

Efecto de la infección con *Eimeria falciformis* sobre el desarrollo de la Toxoplasmosis en ratón

Misael Chinchilla C., Olga Marta Guerrero B. y Roberto Marín R.

Centro de Investigación y Diagnóstico en Parasitología (CIDPA). Depto. Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(Recibido: 21 de enero de 1985)

Abstract: White mice previously infected with 10^2 , 10^3 or 10^4 *Eimeria falciformis* oocysts on days 0, 5, 10 or 30 were inoculated per os with 10^1 , 10^2 , 10^3 or 10^4 *Toxoplasma* oocysts. While the results obtained for mice with higher *Toxoplasma* inocula were consistent, animals with 10^1 and 10^2 oocysts previous inoculation with *Eimeria* showed important differences related with those infected only with *Toxoplasma*. For example, survival time was higher in animals infected with both parasites, especially if inoculated with *Eimeria* 30 days before *Toxoplasma* infection. Furthermore the number of *T. gondii* cysts found in the animals previously infected with *Eimeria* was lower compared with mice inoculated with *Toxoplasma* only. Body weight of mice infected with *Toxoplasma* previous infection with *Eimeria* was almost normal in relation to those infected only with *Toxoplasma*, indicating a probable pathological effect due to the parasite, more evident in "non immunized" mice.

Al dilucidarse la posición taxonómica del *Toxoplasma gondii* y su relación biológica con el gato (Frenkel, 1973) se determinó que una de las formas infectantes para los huéspedes intermediarios es el ooquiste eliminado en las heces de felidos (Frenkel *et al.*, 1970; Dubey *et al.*, 1970; Jewel *et al.*, 1972). Los ratones y las ratas, además de las aves, son los huéspedes intermediarios más importantes para el gato (Chinchilla *et al.*, 1981) y dentro de éstos, los ratones (*Mus musculus*), generalmente aparecen infectados con *Eimeria falciformis* y unas 13 especies más de este género (Ernst *et al.*, 1971) todas incluidas en la misma familia a la que pertenece *Toxoplasma* (Frenkel, 1974).

Considerando la frecuencia de *E. falciformis* y su afinidad taxonómica con *Toxoplasma*, hemos pensado en la posibilidad de que la infección previa con este eimeridio pueda inducir algún efecto inhibitorio sobre la infección con *T. gondii*, lo cual puede tener cierta importancia epidemiológica. Los datos obtenidos en los experimentos tendientes a aclarar este problema se dan en este informe.

MATERIAL Y METODOS

Se usaron ratones blancos de la cepa Wistar, (20-25 gr) mantenidos con un alimento concentrado y agua *ad libitum*, y una cepa de *T. gondii* aislada de un buho (*Glaucidium brasilianum*) y productora de ooquistes en el gato y de quistes en el huésped intermediario. Los animales fueron inoculados por vía oral con 10^5 , 10^6 y 10^7 ooquistes maduros.

La cepa de *E. falciformis* fue aislada de un ratón (*Mus musculus*) capturado en una casa de habitación y fue inoculada por vía oral en concentraciones de 10^2 , 10^3 y 10^4 ooquistes previamente madurados y con una viabilidad de 90 a 95%.

Grupos de 10 animales fueron inoculados por vía oral con ooquistes de *E. falciformis* en las concentraciones mencionadas, 30, 10, 5 y 0 días antes de infectarlos con *T. gondii*. La infección fue controlada recogiendo las heces de los animales en tubos con 1 ml de solución salina al 0,85%, debidamente pesados estableciendo luego el peso de la muestra para así determinar el número de ooquistes por gramo de heces. La sobrevivencia de los animales fue

cuidadosamente determinada y de los que murieron de infección aguda se fijaron los órganos en formol al 10% pH 7,0 para estudio histopatológico. Los demás fueron sacrificados a los 30 días. En estos ratones se estudió el número de quistes presentes en el cerebro de acuerdo con el siguiente método: el animal fue pesado, así como su cerebro. Tres porciones de este órgano, cuyo peso fue también establecido, fueron estudiadas contando a fresco el número de quistes en un montaje entre lámina y laminilla y calculando luego el número promedio de quistes por gramo de cerebro y por cerebro de cada ratón.

Estos ratones también fueron sangrados del corazón para el análisis seriológico por medio de la prueba de Sabin-Feldman (1948). Los datos fueron tabulados y analizados usando la prueba t de Student (Hill, 1966) para la determinación de diferencias entre dos medias.

