alarmante que el 70% de las cepas de origen humano lo fuera (Cuadro 1). También los otros grupos de cepas presentaron altos porcentajes de resistencia: 40% de las de suelo, 29% de las de alimentos y 25% de las de origen animal (Cuadro 1). Aunque la resistencia a clindamicina de cepas de origen clínico humano es poco frecuente en otras latitudes (Alexander *et al.* 1995, Citron *et al.* 2005), los porcentajes de resistencia obtenidos en este estudio sugieren que en Costa Rica podría ser alto, por lo que debería corroborarse con aislamientos de cuadros clínicos.

Respecto al metronidazol, otro de los tratamientos de elección contra los anaerobios, el 20% de todas las cepas fue resistente, mientras que ninguna de origen humano fue resistente (Cuadro 1). La resistencia a metronidazol no es muy frecuente (Alexander *et al.* 1995, Citron *et al.* 2005), pero se ha reportado que en Tailandia y en Costa Rica un 13.5 y un 10.4%, respectivamente, de cepas de origen humano eran resistentes (Tansuphasiri *et al.* 2005, Camacho *et al.* 2008).

En un estudio previo con cepas de heces humanas en Costa Rica (Camacho *et al.* 2008),

no se detectó resistencia al cloranfenicol, lo que contrasta con el porcentaje de cepas resistentes de origen humano que se detectó (30%) en el presente trabajo. Tampoco se detectaron cepas resistentes en alimentos en Tailandia (Tansuphasiri *et al.* 2005), aunque en el presente estudio el 24% de las cepas fue resistente. Estas diferencias podrían deberse a que se emplearon metodologías diferentes en ambos estudios o a que esta resistencia es de reciente aparición en nuestro país. La resistencia de cepas de *C. perfringens* sí ha sido descrita en cepas aisladas de suelo en Grecia (Voidarou *et al.* 2006), y concuerda con la detección de un 25% de cepas resistentes provenientes de suelos en el presente estudio.

También se detectó un alto porcentaje de resistencia a la penicilina (22%), particularmente en las cepas provenientes de suelo (40%), situación que también fue descrita en un estudio en Grecia (Voidarou *et al.* 2006). Las diferencias en las prácticas terapéuticas y veterinarias de los países podrían explicar que en el presente estudio el 15% de las cepas de origen animal y el 20% de origen humano fueran resistentes a la penicilina, mientras que ninguna de las cepas de intestino de pollos de otro estudio (Silva *et al.* 2009) y solo el 10% de las cepas de heces humanas fuera resistente (Tansuphasiri *et al.* 2005).

En general, los mayores porcentajes de resistencia para casi todos los antibióticos se presentaron en cepas provenientes de suelos, tal como ha sido descrito en Grecia (Voidarou *et al.* 2006), y esto puede ser un reflejo del uso indiscriminado de antibióticos en la agricultura (Tansuphasiri *et al.* 2005).

En concordancia con lo anterior, el mayor porcentaje de cepas multiresistentes provenía de suelo (40%), incluso las cepas resistentes a cinco de los siete grupos de antibióticos evaluados, provenían de suelo. Esta multiresistencia es preocupante por la posibilidad de que estas cepas puedan actuar como un reservorio de genes de resistencia por el uso tan difundido de antimicrobianos como promotores de crecimiento de plantas y animales para el consumo humano.

Aunque se observó multiresistencia en cepas de origen humano y de alimentos (30 y 14%, respectivamente), ésta fue menor a la observada en Tailandia, donde las cepas de flora intestinal humana y de alimentos presentaron porcentajes más altos de multiresistencia (33.7 y 20%, respectivamente, Tansuphasiri *et al.* 2005); esto podría deberse a diferencias en el uso de los antibióticos en ambos países.

La demostración de que el 10% de las cepas de *C. perfringens* aisladas de alimentos poseen el gen de la enterotoxina refuerza la importancia de investigar los posibles reservorios que puedan favorecer la aparición de brotes de cuadros clínicos causados por esta bacteria. Además el presente estudio ha permitido conocer por primera vez en Costa Rica, el perfil de resistencia a los antibióticos de *C. perfringens*, el patógeno más distribuido en la naturaleza, lo que contribuirá a mejorar el manejo de pacientes con este tipo de infecciones. Finalmente, este estudio puso de manifiesto la amplia distribución de cepas resistentes a los antibióticos a partir de diferentes orígenes, lo que probablemente refleja el uso indiscriminado de antibióticos y plantea la posibilidad de transferencia de esos genes de resistencia entre bacterias de diversos ambientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Pablo Vargas y Martín Quesada por su ayuda técnica y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento otorgado.

RESUMEN

Clostridium perfringens es un bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio, ampliamente distribuido en la naturaleza, que produce cuatro toxinas principales α , β , ϵ y ι , las cuales permiten su clasificación en cinco toxinotipos (A-E). Algunas cepas producen una enterotoxina (CPE), codificada por el gen *cpe*, que causa diarrea en seres humanos y en algunos animales. La presencia de los genes de estas toxinas y la sensibilidad a los antibióticos se determinó en 81 cepas de *C. perfringens* previamente aisladas y que habían sido mantenidas a -80°C; 20 de suelos, 20 de origen animal, 20 de origen humano y 21 de alimentos

cocidos no relacionados con brotes alimentarios. De acuerdo con los resultados de PCR, todas las cepas fueron clasificadas como *C. perfringens* tipo A, debido a que solo se les detectó el gen de la toxina α , mientras que el gen de la enterotoxina (*cpe*) se detectó en dos cepas (2.5%) aisladas de alimentos, tal como ha sido descrito en otras regiones del mundo. El 44% de las cepas fue resistente a algún antibiótico; clindamicina (41%), cloranfenicol (25%), penicilina (22%) y metronidazol (20%). En general, las cepas provenientes de suelos presentaron los mayores porcentajes de resistencia a casi todos los antibióticos. El 40% de las cepas de suelo presentó multiresistencia (a tres o más grupos de antibióticos), el 30% de las de origen humano, el 14% de las de alimentos y el 5% de las de origen animal. Las altas tasas de resistencia encontradas podrían deberse al amplio uso de antibióticos como promotores de crecimiento de plantas y animales y esas cepas resistentes podrían actuar como reservorio de genes de resistencia que pueden transferirse entre bacterias de diversos ambientes.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, enterotoxinas, toxinotipos, resistencia antimicrobiana.

