

COMUNICACIONES BREVES

CRIOCONSERVACION DE *TOXOPLASMA GONDII*

Sofía Duque Beltrán*, María Mercedes Santacruz Chaves**,
Augusto Corredor Arjona***

Toxoplasma gondii fue criopreservado en nitrógeno líquido usando como preservativo glicerol al 10% con el fin de mantener el protozoo por un largo período de tiempo. El descongelamiento de *T. gondii* se llevó a cabo, cuando los parásitos fueron requeridos para uso como antígeno, a los 10, 40 y 270 días siguientes a su criopreservación. La viabilidad y patogenicidad del parásito fue confirmada in vivo. La criopreservación de *T. gondii* disminuyó los costos de mantenimiento in vivo y de recursos humanos tanto en el bioterio como en el laboratorio.

INTRODUCCION

La introducción del método de criopreservación a bajas temperaturas en nitrógeno líquido permite mantener viables algunos protozoos parasitarios (*Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp., *Plasmodium* sp., etc.) obviando el mantenimiento de éstos en medios de cultivo, con continuos repiques o por pases sucesivos en animales de laboratorio, lo cual trae ventajas económicas ya que ahorra reactivos y tiempo de trabajo. La congelación en nitrógeno líquido conserva inalterable la estructura antigénica y otras características fisiológicas de los parásitos anteriormente enunciados permitiendo el uso de éstos en innumerables experiencias (1 - 4).

La criopreservación en nitrógeno líquido (-196 °C) de algunos parásitos, requiere de un preservativo tal como el glicerol o el dimetil-sulfóxido (DMSO) para proteger el microorganismo durante el proceso de congelación, mantenimiento y descongelación así como de un proceso de enfriamiento lento (5). Estudios de Camargo M. en 1983 (comunicación personal), permitieron conocer que el *Toxoplasma* se podía criopreservar en glicerol

al 10%. La tasa de enfriamiento y la composición del medio en los cuales los organismos se suspenden en el proceso de congelación son factores importantes en la supervivencia de los parásitos (6).

La criopreservación del *Toxoplasma gondii* data desde 1947 cuando se le intento mantener a bajas temperaturas -70 °C sin lograr su conservación a pesar de que resistió el enfriamiento, las sucesivas y lentas descongelaciones pero no su almacenaje por largos periodos de tiempo (4).

El objetivo primordial del presente trabajo fue el de estandarizar y evaluar la metodología descrita en el estudio para criopreservar el *T. gondii* en nuestro medio.

MATERIALES Y METODOS

La criopreservación de *T. gondii* se realizó el 16 de mayo de 1985 y la descongelación del parásito se llevó a cabo en los siguientes periodos de tiempo: 10, 40 y 270 días posteriores a la criopreservación.

* Biología, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud.

** Bacterióloga, Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud.

*** Médico Cirujano, Jefe Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Profesor Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

1. Obtención de antígeno de *T. gondii* (7)
 - a. Limpiar con alcohol yodado al 2% la superficie ventral del ratón.
 - b. Cortar cefalocaudalmente la piel ventral del ratón y epararla lateralmente con el fin de dejar libre la membrama peritoneal.
 - c. Introducir intraperitonealmente 2 ml de solución fisiológica.
 - d. Realizar pequeños masajes en el vientre.
 - e. Por un costado extraer el máximo de exudado evitando lesionar cualquier órgano.

2. Selección del antígeno

Colocar una gota del exudado entre lámina y laminilla y observar el microscopio para determinar:

- a. Grado de contaminación
- b. Número de parásitos por campo de 40X
- c. Viabilidad.

Si se observa contaminación agregar cloramfenicol al 1% al exudado obtenido, inocular intraperitonealmente 0.1 ml de éste a ratones de 25-30 días de edad evitando puncionar el intestino que es la causa más frecuente de contaminación. A las 48-72 horas siguientes a la inoculación extraer el exudado lo más puro posible de células y microorganismos siguiendo el proceso descrito en el numeral 1.

Para criopreservación se requieren de 40-50 parásitos por campo de 40X y sin contaminación.

3. Criopreservación

- a. Agregar glicerol puro al exudado hasta obtener una concentración final del 10%.
- b. Mezclar muy bien.
- c. Repartir la mezcla en cantidades de 1 ml en viales de polipropileno rígido.