RESULTADOS

Infección con *E. falciformis*. (Fig. 1): Al analizar la cantidad de ooquistes obtenidos en las heces, se observó una concordancia entre el inóculo y la eliminación de ooquistes en las heces. Muy pocos animales murieron durante el período de infección con *Eimeria* previo a la inoculación con *Toxoplasma*.

Infección con *T. gondii*: a) En la sobrevivencia de los animales inoculados con *Toxoplasma* previa infección con *Eimeria* se observó que para inóculos de 10^1 y 10^2 ooquistes de *Toxoplasma* los animales infectados 30, 10 ó 5 días antes con *E. falciformis* (10^2 , 10^3 y 10^4 ooquistes) sobrevivieron un tiempo significativamente mayor que los del testigo (Fig. 2). Los resultados de los animales inoculados con 10^3 ooquistes de *Toxoplasma* fueron muy variables y la sobrevivencia en los ratones infectados con 10^4 ooquistes de *Toxoplasma* fue similar, independientemente del inóculo de *Eimeria*.

Cuando la infección con los dos coccidios fue simultánea (Fig. 2d), la sobrevivencia de los animales inoculados con *Eimeria* fue menor que los testigos, (excepto en la infección con 10 ooquistes de *Toxoplasma*. En un experimento confirmatorio en que la infección con 10^1 , 10^2 y 10^4 ooquistes de *E. falciformis* se hizo únicamente 30 días antes de la inoculación del *Toxoplasma*, los ratones no infectados con

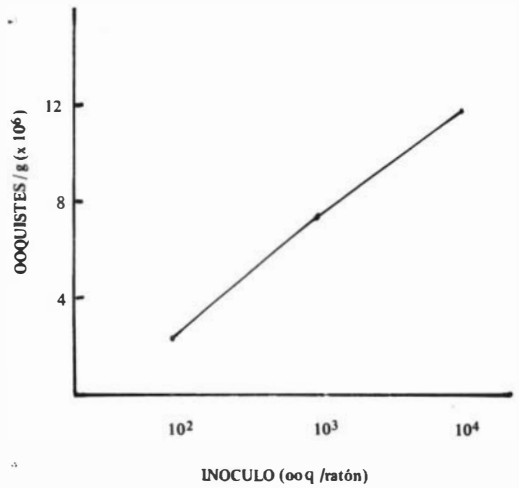
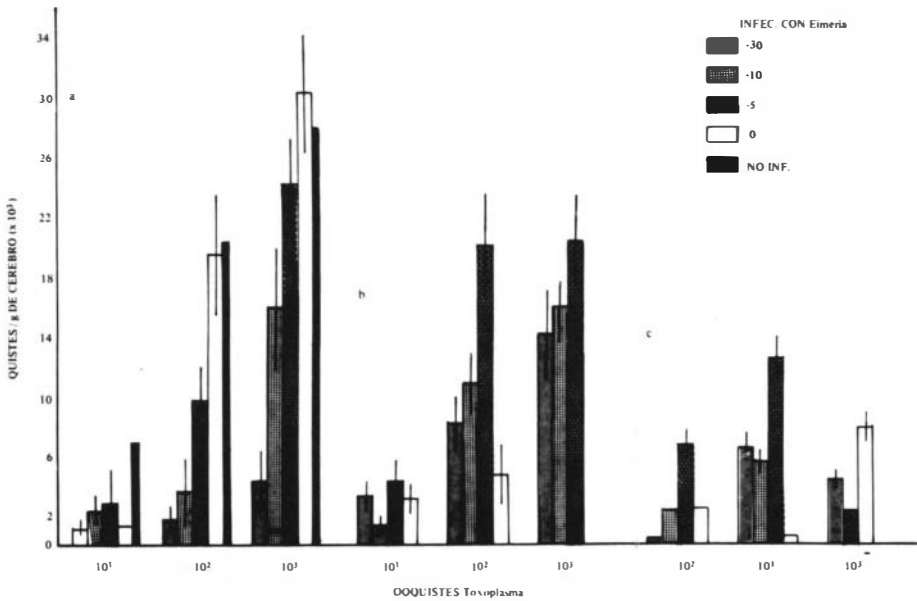
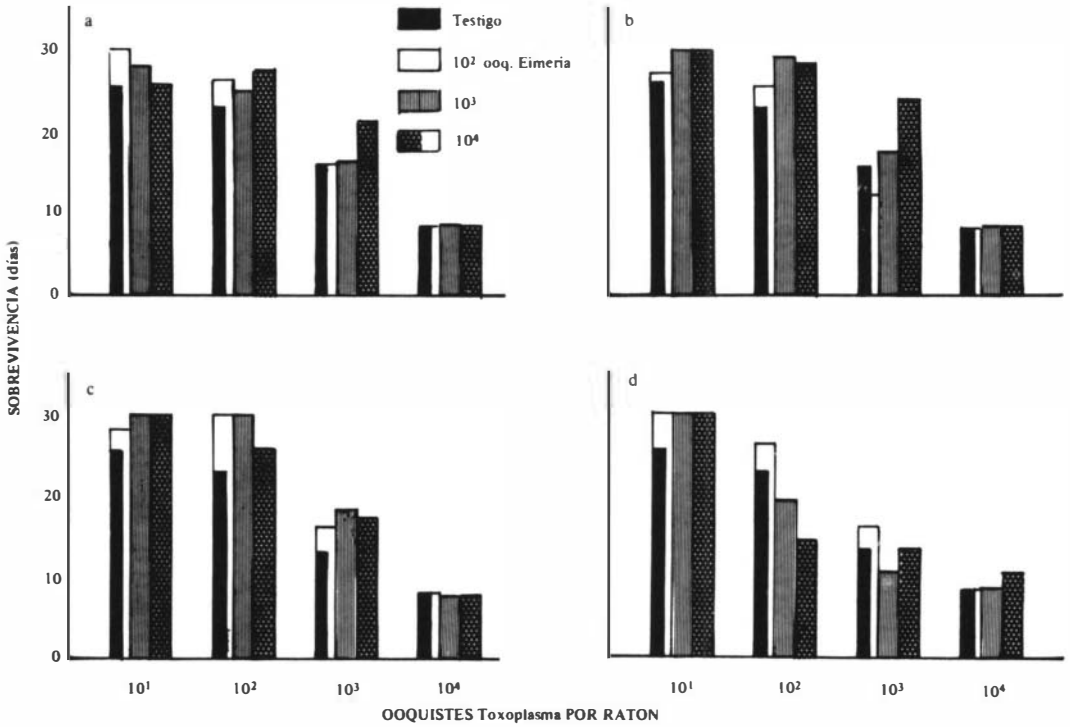