REFERENCIAS

- Alexander, C.J., D.M. Citron, J.S. Brazier & E.J.C. Goldstein. 1995. Identification and antimicrobial resistance patterns of clinical isolates of *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, and *Clostridium ramosum* compared with those of clinical isolates of *Clostridium perfringens*. J. Clin. Microbiol. 33: 3209-3215.
- Baums, C.G., U. Schotte, G. Amtsberg & R. Goethe. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol. 100: 11-16.
- Camacho, N., C. Espinoza, C. Rodríguez & E. Rodríguez. 2008. Isolates of *Clostridium perfringens* recovered from Costa Rican patients with antibiotic-associated diarrhoea are mostly enterotoxin-negative and susceptible to first-choice antimicrobials. J. Med. Microbiol. 57: 343-347.
- Citron, D.M., Y.Y. Kwok & M.D. Appleman. 2005. In vitro activity of oritavancin (LY333328), vancomycin, clindamycin, and metronidazole against *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, and anaerobic gram positive cocci. Anaerobe 11: 93-95.
- Fach, P. & M.R. Popoff. 1997. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4232-4236.
- Gutiérrez, A., M.M. Gamboa, E. Rodríguez & M.L. Arias. 1999. Presencia de *Clostridium perfringens* en

- preparaciones a base de carne en servicios de alimentación del Cantón Central de San José, Costa Rica. Arch. Latinoam. Nutr. 49: 275-278.
- Heikinheimo, A. & H. Korkeala. 2005. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. Lett. Appl. Microbiol. 40: 407-411.
- Heikinheimo, A., M. Lindstrom & H. Korkeala. 2004. Enumeration and isolation of epe-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. J. Clin. Microbiol. 42: 3992-3997.
- Heikinheimo, A., M. Lindstrom, P.E. Granum & H. Korkeala. 2006. Humans as reservoir for enterotoxin-gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. Emerg. Infect. Dis. 12: 1724-1729.
- Holdeman, L.V., E.P. Cato & W.E.C Moore. 1977. Anaerobe laboratory manual. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, EEUU.
- Joshy, L., R. Chaudhry, B. Dhawan, L. Kumar & B.K. Das. 2006. Incidence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from antibiotic-associated diarrhoeal patients: a prospective study in an Indian hospital. J. Hosp. Infect. 63: 323-329.
- Kuske, C.R., S.M. Batns, C.C. Grow, L. Merrill & J. Dunbar. 2006. Environmental survey for four pathogenic bacteria and closely related species using phylogenetic and functional genes. J. Forensic Sci. 51: 548-558.
- Labbe, R. 2001. *Clostridium perfringens*, p. 325-330. In F. Pouch-Downes & K. Ito (eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington, DC, EEUU.
- Li, J., S. Sayeed & B.A. McClane. 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. Appl. Environ. Microbiol. 73: 7218-7224.
- Lin, Y.T. & R. Labbe. 2003. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1642-1646.
- Miki, Y., K. Miyamoto, I. Kaneko-Hirano, K. Fujiuchi & S. Akimoto. 2008. Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 74: 5366-5372.
- Miwa, N., T. Nishina, S. Kubo & M. Atsumi. 1997. Most probable number method combined with nested polymerase chain reaction for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of cattle, pig and chicken. J. Vet. Med. Sci. 59: 89-92.
- Miwa, N., T. Nishina, T.S. Kubo, M. Atsumi & H. Honda. 1998. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. Int. J. Food Microbiol. 42: 195-200.
- Murray, M.G. & W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- Petit, L., M. Gibert & M.R. Popoff. 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 104: 104-110.
- Rahmati, T. & R. Labbe. 2008. Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. J. Food Prot. 71: 1178-1185.
- Rodríguez, E., M.M. Gamboa & P. Vargas. 2002. *Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica. Arch. Latin. Nutr. 52: 155-159.
- Silva, R.O.S., F.M. Salvarani, N.R.S. Martins, P.S. Pires & F.C.F. Lobato. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated. Braz. J. Microbiol. 40: 262-264.
- Tansuphasiri, U., W. Matua & L. Sangsuk. 2005. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. SE Asian J. Trop. Med. 36: 954-960.
- Tschirdewahn, B., S. Notermans, K. Wernars & F. Unterwiesing. 1992. The presence of *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. Int. J. Food Microbiol. 14: 175-178.
- Van Asten, A.J., C.W. Van der Wiel, G. Nikolaou, D.J. Houwers & A. Grone. 2009. A multiple PCR for toxin of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol. 136: 411-4112.
- Voidarou, C., S. Kandelis, D. Vassos, A. Tzora, I. Skoufos, A. Alexopoulos & E. Bezirtzoglou. 2006. Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soil. 18th World Congress of Soil Science, Philadelphia, Pennsylvania, EEUU.
- Wen, Q. & B.A. McClane. 2004. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2685-2691.
- Yoo, H.S., S.U. Le, K.Y. Paik & Y.H. Paik. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 228-232.

Efecto inmunosupresor de la infección por *Trypanosoma musculi* (Mastigophora: Trypanosomatidae) en la toxoplasmosis experimental

Loretta Piccolo-Johanning, Vivian Kellerman-Guterman, Idalia Valerio-Campos & Misael Chinchilla-Carmona

Departamento de Investigación y Cátedra de Parasitología Médica, Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), San José Costa Rica, América Central; loretta_piccolo@hotmail.com, vivik01@hotmail.com, valerioci@ucimed.com, chinchillacm@ucimed.com

Recibido 12-IV-2012. Corregido 10-XII-2012. Aceptado 24-I-2013.

Abstract: Immunosuppressor effect of *Trypanosoma musculi* (Mastigophora: Trypanosomatidae) on experimental toxoplasmosis. The immunosuppression caused by species of the gender *Trypanosoma* has been widely documented. The influence over experimental infections with *Toxoplasma gondii* is evident when using *Trypanosoma lewisi*, a natural parasite of white rats. We decided to test the effect of *Trypanosoma musculi* from mice, an organism with very similar biological characteristics to *T. lewisi*, to see if this trypanosomatid could induce a similar effect. Four groups of Swiss mice were inoculated with *T. musculi* previously to infection with *T. gondii*, and we determined the survival of the animals, as well as the number of cysts developed in the brain of survivors. We isolated and tested different strains of *T. gondii* from different sources. In a first experiment, the animals were previously inoculated with *T. musculi* at different times prior to the infection with *Toxoplasma*; this allowed us to determine that the immunosuppression process resulted more evident when *T. musculi* inoculation was made four days before. In a second experiment, we used different inoculi dose and found that it did not influenced the process. Furthermore, the results were negative when evaluating if the amount of the inoculated trypomastigote influenced the process. In order to demonstrate if there were differences in the immunosuppressive effect, related to *Toxoplasma* strains, groups of mice were inoculated with brain cysts of TFC, TLP, TLW and TBT strains. Excluding the TLP strain, that resulted to be very pathogenic regardless the previous inoculation with *T. lewisi*, the other strains kept the same pattern of immunosuppression in mice, whose survival time was shorter as the presence of cysts in the brain was higher. These observations were in agreement with an experimental immunosuppression model, associated with immunosuppressive diseases, specially cancer and AIDS. Rev. Biol. Trop. 61 (2): 981-990, Epub 2013 June 01.

