

VALORACION DEL METODO DE SHEATHER PARA CONCENTRACION DE OOQUISTES TOXOPLASMICOS

EVALUATION OF THE SHEATHER METHOD
FOR CONCENTRATION OF OOCYSTS OF
Toxoplasma

FREYRE, A.*

RESUMEN

Se infectaron dos gatos con cerebros de ratones conteniendo quistes toxoplásmicos, para obtener muestras de materia fecal abundantes en ooquistes. Con cantidades medidas de heces, se realizó la concentración de ooquistes según el método de Sheather modificado, sometido a distintas variantes. Se concluye que la sustitución de la solución de sacarosa por solución de NaCl de igual o mayor densidad, altera poco los resultados; la etapa de centrifugación permite aumentar la capacidad de concentración de ooquistes por un factor de 4 ó 5. La extracción sucesiva de la columna de emulsión luego de la centrifugación, no permite una recuperación notoria de ooquistes, pero la re-emulsificación de las heces en un mismo volumen de solución de sacarosa, permite obtener 30% más de ooquistes.

* M.V., Profesor Agregado, Encargado de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, Alberto Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay. Profesor Adjunto, Encargado del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Química de Montevideo.

Palabras claves: OOQUISTES TOXOPLASMICOS, METODO DE SHEATHER, VALORACION.

SUMMARY

Two cats were fed mouse brains with *Toxoplasma* cysts, to obtain fecal samples with high concentration of oocysts. Isolation of oocysts from feces was performed according to the Sheather method, with various modifications. It is concluded that the use of NaCl solutions of the same or higher density than that of the sucrose solution, does not improve the method; centrifugation allows for concentration of 4-5 higher amounts of oocysts. Collection of deeper layers of the column of emulsion after centrifugation is unimportant as regards the amount of oocysts extracted, But re-emulsification in an equal volume of sucrose solution, allows isolation of 30% additional oocysts.

Key words: *TOXOPLASMA* OOCYSTS, SHEATHER METHOD, EVALUATION.

INTRODUCCION

El método de Sheather modificado (3) es actualmente el método de elección para la concentración de ooquistes de *Toxoplasma gondii* a partir de materia fecal de gato, tanto para el diagnóstico rutinario como con fines experimentales.

El objetivo del presente trabajo fue:

1. Verificar la eficacia del método de Sheather modificado para la concentración de ooquistes toxoplásmicos.
2. Determinar la influencia de algunos pasos del método en su capacidad de extracción de ooquistes de muestras de materia fecal. Estas determinaciones tienen interés cuando se desea extraer la máxima cantidad de ooquistes a partir de las muestras de heces, en ensayos en los que se emplee la infección experimental de animales con esta forma evolutiva del parásito.

MATERIALES Y METODOS

Se usaron las cepas T-1 y T-265 de *Toxoplasma*; son derivadas de la cepa M-7741, cuyo origen se ha descrito previamente (4). Los bradizoítos se obtuvieron de ratones albinos de la línea CF-1, con infección toxoplásmica crónica (1). Se utilizaron 2 gatos recién destetados, alimentados con ración comercial seca y seronegativos al test de Sabin y Feldman, para la obtención de ooquistes toxoplásmicos. Para ello, se sacrificaron 4 ratones infectados; se verificó que presentaran quistes toxoplásmicos por búsqueda microscópica en un pequeño trozo de sus cerebros, comprimido entre porta y cubreobjetos. Se suministró el macerado de cerebro de 2 ratones y sus carcasas a cada uno de los dos gatos. A partir del tercer día posinfección (p.i.), se comenzó a examinar las deposiciones de los gatos en busca de ooquistes toxoplásmicos según el método de Sheather modificado (3). Se almacenó a 4 °C la totalidad de las heces depuestas durante los días de máxima excreción de ooquistes (4^º-9^º día p.i.), reuniéndolas en distintos pools. Cada pool fue usado para un ensayo diferente. Los ensayos comenzaron el 9^º día p.i. Fueron los siguientes:

Ensayo A. Comparación de la solución de sacarosa $d = 1,15$ con la solución de NaCl de $d = 1,15$ y $d = 1,2$. Esta comparación se efectuó basándose en la observación de que el peso específico del ooquiste toxoplásmico es de 1,11 (2). Tuvo por objetivo discernir si la diferente viscosidad de las soluciones testadas influía en el procedimiento de concentración de ooquistes. Para ello, se homogeneizaron 180 g de materia fecal con ooquistes en un mortero, con mano de loza y espátula. Se maceraron porciones de 60 g con 250 cc de cada una de las soluciones concentradoras, durante 30 minutos. Pasado este lapso, se filtró con una gasa, y el filtrado se distribuyó equitativamente en 5 tubos de centrífuga de 10 cm de altura y 3 cm de diámetro. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos. Con una pipeta Pasteur provista de un bulbo de goma, se retiraron los 3 cc más superficiales de la columna de emulsión de cada uno de los 5 tubos de centrífuga, reuniendo las alícuotas. Se contaron la totalidad de ooquistes en 5 cámaras de Neubauer, para cada una de las tres emulsiones.

Ensayo B. Influencia de la etapa de centrifugación en la capacidad de concentración del método. Se procedió como en el ensayo A. Todas las

series fueron hechas con el mismo pool de heces, y guardando estrictamente la misma relación heces:solución concentradora (peso:volumen). Las diferencias consistieron en que se compararon la solución de NaCl $d = 1,2$ con y sin centrifugación, con la solución de sacarosa $d = 1,15$, con centrifugación. Para ello se prepararon 3 series, cada una de 5 tubos de centrífuga cargados con emulsión de materia fecal con ooquistes en NaCl.