Fig. 1. Relación entre el número de ooquistes de *E. falciformis* inoculados y el obtenido por gramo de heces.

Eimeria murieron más rápidamente que los infectados y no hubo sobrevivientes a infecciones con 10^4 ooquistes de *Toxoplasma*.

Presencia de quistes en el cerebro (Fig. 3): en animales inoculados con 10 ooquistes de *Toxoplasma* (previa infección con 10^2 o 10^3 ooquistes) el número de quistes fue ligeramente menor que el de los ratones no infectados con *E. falciformis*. Esta diferencia fue mucho más evidente cuando se usó un inóculo de 10^2 ooquistes de *Toxoplasma*. En este caso se notó que el número de quistes fue inversamente proporcional al tiempo de infección previa. Hubo resultados similares cuando la infección fue de 10^3 ooquistes de *Toxoplasma*. Debido a la muerte temprana de los animales inoculados con 10^4 ooquistes, no se les hizo cómputo.

El número de quistes de *E. falciformis* en el cerebro (animales con 10^4 ooquistes) fue considerablemente menor que en los casos anteriores (Fig. 3c) y los resultados fueron muy variables. Los individuos infectados con *Toxoplasma* y *Eimeria* sacrificados 30 días después de la infección, tuvieron un peso mayor que los testigos (Fig. 4). Cuanto mayor fue el tiempo previo de la infección con el eimeridio, mayor fue el peso. El grupo en que ambos coccidios fueron inoculados el mismo día, mostró mayor disminución en el peso. También se observó que en los animales inoculados con el mayor número de ooquistes de *E. falciformis* (10^4), esta diferencia de peso fue más notoria (Fig. 4c). La