Key words: *Toxoplasma gondii*, immunosuppression, *Trypanosoma musculi*, experimental model, immunity.

La prevalencia de infecciones por *Toxoplasma gondii* en el ser humano es de 5-90%, dependiendo de la zona geográfica (Bojar & Szymanska, 2010). En Costa Rica, la seroprevalencia es de un 58% (Zapata *et al.* 2005). La presentación aguda de la parasitosis es poco frecuente, por lo que en la mayoría de los casos cursa como una enfermedad crónica, debido a que la acción inmunológica del hospedero rápidamente bloquea la reproducción del parásito, el cual forma quistes en músculo y cerebro especialmente, que usualmente se mantienen latentes a lo largo de la vida del

hospedero (Dubey & Jones 2008). En el caso de individuos inmunodeprimidos ya sea por causas naturales (cáncer, infecciones con VIH, Lupus, entre otros) (Sitoe *et al.* 2010) o por tratamientos excesivos con inmunosupresores, el parásito puede activarse produciendo una toxoplasmosis aguda (Holland 2003, Elmore *et al.* 2010, Solene *et al.* 2010).

Los fenómenos de inmunosupresión mencionados anteriormente se han estudiado experimentalmente, tanto para *T. gondii* (Kankova *et al.* 2010 & Da Silva *et al.* 2010) como para otros parásitos intracelulares (Uzonna *et*

al.1998, Da Silva *et al.* 2010, Fazzani *et al.* 2011). En el caso de la toxoplasmosis, se han realizado varios estudios que revelan claramente esta situación, especialmente en cuanto a infecciones concomitantes se refiere. El hecho de que la infección con tripanosomas africanos induzca procesos de inmunosupresión claramente demostrados (Darji *et al.* 1992, Uzonna *et al.*1998) dio origen a varios estudios en las ratas blancas (*Rattus rattus*). Estos animales presentan una clara resistencia natural a la toxoplasmosis, la cual siempre se manifiesta en ellos como una enfermedad crónica (Chinchilla *et al.* 1981,1982, 1985), independientemente de la cepa del parásito y la edad de los animales (Guerrero *et al.*1995, Albright & Albright 1991). En tales estudios, se demostró que el *Trypanosoma lewisi*, un parásito normal de la rata, que no provoca patología sobre el animal (ya que la infección es autolimitada), induce un efecto inmunosupresor importante que activa la toxoplasmosis en estos animales. Este efecto se produce tanto al infectar los animales vía intraperitoneal con taquizoitos, la forma más activa del parásito, como con ooquistes, estado evolutivo de infección oral del *T. gondii* (Guerrero *et al.* 1997). *T. musculi* cuyo hospedero es el ratón (*Mus musculus*), pertenece al mismo grupo Stercoraria de *T. lewisi*; además presenta prácticamente las mismas características biológicas e inmunológicas del tripanosomátido de ratas (Viens *et al.* 1974). Por esta razón consideramos que el mismo efecto inmunosupresor podría presentarse en ratones infectados con *T. musculi*. Estos últimos animales son susceptibles a la mayoría de las cepas de *T. gondii* por lo que el estudio trata de agudizar la infección crónica o intensificarla en los ratones infectados con una cepa adecuada del parásito. Los estudios experimentales que han tratado de dilucidar estos supuestos, constituyen la base de este estudio.

MATERIALES Y METODOS

Animales: En todos los experimentos se usaron ratones machos y hembras (*Mus musculus* cepa Swiss), con un peso

promedio de 23g. Para los experimentos varios grupos de cuatro a cinco animales se mantuvieron bajo las condiciones recomendadas por la ley No. 7451 sobre Bienestar de los Animales (La Gaceta n° 44 del 04 marzo de 1998 de Costa Rica), con suministro de alimento y agua *ad libitum* por un máximo de 30 días, tiempo límite de todos los experimentos.

Parásitos: Se emplearon las cepas 30182 de *T. musculi* de la American Type Culture Collection (ATCC) y las cepas de *T. gondii* siguientes, caracterizadas como cepas de tipo crónico: TFC, TLW, TLP aisladas de las heces de *Felis catus*, *Leopardus wiedii* y *Leopardus pardalis* respectivamente, así como la cepa TBT aislada de una muestra de carne de un bovino (*Bos taurus*). La cepa de *T. musculi* se mantuvo en el laboratorio inoculándola vía intraperitoneal (i.p.) semanalmente en ratones Swiss; las de *T. gondii*, por ser de tipo crónico, se traspasaron cada dos a tres meses, por inoculación de quistes del parásito en el tejido cerebral a ratones sanos. Para los procesos de inoculación, sacrificio y disección se siguieron los protocolos establecidos por la ley mencionada.

Modelo experimental: Grupos de cuatro o cinco ratones fueron inoculados vía intraperitoneal con 0.2mL de dilución con 10^6 de tripomastigotos de *T. musculi*, obtenidos por sangrado de animales previamente infectados, entre los meses de Julio 2010 a Agosto 2011. Otro grupo de ratones, con características similares, y que no fue infectado con el tripanosomátido, sirvió como control. Después de un tiempo establecido para cada experimento, que varió entre cuatro y siete días, los ratones de todos los grupos fueron inoculados i.p con 0.2mL de quistes de *T. gondii*. Estos quistes fueron obtenidos al extraer cerebros de ratones previamente infectados con las diferentes cepas; la cantidad a inocular se determinó al establecer el número de quistes por gramo de tejido. Se prepararon diluciones del macerado del cerebro, para establecer el número de quistes a inocular, de acuerdo con los lineamientos

específicos de cada experimento (Holst & Chinchilla 1990, Guerrero *et al.* 1997). Posteriormente, se hizo el control de supervivencia de los animales, con un tiempo máximo y final del experimento de 30 días. Después del mes de infección, los animales supervivientes fueron sacrificados para determinar en ellos el número de quistes por gramo de cerebro, de acuerdo con estudios previos (Holst & Chinchilla 1990). Todos estos datos y los relativos a la supervivencia, fueron evaluados al comparar los resultados obtenidos en los ratones inoculados y sin inocular con *T. musculi*.