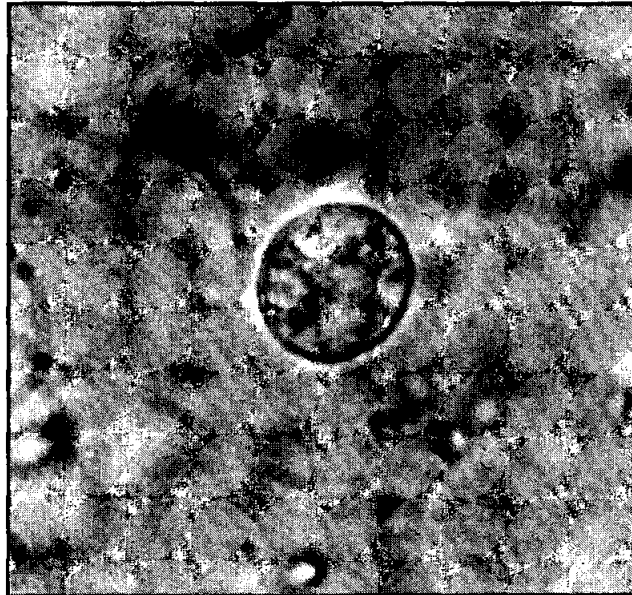
- Serie 1: se mantuvo en posición vertical durante 15 minutos.
- Serie 2: se mantuvo en posición vertical durante 30 minutos.
- Serie 3: se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos.
- Serie 4: constituida por 5 tubos con emulsión hecha con solución de sacarosa, se centrifugó como la Serie 3.

Luego se determinó en cada una de las series la concentración de ooquistes, en la forma establecida en el ensayo A.

Ensayo C. Influencia de algunos pasos de la técnica de Sheather modificada, en su capacidad de extracción de ooquistes a partir de la materia fecal.

C.1. Concentración en sucesivas capas de sobrenadante. Para este ensayo, se procesó una serie de 5 tubos de centrífuga con solución de sacarosa, en la forma habitual (3). luego de la centrifugación, se retiraron los primeros 3 cc de la columna de emulsión de cada tubo de centrífuga, con los que se hizo un pool, a partir del cual se cargaron cinco cámaras de Neubauer, contando los ooquistes. Luego se retiraron los siguientes 3 cc de la columna de emulsión, y se procedió a determinar su concentración en ooquistes, en la misma forma.

C.2. Re-emulsificación de las heces. Se procesaron 100 g de materia fecal, los que se maceraron con 400 cc de solución de sacarosa $d = 1,15$. La emulsión se repartió equitativamente en 8 tubos de centrífuga. Luego de centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos, se tomaron alícuotas de 3 cc de cada tubo, en las que se determinó la concentración de ooquistes con la cámara de Neubauer. Luego, la materia fecal retenida en los filtros se reunió, y se volvió a procesar con un volumen igual de solución de sacarosa, hasta determinar su concentración en ooquistes.



FOTOGRAFIA 1. Ooquiste toxoplásmico, en solución de sacarosa $d = 1,15$. 1.000 X.

RESULTADOS

Los resultados que se expresan a continuación, son en cada caso el promedio del recuento de ooquistes (fotografía 1), en cinco cámaras de Neubauer, o sea en un área de 9 mm^2 , y en un volumen de $0,9 \text{ mm}^3$.

Ensayo A

Solución de sacarosa $d = 1,15$	26,8 ooquistes
Solución de NaCl $d = 1,15$	22,6 ooquistes
Solución de NaCl $d = 1,20$	29,6 ooquistes

Ensayo B

Serie 1	21 ooquistes
Serie 2	25 ooquistes
Serie 3	132 ooquistes
Serie 4	108 ooquistes

Ensayo C

C.1. Primeros 3 cc de la columna de emulsión	147,5 ooquistes
Siguietes 3 cc de la misma columna	22 ooquistes
C.2. Primera emulsión	95 ooquistes
Segunda emulsión	33 ooquistes

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Del ensayo A, se interpreta que la sustitución de la solución de sacarosa por solución de NaCl de igual o mayor densidad, no altera notoriamente los resultados. En cambio, la mayor diferencia de refringencia entre el ooquiste y la emulsión con sacarosa en la cámara de Neubauer, facilita el reconocimiento del ooquiste, respecto a la solución de NaCl.

Se concluye del ensayo B, la importancia fundamental de la etapa de centrifugación del método de Sheather, por cuanto aumenta su capacidad de concentración por un factor de 4 ó 5.

El ensayo C permitió conocer que una segunda extracción en la columna de emulsión, luego de centrifugada, lleva a la recuperación de aproximadamente 1/7 de los ooquistes obtenidos en una primera extracción. La re-emulsificación de las heces permite obtener 30% más de ooquistes. Estas conclusiones pueden ser de utilidad cuando se desea extraer la mayor cantidad posible de ooquistes a partir de las materias fecales colectadas, en particular si estas últimas han sido emitidas en escasa cantidad o conteniendo baja concentración de ooquistes.

AGRADECIMIENTO

El autor desea reconocer el asesoramiento del Profesor J. K. Frenkel, Departamento de Patología de la Universidad de Kansas, durante la ejecución del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) DUBEY, J. P., FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19: 155-177, 1972.
- (2) FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P., MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii*: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167: 893-896, 1970.
- (3) FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis. *In* Kirk (ed.), *Current Veterinary Therapy. VI. Small Animal Practice*, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1977. p. 1318-1324.
- (4) MILLER, N. L., FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J. Parasitol.* 58: 928-937, 1972.