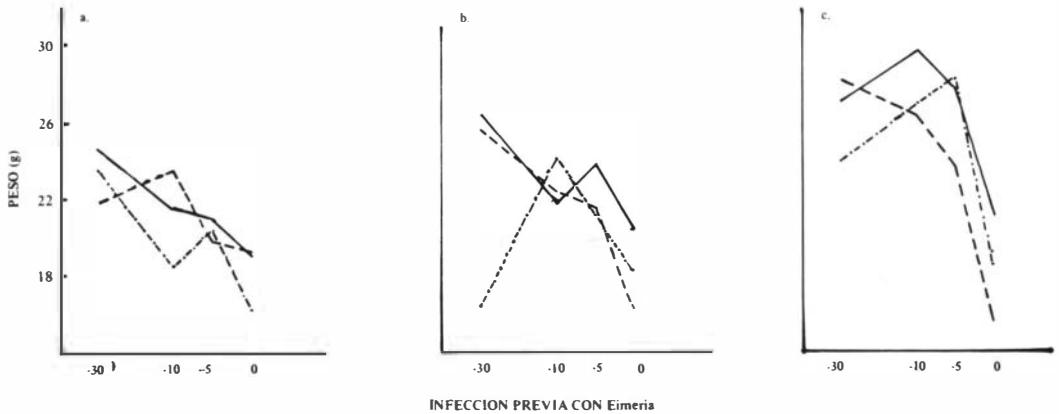


Fig. 4. Correlación entre el inóculo de ooquiste de *Toxoplasma* inoculados y el número de quistes cerebrales obtenidos en varias especies animales: ——— ratón blanco - - - - - ratón C₃H -| -| -| -| ratón hamster

prueba de Sabin-Feldman fue positiva en todos los grupos inoculados con *Toxoplasma*, pero no en los infectados solamente con *E. falciiformis*.

En un experimento en que grupos de ratones fueron infectados con 10^1 , 10^2 y 10^4 ooquistes de *E. falciiformis*, se observó que el número de quistes en el cerebro fue mucho mayor (15.517 quistes/g) en los testigos no infectados con *Eimeria* que en los inoculados previamente con cualquiera de las concentraciones de este último coccidio (5.807 a 11.100 quistes/g).

DISCUSION

El gato y los roedores juegan un papel preponderante en la epidemiología de la toxoplasmosis (Frenkel, 1973), pues en los órganos de los roedores se desarrollan los quistes que representan el estado evolutivo infectante para el gato (Dubey *et al.*, 1970). El roedor se infecta al ingerir los ooquistes presentes en las heces del felino, dando origen a un período de desarrollo de *Toxoplasma* a nivel intestinal, lo que nos indujo a pensar en un efecto competitivo por parte de otro eimeridio también intestinal. Además se han demostrado fenómenos de protección inmunológica no sólo homólogos en infecciones con *E. falciiformis* (Omata *et al.*, 1981; Mesfin *et al.*, 1979) sino cruzadas entre *Toxoplasma* y otros Coccidia (Christie & Dubey, 1977; Dubey, 1981).

Puede pensarse entonces en algún efecto inhibitorio de la *E. falciiformis* sobre *Toxoplasma*, lo que establece la posibilidad de aumentar la transmisión de este último en nuestro medio en que se ha encontrado un 2% de ratones naturalmente infectados (Chinchilla, 1978). En

efecto la inhibición de *Toxoplasma* redundará en un mayor número de roedores crónicamente infectados.

Como el inóculo podría ser importante en este fenómeno se usaron diferentes concentraciones de *E. falciiformis* que como se observa en la figura 1 dan origen a diferentes número de ooquistes en las heces. Esto corresponde a un grado de infección escalonada. Si esto no hubiera sucedido, y todos los inóculos hubieran originado igual infección, no habría razón para determinar si el número de ooquistes de *Eimeria* podría influir en la infección toxoplasmática.

Un leve pero constante efecto se observó en los animales infectados con *Toxoplasma* previa infección con *E. falciiformis*, ya que la sobrevivencia fue menor en los grupos testigo (Fig. 2) y los pesos de los animales sobrevivientes fueron mayores en aquellos con más largo período de infección previa (Fig. 4). Esto se notó mejor en el caso de los animales infectados con 10^2 o 10^3 ooquistes de *Toxoplasma*. Sin embargo el efecto no fue visible cuando la infección de ambos coccidios fue hecha simultáneamente (Figura 2d) lo que indica la necesidad de una infección previa con *Eimeria* para el desarrollo de alguna resistencia.

Datos comparativos de sobrevivencia obtenidos por nosotros, en animales infectados con ooquistes en concentraciones diversas, indican también que la sobrevivencia a *Toxoplasma* de los ratones previamente infectados con *E. falciiformis* fue relativamente mayor.