Con base en los lineamientos anteriores se procedió a realizar los siguientes experimentos específicos de comprobación de la hipótesis planteada.

1. Con el objeto de comprobar si *T. musculi* induce un efecto inmunosupresor sobre la toxoplasmosis experimental, cuatro grupos de cuatro ratones fueron inoculados con 10^6 tripomastigotos por animal; el quinto grupo no fue inoculado y sirvió como control. Posteriormente, los grupos uno, dos, tres y cuatro fueron infectados con 50 quistes de *T. gondii* (cepa TLW) después de cuatro, cinco, seis y siete días respectivamente, y el grupo cinco recibió los quistes a los cuatro días, todo de acuerdo con la metodología descrita en trabajos previos (Guerrero *et al.* 1997). En el experimento que se extendió por 30 días, se usaron 20 ratones en total.
2. En el experimento anterior se determinó que existía algún efecto inmunosupresor sobre la toxoplasmosis experimental y que los mejores resultados se obtenían cuando la infección con el tripanosoma se realizaba cuatro días antes de inducir la toxoplasmosis experimental. Para establecer si el número de tripanosomas infectados era un factor importante en el proceso, se procedió a inocular seis grupos de cinco ratones con 4×10^7 , 4×10^5 , 4×10^3 , 4×10^1 , 4 y <4 tripomastigotos por ratón en cada grupo, respectivamente; el grupo siete no

fue inoculado con este parásito. Después de cuatro días, los animales de los siete grupos fueron infectados con aproximadamente 50 quistes de *T. gondii* (cepa TLW). El total de animales usados fue de 35 en este experimento que se prolongó por 30 días.

3. Se realizó un tercer experimento para establecer si el efecto inmunosupresor presentaba variantes debidas al tipo de cepa de *T. gondii*. Para cada una de las cepas de este parásito, TFC, TLW, TLP y TBT se prepararon dos grupos de cinco ratones, uno de los grupos se infectó previamente con *T. musculi* y el otro no; después de cuatro días los dos grupos se inocularon con 25 quistes de *T. gondii* de la cepa respectiva. El inóculo fue más bajo con la idea de contar con mayor número de sobrevivientes y establecer así las diferencias del caso en cuanto a la cantidad de quistes en el cerebro de los animales. De acuerdo con el número de grupos establecidos, se inocularon un total de 40 ratones, algunos de los cuales murieron antes de los 30 días, tiempo máximo de duración del experimento.

Para todos los tres experimentos específicos anteriormente descritos, una vez realizadas las inoculaciones se procedió de acuerdo con el modelo experimental general en el control de supervivencia y determinación del número de quistes por gramo de cerebro de los supervivientes.

Los datos correspondientes a la determinación de las diferencias entre promedios del número de quistes de *T. gondii* en animales con o sin previa infección con *T. musculi*, fueron analizados con estadística paramétrica y no paramétrica (prueba de suma de rangos Wilcoxon-Mann-Whitney para ambos casos). Para analizar la supervivencia de los animales en los diferentes experimentos se utilizó la prueba de estimador de Kaplan-Meier y la prueba t student, ampliamente conocida y más adecuada para experimentos con un número pequeño de datos.

RESULTADOS

En el primer experimento se demostró que la inoculación previa con *T. musculi* reduce la supervivencia de los animales infectados con *T. gondii* (Fig. 1). En efecto gran cantidad de taquizoítos fueron encontrados en el exudado peritoneal de los ratones que murieron antes de los 30 días. El menor promedio de supervivencia se presentó en aquellos ratones en que la infección con el tripanosoma fue de cuatro días antes de la inoculación con *T. gondii* ($p < 0.05$),

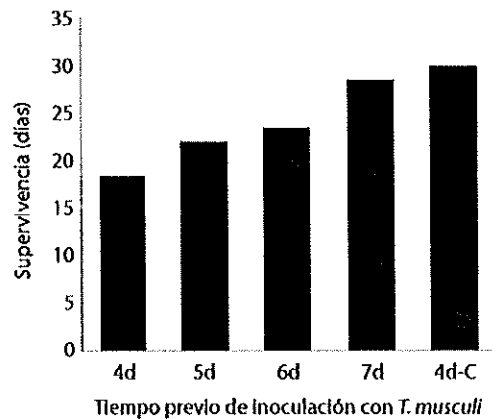


Fig. 1. Supervivencia de ratones infectados con *T. gondii* previa inoculación con *T. musculi*.

Fig. 1. Survival time of mice infected with *T. gondii* after inoculation with *T. musculi*.

aumentando proporcionalmente con el número de días de infección previa ($p < 0.05$). Por lo tanto, se estableció el tiempo previo de cuatro días para la infección con *T. musculi* para los siguientes experimentos.

Aunque fueron pocos los datos obtenidos, porque varios animales no sobrevivieron los 30 días establecidos como final del experimento, el número de quistes/g de cerebro en los animales no inoculados con *T. musculi*, 16 561, fue menor que aquellos que sobrevivieron de los grupos con tres y cuatro días de inoculación previa con el tripanosoma, 38 720 y 21 069, respectivamente.

Al estudiar la influencia de la cantidad de tripanosoma inoculados con el efecto inmunosupresor observado, se determinó que todos los animales infectados solamente con *T. gondii* sobrevivieron los 30 días, mientras que los otros presentaron promedios de supervivencia que oscilaron entre los 20 y 26 días (Fig. 2). Por lo tanto, el efecto inmunosupresor se mantuvo (p entre < 0.025 y 0.05), pero no existieron diferencias significativas aplicables a la cantidad de tripomastigotos inoculados ($p > 0.05$). El número de quistes por gramo de cerebro en los ratones control sobrevivientes (datos no presentados) fue mucho menor (3 034), que el de los animales inmunosuprimidos (alrededor de 11 000).

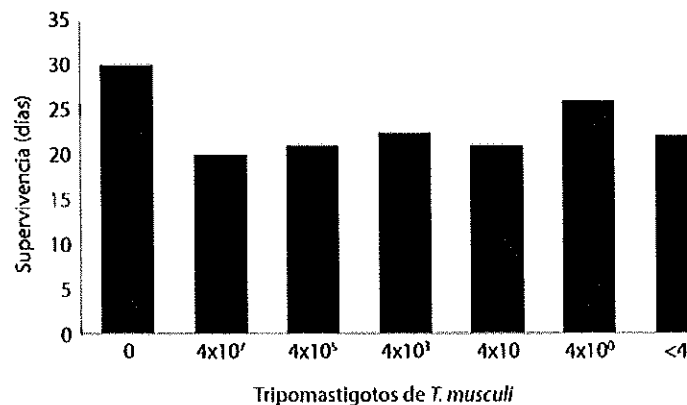


Fig. 2. Supervivencia de ratones infectados con *T. gondii* previa inoculación con cantidades diferentes de tripomastigotos de *T. musculi*.

Fig. 2. Survival time of mice infected with *T. gondii* previously inoculated with different number of *T. musculi* tripomastigotes.

En el estudio con diferentes cepas de *T. gondii*, la supervivencia en general fue más elevada, tal y como se esperaba, al rebajar el número de quistes inoculados. La excepción a esta regla fue la cepa TLP, cuya actividad patológica ha sido evidente a través de otras observaciones (datos no publicados). En efecto, todos los animales inoculados murieron antes de 30 días, independientemente de la infección previa o no con el tripanosoma (Fig. 3). Por los datos obtenidos en cuanto a supervivencia no se deduce ninguna diferencia, pero cuando se hizo el análisis de quistes por gramo de cerebro en los supervivientes, se notó que para las tres cepas, los animales del grupo

control (no inoculados con *T. muscoli*), siempre presentaron un menor número de quistes (Fig. 4) y las diferencias estadísticas ($p < 0.011$) fueron significativas.

DISCUSION

Los procesos de inmunosupresión son importantes en el sentido que significan un debilitamiento en las defensas naturales de los seres vivos, lo que los convierte en terreno fértil para el desarrollo de enfermedades causadas fundamentalmente por virus, bacterias y hongos (Manzano-Alonso & Castellano-Tortajada 2011, Duncan & Wilkes 2005), pero

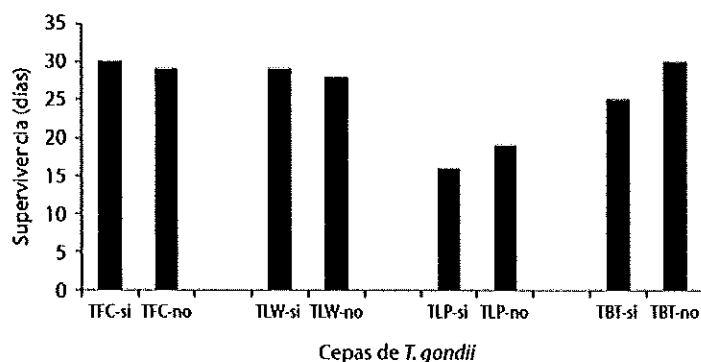


Fig. 3. Supervivencia de ratones infectados con diferentes cepas de *T. gondii* previa inoculación con *T. muscoli*.
Fig. 3. Survival time of mice infected with different strains of *T. gondii* after *T. muscoli* inoculation.

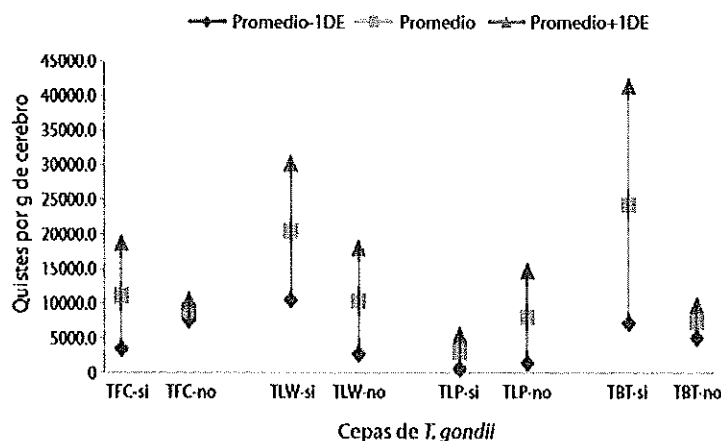


Fig. 4. Número de quistes en el cerebro de ratones infectados con diferentes cepas de *T. gondii* con o sin previa infección con *T. muscoli*.
Fig. 4. Number of *T. gondii* cysts found in the brain of mice infected with different strains after *T. muscoli* inoculation.

también por parásitos. Dentro de estos últimos, se han observado estos procesos en infecciones de organismos de mayor tamaño como lo son las especies del género *Schistosoma* (Capron & Capron 1986), así como *Strongyloides stercoralis* (Ruano *et al.* 2005, Basile *et al.* 2010, Corti *et al.* 2011) entre otros. Sin embargo, el mayor impacto se observa en parásitos que por su naturaleza intracelular, o su acción directa interna sobre órganos vitales, son profundamente afectados por cualquier alteración en la inmunidad celular, blanco fundamental de la inmunosupresión (Ferreira & Borges 2002, Dedet & Pratlong 2005). Tal es el caso de los tripanosomas del grupo *Salivaria* (africanos) (Uzonna *et al.* 1998), (*Trypanosoma cruzi* (Kretzli 1977, Sztein & Kierszenbaum 1993, Bacal *et al.* 2010), *Leishmania* spp. (Oliveira *et al.* 2008), *Toxoplasma gondii* (Abedalthagafi *et al.* 2009, García *et al.* 2010, Solène *et al.* 2010) y *Plasmodium falciparum* (Grimwade *et al.* 2004). El ejemplo más llamativo causante de este proceso son las infecciones por VIH (Raju *et al.* 2008, Cruz *et al.* 2006, Otieno *et al.* 2006, Jayawardena *et al.* 2008) en las cuales el curso de la enfermedad es más severo producto del debilitamiento del sistema inmune. En el caso del *T. gondii* cuya manifestación usual es una infección crónica, la infección concomitante con VIH desencadena una toxoplasmosis diseminada, con graves efectos clínicos sobre algunos pacientes (Davarpanah *et al.* 2007, Solène *et al.* 2010).