El efecto se pudo observar mejor en inóculos intermedios del *T. gondii* (10^2 y 10^3 ooquistes), lo cual es comprensible por cuanto

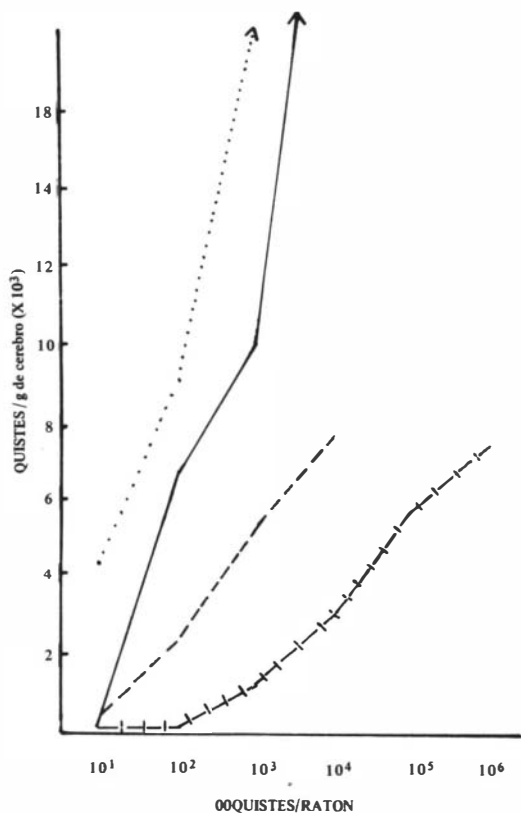


Fig. 5. Peso de los ratones después de 30 días de infección con *Toxoplasma*, relacionado con el tiempo de previa infección con *E. falciiformis*:

- 10¹ oocistos de *Toxoplasma*
 - - - 10² oocistos de *Toxoplasma*
 - · - · 10³ oocistos de *Toxoplasma*
 a. 10² oocistos de *E. falciiformis* inoculados
 b. 10³ oocistos de *E. falciiformis* inoculados
 c. 10⁴ oocistos de *E. falciiformis* inoculados

10 oocistos son fácilmente manejables para el roedor, y 10⁴ por el contrario, producen una infección tan violenta que el animal no es capaz de desarrollar los fenómenos de resistencia, y no hay entonces diferencias entre los grupos testigos.

El número de quistes, estado evolutivo principal por el cual los ratones son fuente de infección para el gato (Dubey y Frenkel, 1972) es otro parámetro para medir la infección (Fig. 3).

Hemos observado previamente que el número de quistes producidos en el cerebro por la cepa usada en el estudio es directamente proporcional al inóculo de oocistos administrado oralmente (Fig. 5). Esta relación se mantuvo también en este estudio.

El hecho de que el número de quistes de *Toxoplasma* observados en el cerebro de los ratones fuera menor cuanto mayor fue el período de infección previa con *E. falciiformis*, sugiere un efecto debido a una inmunidad adquirida, producto de una reacción cruzada entre ambos coccidios. Esto es importante porque las diferentes cepas de *T. gondii* no son igualmente virulentas (Lunde y Jacobs, 1965; Thiermann, 1975; Waldeland *et al.*, 1983) y porque siempre van a matar al ratón. Este efecto inmunitario producido por una *Eimeria* tan frecuente en los ratones, aumentaría su probabilidad de sobrevivencia, lo que ayudaría al mantenimiento de la fuente de infección en la naturaleza (Ruiz y Frenkel, 1980).

Infecciones de 10⁴ oocistos de *E. falciiformis* más bien aceleraron la muerte de los ratones debido probablemente a que la misma patología que este parásito produce (Cordero del Campillo, 1959) se asocia a la acción propia de *Toxoplasma*, exacerbándose ambas infecciones concomitantemente.

Probablemente otras especies del género *Eimeria* presentes en el ratón podrían inducir el mismo efecto (Ernst *et al.*, 1971; Todd y Lepp, 1971).

Aunque otros animales como las aves y las ratas (Chinchilla *et al.*, 1981) se han adaptado muy bien a *Toxoplasma*, siendo una importante fuente de infección latente, creemos que la posibilidad de mantenimiento de este parásito en los ratones es más importante porque ellos son la caza más común de los gatos pequeños que se infectan comúnmente antes de los tres meses (Frenkel y Ruiz, 1980) y que diseminan esta parasitosis.

RESUMEN

Se inoculó ratones blancos con 10², 10³ y 10⁴ oocistos de *Eimeria falciiformis* y luego con 10¹, 10², 10³ o 10⁴ oocistos de *Toxoplasma gondii*, a diferentes períodos después del inóculo con el primer parásito.

En los animales inoculados con las más altas concentraciones de *Toxoplasma* no se observó variaciones significativas. Sin embargo, en los animales inoculados con 10¹ y 10² oocistos de este último parásito, hubo algunos efectos importantes debidos a la inoculación previa con *E. falciiformis*. Así animales infectados 30 días antes con este parásito presentaron una sobrevivencia mayor al *Toxoplasma* y el número

de quistes encontrados en el cerebro fue considerablemente menor que en los testigos. Adicionalmente el peso de estos últimos fue menor que los previamente infectados con *Eimeria*, indicando una menor patología presente debida a una menor infección por *Toxoplasma*.

REFERENCIAS

- Chinchilla, M. 1978. Epidemiología de la toxoplasmosis en Costa Rica: importancia de los roedores domésticos. *Rev. Biol. Trop.* 26: 113-124.
- Chinchilla, M., M. Alfaro & O. M. Guerrero. 1981. Adaptación natural de la rata blanca a *Toxoplasma gondii*. *Rev. Biol. Trop.* 29: 273-238.
- Christie, E. & J. P. Dubey. 1977. Cross Immunity between *Hammondia* and *Toxoplasma* infection in mice and hamsters. *Inf. Immun.* 18: 412-417.
- Cordero del Campillo, M. 1959. Estudios sobre *Eimeria falciformis* (Eimer 1870) parásito de ratón. I. Observaciones sobre el período pre-patente, esporulación, morfología de los ooquistes y estudio biométrico de los mismos, producción de ooquistes y patogenicidad. *Rev. Iber. Parasitol.* 19: 351-368.
- Dubey, J. P. 1981. Protective Immunity Against Clinical Toxoplasmosis in Dairy Goats Vaccinated with *Hammondia hammondi* and *Hammondia heydorni* Am. J. of Vet. Res. 24: 2068-2070.
- Dubey, J. P. & J. F. Frenkel. 1972. Cyst induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19: 155-177.
- Dubey, J. P., N. L. Miller & J. K. Frenkel. 1970. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.* 56: 447-456.
- Ernst, J. V., B. Chobotar & D.M. Hammond. 1971. The oocyst of *Eimeria vermiformis* sp. n. and *E. papillata* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the mouse *Mus musculus*. *J. Protozool.* 18: 221-223.
- Frenkel, J. K. 1973. *Toxoplasma* in and around us. *Bio-Science* 23: 343-352.
- Frenkel, J. K. 1974. Advances in the Biology of Sporozoa. *Z. Parasitenk.* 45: 125-162.
- Frenkel, J. K. & A. Ruiz. 1980. Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 1167-1180.
- Frenkel, J. K., J. P. Dubey & N. L. Miller. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats. Fecal stages identified as coccidian oocyst. *Science* 167: 893-896.
- Hill, A. B. 1966. Principles of medical statistics, 8th ed. p. 43-151 Oxford University Press. New York.
- Lunde, M. N. & L. Jacobs. 1965. Antigenic relationship of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. *J. Parasitol.* 51: 273-276.
- Jewell, M. L., J. K. Frenkel, V. Reed & A. Ruíz. 1972. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical Felidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 512-517.
- Mesfin, G. M. & E. C. Bellany. 1979. Effects of acquired resistance on infection with *Eimeria falciformis* var. *pragensis* in mice. *Infect. Immun.* 23: 108-114.
- Omata, Y., K. Yagami, Y. Takei, N. Suzuki & T. Nakabayashi. 1981. Protective Reaction Against Malaria infection in Mice Sensitized with Frozen-Thawed. *Toxoplasma* Tachyzoites. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* A250: 223-235.
- Ruíz, A. & J. K. Frenkel. 1980. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 1161-1166.
- Sabin, A. B. & H. A. Feldman. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660-663.
- Thiermann, E. 1975. Virulencia del *Toxoplasma gondii* en 27 cepas de origen humano. *Rev. Med. Chile* 103: 170-174.
- Todd Jr., K.S. & D. L. Lepp. 1971. The life cycle of *Eimeria vermiformis* Ernst, Chobotar and Hammond, 1971 in the mouse *Mus musculus*. *J. Protozool.* 18: 332-337.
- Waldeland, H., E. R. Pfeifferkorn & J. K. Frenkel. 1983. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: Pathogenicity and persistence in mice. *J. Parasitol.* 69: 171-175.