Los conocimientos que se puedan aportar al estudio de este fenómeno inmunológico pueden ser de utilidad científica y práctica, en el análisis del proceso y sus consecuencias en el campo médico. En este sentido, el establecimiento de modelos experimentales, aunque no necesariamente extrapolables al modelo humano, representan una ayuda importante para realizar tal análisis. En los estudios previamente realizados usando *T. lewisi* como el organismo capaz de exacerbar las infecciones por *T. gondii* (Guerrero *et al.* 1997, Chinchilla *et al.* 2004) en las ratas blancas, se observan en los animales sobrevivientes lesiones pulmonares muy similares, desde el punto de vista patológico, a las

que se producen en los individuos infectados con VIH (Catarinella *et al.* 1998). Datos como estos y otros como la inhibición del interferón gamma durante el proceso (Chinchilla *et al.* 2005) o el efecto que se manifiesta inclusive a nivel celular en macrófagos peritoneales (Catarinella *et al.* 1999, Chinchilla *et al.* 2004) y alveolares (Ríos *et al.* 2009), constituyen información inmunológica básica que eventualmente puede ser importante en la comprensión de estos fenómenos.

Los resultados obtenidos en el modelo expuesto en este estudio, usando también *T. gondii* pero sustituyendo el *T. lewisi* por el *T. duttoni*, parásito de ratones, reflejan un efecto inmunosupresor similar tanto al analizar la supervivencia como al determinar el número de quistes por gramo de cerebro en los animales sobrevivientes. Al igual que en el modelo con ratas (Guerrero *et al.* 1997), en este estudio se nota que el efecto inmunosupresor se manifiesta en forma más clara cuando la infección previa con el tripanosomátido se realiza cuatro días antes, disminuyendo el efecto conforme el tiempo previo es más prolongado. Este efecto probablemente es causado por la inhibición de interferón gamma, muy importante en el bloqueo de las infecciones agudas por *T. gondii* (Zhao *et al.* 2007), así demostrado por el modelo con la rata blanca (Chinchilla *et al.* 2005).

La cantidad de tripanosomas inoculados no parece ser un factor importante en la mayor o menor manifestación del efecto, tal y como se observa en los datos de supervivencia que se presentan en nuestros resultados. El número de quistes de *T. gondii* inoculados en este caso fue un poco más elevado, con el objetivo de observar mejor las diferencias en supervivencia en relación con el control como realmente ocurrió. Además, la observación de que la diferencia en cuanto al número de quistes en el cerebro entre el grupo control y en los pocos animales que sobrevivieron fue bastante marcada, independientemente del inóculo del tripanosoma, nos indica que el factor que induce el efecto está en el parásito o es liberado por éste, y que presenta una actividad tal, que solo necesita la reproducción del mismo durante cuatro días

para ejercer su acción inhibidora. Productos derivados de protozoarios con esta capacidad inmunosupresora han sido encontrados en tripanosomas africanos (Darji *et al.* 1992, 1996), así como para *T. lewisi* (Ndarathi 1991).

El hecho de que en los experimentos con cepas diferentes del *T. gondii*, se observara la inhibición inmunitaria para cualquier cepa, tanto en la supervivencia de los animales como en el número de quistes en el cerebro de los sobrevivientes, confirma que el factor inmunosupresor no es específico, sino que es un proceso inmune generado por el tripanosomátido contra el *T. gondii* a nivel celular como ha sido demostrado en otros estudios (Mabbott *et al.* 1995). En el caso de *T. lewisi* por ejemplo, el efecto fue demostrado también para infecciones en ratas blancas de macrófagos alveolares por *Cryptococcus neoformans* (Gross *et al.* 2006), un organismo muy lejano desde el punto de vista biológico y taxonómico del *T. gondii*.

Este nuevo modelo, aunque similar al de *T. lewisi* ya publicado, tiene la ventaja de que emplea un animal de más fácil manejo, el ratón blanco (*Mus musculus*), en comparación con la rata blanca (*Rattus rattus*). Este aspecto junto con el aporte para una mejor comprensión de algunos procesos inmunológicos, propios de las enfermedades debilitantes del ser humano, es el aporte de este trabajo. Sin embargo, quedan varias dudas en el sentido de determinar si este efecto se puede manifestar también a nivel celular, como se ha demostrado específicamente en macrófagos peritoneales (Catarinella *et al.* 1999, Chinchilla *et al.* 2004) o alveolares (Ríos *et al.* 2009), o el papel de las linfocinas en el proceso. Estudios en ambos sentidos se encuentran en proceso.

En conclusión, este estudio ha aportado los siguientes elementos: 1. La presentación de un modelo de inmunosupresión entre dos parásitos de diferente escala zoológica, uno de ellos *T. gondii* de importancia médica. 2. Datos que podrían contribuir para el mayor conocimiento de los procesos de inmunosupresión producidos por las enfermedades debilitantes y 3. El uso de

un animal de laboratorio, el ratón, de más fácil manejo, en este tipo de estudios inmunológicos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con el apoyo del departamento de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y del Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT). Agradecemos a Laura Valerio, José Bolaños y Edwin Valenciano por el manejo y mantenimiento de los animales de laboratorio y a Juan Carlos Vanegas por el apoyo brindado en los análisis estadísticos y confección de figuras.

RESUMEN

La prevalencia de infecciones por *Toxoplasma gondii* en el ser humano es de 5-90% según la zona geográfica; en Costa Rica por ejemplo, la seroprevalencia es de un 58%, por lo que es importante comprender algunos procesos inmunológicos, propios en estas afectaciones parasitarias. Con el objeto de determinar si el *Trypanosoma musculi* ejerce procesos de inmunosupresión sobre *Toxoplasma gondii* se realizó un experimento en el que se inocularon ratones Swiss con *T. musculi* cuatro, cinco, seis y siete días previos a la infección con *T. gondii*, ocurriendo la inmunosupresión cuando la inoculación con *T. musculi* fue hecha cuatro días antes. Además, la cantidad de tripomastigotos inoculados no influyó en el proceso. Se probaron tres cepas de *T. gondii* aisladas de las heces de un gato casero (TFC), de un *Leopardus pardalis* (TLP), de un *Leopardus wiedii* y de la carne de un *Bos taurus* (TBT). La cepa TLP resultó ser muy patógena, matando a los animales en un tiempo corto, independientemente de la inoculación con *T. musculi*; para las otras cepas se mantuvo el patrón de inmunosupresión en los ratones. Se reporta entonces un modelo experimental de inmunosupresión, aspecto muy en boga en este momento, por su relación con enfermedades que inducen esta condición en el ser humano, especialmente a enfermedades como el cáncer y el SIDA. Este modelo es más fácil de aplicar experimentalmente que el correspondiente con *T. lewisi* previamente descrito, el cual usa ratas blancas de más difícil manejo que los ratones usados en este estudio.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, inmunosupresión, *Trypanosoma musculi*, modelo experimental, inmunidad.

REFERENCIAS

- Abedalthagafi, M.E., J. Rushing, D. Garvin, B. Cheson & M. Ozdemirli. 2009. Asymptomatic diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia: case report and review of the literature. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3: 106-109.
- Albright, J.W. & J.F. Albright. 1991. Rodent trypanosomes: their conflict with the immune system of the host. *Parasitol. Today* 7: 137-140.
- Bacal, F., C.P. Silva, P.V. Pires, S. Mangini, A.I. Fiorelli, N.G. Stolf & E.A. Bocchi. 2010. Transplantation for Chagas disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin. Transplant.* 24: E29-E34.
- Basile, A., S. Simzar, J. Bentow, F. Antelo, P. Shitabata, S.K. Peng & N. Craft. 2010. Disseminated *Strongyloides stercoralis*: hyperinfection during medical immunosuppression. *J. Am. Acad. Dermatol.* 63: 896-902.
- Bojar, I. & J. Szymanska. 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*- state of the art. *Ann. Agric. Environ. Med.* 17:209-214.
- Capron, M. & A. Capron. 1986. Rats, mice and men models for immune effectors mechanisms against schistosomiasis. *Parasitol. Today* 2: 69-75.
- Catarinella, G., M. Chinchilla, O.M. Guerrero & E. Abraham. 1998. Effect of *Trypanosoma lewisi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) on the infection of white rats with *Toxoplasma gondii* (Eucoccidia: Sarcocystidae) oocysts. *Rev. Biol. Trop.* 46: 1121-1123.
- Catarinella, G., M. Chinchilla, O.M. Guerrero & A. Castro. 1999. Infection of white rats peritoneal macrophages with *Toxoplasma gondii* (Coccidia: Sarcocystidae) after *Trypanosoma lewisi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) infection. *Rev. Biol. Trop.* 47: 483-488.
- Chinchilla, M., M. Alfaro & O.M. Guerrero. 1981. Adaptación natural de rata blanca a *Toxoplasma gondii*. *Rev. Biol. Trop.* 29: 273-282.
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero & A. Castro. 2004. Effect of *Trypanosoma lewisi* infection on the *Toxoplasma gondii* multiplication in white rat peritoneal macrophages. *Parasitol. Latinoam.* 59: 3-7.
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero & E. Solano. 1982. Lack of multiplication of *Toxoplasma* in macrophages of rats in vitro. *J. Parasitol.* 68: 952-955.
- Chinchilla M., O. M. Guerrero & E. Valenciano. 1985. Efecto de los corticosteroides sobre la adaptación natural de la rata blanca al *Toxoplasma*. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 6: 113-118.
- Chinchilla, M., L. Reyes, O.M. Guerrero-Bermúdez & A. Castro. 2005. Role of interferon γ on the immunosuppression during *Toxoplasma gondii* infection by *Trypanosoma lewisi*. *Parasitol. Latinoam.* 60: 54-56.
- Corti, M., M.F. Villafañe, N. Trione, D. Risso, J.C. Abuin & O. Palmieri. 2011. Infección por *Strongyloides stercoralis*: estudio epidemiológico, clínico, diagnóstico y terapéutico en 30 pacientes. *Rev. Chil. Inf.* 28: 217-222.
- Cruz, I., J. Nieto, J. Moreno, C. Cañavate, P. Desjeux & J. Alvar. 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Ind. J. Med. Res.* 123: 357-388.
- Da Silva, R.C., A.V. Da Silva & H. Langoni. 2010. Recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection in chronically infected rats (*Rattus norvegicus*). *Exp. Parasitol.* 125: 409-412.
- Da Silva, A., G. Vilar, A. Santos, R. Rodrigues, M. Santos & J. Lannes-Vieira. 2010. *Trypanosoma cruzi*-Induced Central Nervous System Alterations: From the Entry of Inflammatory Cells to Potential Cognitive and Psychiatric Abnormalities. *J. Neuroparasitol.* 1: 1-13.
- Darji, A., A. Beschin, M. Sileghem, H. Heremans, L. Brys & P. de Baetselier. 1996. In vitro stimulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei*: active involvement of gamma interferon and tumor necrosis factor in the pathway of suppression. *Inf. Immun.* 64: 1937-1943.
- Darji, A., R. Lucas, E. Magez, J. Torreale, M. Palacios, E. Sileghem, S. Bajyana, R. Hamers & P. De Baetselier. 1992. Mechanisms underlying trypanosome elicited-immunosuppression. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 72: 27-38.
- Davarpanah, M.A., D. Mehrabani, R. Neirami, M. Ghalremanpoori & M. Darvishi. 2007. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in Shiraz, southern Iran. *Iran. Red Crescent Med. J.* 9: 22-27.
- Dedet, J.P. & F. Pratlong. 2005. *Leishmania*, *Trypanosoma* and Monoxenous Trypanosomatids as Emerging Opportunistic Agents. *J. Euk. Microbiol.* 47: 37-39.
- Dubey, J.P. & J.L. Jones. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38: 1257-1278.
- Duncan, M.D. & D.S. Wilkes. 2005. Transplant-related Immunosuppression. A Review of Immunosuppression and Pulmonary Infections. *Proc. Am. Thor. Soc.* 2: 449-455.
- Elmore, S.A., J.L. Jones, P.A. Conrad, S. Patton, D.S. Lindsay & J.P. Dubey. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects and prevention. *Trends Parasitol.* 26: 190-196.

- Fazzani, C., P.A. Guedes, A. Senna, E.B. Souza, H. Goto & J.A.L. Lindoso. 2011. Dynamics of immunosuppression in hamsters with experimental visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol.* 44: 666-670.
- Ferreira, M.S. & A.S. Borges. 2002. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 443-457.
- García de la Fuente, I., M. Ansari, A.L. Rougemont, R.J. Passweg, F. Gunny-Pause, H. Ozsahin, J. Lohrinus & K. Posfay-Barbe. 2010. Acute Disseminated Fatal Toxoplasmosis After Haploidentical Stem Cell Transplantation Despite Atovaquone Prophylaxis in A Young Man. *Ped. Inf. Dis. J.* 29: 1059-1060.
- Guerrero-Bernudez, O.M., M. Chinchilla-Carmona & A. Castro-Castillo. 1995. Age influence in the natural resistance of white rat and mice to the protozoan *Toxoplasma gondii*. *Rev. Biol. Trop.* 43: 1-3.
- Guerrero, O.M., M. Chinchilla & E. Abrahams. 1997. Increasing of *Toxoplasma gondii* (Coccidia, Sarcocystidae) infections by *Trypanosoma lewisi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in white rats. *Rev. Biol. Trop.* 45: 877-882.
- Grimwade, K., N. French, D.D. Mbatha, D.D. Zungu, M. Dedicoat & C.F. Gilks. 2004. HIV infection as a cofactor for severe falciparum malaria in adults living in a region of unstable malaria transmission in South Africa. *AIDS* 18: 547-554.
- Gross, N., O.M. Guerrero, M. Chinchilla & C. Jarstrand-Hall. 2006. *Trypanosoma lewisi*-induced immunosuppression: The effects on alveolar macrophages activities against *Cryptococcus neoformans*. *Exp. Parasitol.* 113: 262-266.
- Holland, G.N. 2003. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.* 136: 973-88.
- Holst, I. & M. Chinchilla. 1990. Development and distribution of cysts of an avirulent strain of *Toxoplasma* and the humoral immune response in mice. *Rev. Biol. Trop.* 38: 189-93.
- Jayawardena, S., S. Singh, O. Burzyantseva & H. Clarke. 2008. Cerebral Toxoplasmosis in Adult Patients with HIV Infection, p. 17-24. In M.A. Perazella (ed.). Resident Grand Rounds. Series.
- Kaňková, Š., V. Holáň, A. Zajíčková, P. Kodým & J. Fleg. 2010. Modulation of immunity in mice with latent toxoplasmosis -the experimental support for the immunosuppression hypothesis of *Toxoplasma*-induced changes in reproduction of mice and humans. *Parasitol. Res.* 107: 1421-142.
- Kretzli, A.U. 1977. Exacerbation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice by concomitant malaria. *J. Protozool.* 24: 514-518.
- Mabbott, N.A., I.A. Sutherland & J.M. Sternberg. 1995. Suppressor macrophages in *Trypanosoma brucei* infection: nitric oxide is related to both suppressive activity and lifespan in vivo. *Parasite Immunol.* 17: 143-50.
- Manzano-Alonso, M.L. & G. Castellano-Tortajada. 2011. Reactivation of hepatitis B virus infection after cytotoxic chemotherapy or immunosuppressive therapy. *World J. Gastroenterology* 17: 1531-1537.
- Ndarathi, C.M. 1991. Suppressor and protector factors derived from *Trypanosoma lewisi*. *Int. J. Parasitol.* 21: 736-69.
- Oliveira, R.A., L.S.V. Silva, V.P. Carvalho, A.F. Coutinho, F.G. Pinheiro, C.G. Lima, J.E. Leandro Jr, G.B. Silva Jr. & E.F. Daher. 2008. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. *Transplant. Inf. Dis.* 10: 364-368.
- Otieno, R.O., C. Ouma, J.M. Ongecha, C. Keller, T. Were, E.N. Waindi, M. Michaels, R.D. Day, J.M. Vulule, D.J. Perkins & J. Douglas. 2006. Increased severe anemia in HIV-1-exposed and HIV-1-positive infants and children during acute malaria. *AIDS* 20: 275-280.
- Raju, R.G., F.E. Chaudhary, F.E. Bilimoria & S.K. Katare. 2008. Diffuse cutaneous leishmaniasis: Co-infection with human immunodeficiency virus (HIV) Ind. *J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74: 641-643.
- Ríos-Carrera, N.J., M. Chinchilla, O.M. Guerrero & A. Castro. 2009. Efecto inmunosupresor de *Trypanosoma lewisi* (Kinetoplastidae) sobre la multiplicación de *Toxoplasma gondii* (Sarcocystidae) en macrófagos alveolares y peritoneales de rata blanca *Rev. Biol. Trop.* 57: 13-22.
- Ruano, A.L., T. Martín, J. Pardo, J. López-Albán & A. Muro. 2005. Avances en el estudio de la estrogiloidosis. *Enf. Emerg.* 7: 102-109.
- Sitoe, S.P.B.L., B. Rafael, L.R. Meireles, H.F. de Andrade Jr. & R. Thompson. 2010. Preliminary report of HIV and *Toxoplasma gondii* occurrence in pregnant women from Mozambique. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52: 291-295.
- Solène, P.D., J.P. Gangneux, S. Lavoué, B. Lelong, C. Guiguen, Y. le Tulzo & F.R. Gangneux. 2010. Correlation of Parasite Load Determined by Quantitative PCR to Clinical Outcome in a Heart Transplant Patient with Disseminated Toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 48: 2541-2545.

- Sztejn, M.B. & F. Kierszenbaum. 1993. Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infections. *Parasitol. Today* 9: 424-428.
- Uzonna, J.E., S.R. Kaushik, Y. Zhang, J.R. Gordon & H. Tabel. 1998. Experimental murine *Trypanosoma congolense* infections. II. Role of splenic adherent CD3⁺Thy1.2⁺ TCR- $\alpha\beta\gamma\delta$ ⁻ CD4⁺8⁻ and CD3⁺Thy1.2⁺TCR- $\alpha\beta\gamma\delta$ ⁻ CD4⁺8⁺ cells in the production of IL-4, IL-10, and IFN- γ and in Trypanosome-elicited immunosuppression. *J. Immunol.* 161: 6189-6197.
- Viens, P.G., A.T. Targett, E. Leuchar & A.J.S. Davies. 1974. The immunological response of CBA mice to *Trypanosoma musculi*. Initial control of the infection and the effect of t-cell deprivation. *Clin. Exp. Immunol.* 16: 279-294.
- Zapata, M., L. Reyes & I. Holst. 2005. Disminución en la prevalencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en adultos del valle central de Costa Rica. *Parasitol. Latinoam.* 60: 32-37.
- Zhao, Y., D. Wilson, S. Matthews & G.S. Yap. 2007. Rapid Elimination of *Toxoplasma gondii* by Gamma Interferon-Primed Mouse Macrophages is Independent of CD40 Signaling. *Infect. Immun.* 75: 4799-4803.