- d. Refrigerar a 4 °C durante 20 minutos.
- e. Congelar a -70 °C durante 24 horas.
- f. Criopreservar a -196 °C en nitrógeno líquido.

4. Descongelación

Para la obtención del *Toxoplasma* después de criopreservado se lleva a cabo el siguiente proceso:

- a. Descongelar un vial rápidamente a 37 °C en baño de maría.
- b. Colocar una gota de la muestra descongelada entre lámina y laminilla y observar al microscopio la viabilidad.
- c. Inocular individualmente 0.1 ml del exudado a ratones de 18-21 días de edad.

Se llevaron a cabo tres inoculaciones de *T. gondii* en grupos de 8 ratones, descongelando el parásito a los 10, 40 y 270 días de haberse criopreservado.

- d. A partir del cuarto día se observaron diariamente los ratones con el fin de analizar el estado vital de los mismos.

RESULTADOS

La patogenicidad y viabilidad del *Toxoplasma gondii* después de descongelado se verificó por el comportamiento de éste en los ratones inoculados.

De los ocho ratones inoculados uno de ellos fue francamente positivo y otro presentó escasa positividad (1-2 taquizoitos por campo de 40X) a los dos días siguientes de la inoculación; un tercero fue positivo a los tres días con una positividad de 9 taquizoitos por campo de 40X, de los otros cuatro se obtuvo el total del exudado confirmándose su positividad.

El último ratón al sexto día presentó una positividad de 40-50 parásitos por campo como es requerido para sucesivas inoculaciones en ratones y posteriores criopreservaciones. El exudado peritoneal de este último, el cual había sido inoculado a un segundo grupo de 8 ratones

reveló positividad a los 2 días siguientes de dicha inoculación con las características requeridas para sucesivas inoculaciones *in vivo*. El mismo fenómeno fue observado a través de tres distintas inoculaciones en tres diferentes grupos de ratones dentro de un período de quince días.

Una nueva verificación de la confiabilidad de la metodología se obtuvo a los cuarenta días de haberse crioconservado el parásito. El tercer grupo de ratones fue positivo a los cinco días siguientes de la inoculación del *Toxoplasma* descongelado, día en el cual el cuarto grupo de ratones fue inoculado con el exudado peritoneal de éstos, para luego reafirmar la positividad *in vivo* dentro del mismo período al presentado por el tercer grupo de ratones.

La confiabilidad de la metodología, la viabilidad y patogenicidad del *Toxoplasma gondii* a los 270 días de haberse crioconservado el parásito fue la misma a la verificada en los procesos anteriores.

DISCUSION

La metodología anteriormente descrita ofrece una gran confiabilidad y reproducibilidad, conservando la viabilidad y patogenicidad del parásito *in vivo*. Además brinda ventajas tanto laborales como económicas. Disminuye costos no sólo en la producción y mantenimiento de ratones, lo cual demanda una buena inversión de capital, sino también en recursos humanos pues un mismo operario puede llevar a cabo: crioconservación, descongelación, inoculación del parásito en ratones y el mantenimiento de la cepa en sus respectivos repiques hasta la obtención de una gran cantidad de antígeno el cual puede ser congelado en condiciones óptimas, en cualquier región, anotando que este proceso toma un tiempo aproximado de 17 días.

Es importante comentar, que desde 1985 hasta la fecha, la metodología de crioconservación estandarizada y evaluada en el presente trabajo ha sido funcional.

El método de crioconservación es de gran utilidad ya que el material congelado puede ser empleado en diferentes períodos a través del tiempo y permite la ampliación del empleo de los ejemplares congelados no sólo para obtención de antígeno sino también para estudios de

inmunidad, patogenicidad y muchas otras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con los auspicios del Instituto Nacional de Salud.

SUMMARY

The cryopreservation in liquid nitrogen of *Toxoplasma gondii* was carried out in order to preserve the parasite for long-term. *T. gondii* was thawed when antigen was required at 10, 40 and 270 days after its freezing. The pathogenicity and viability of *T. gondii* was confirmed by inoculation into mice. The cryopreservation in liquid nitrogen of *T. gondii* minimized for both animal house and laboratory activities, the costs of maintenance of the parasite into mice and the number of people involved in these activities.

BIBLIOGRAFIA

1. **Cunningham MP, Harley JMB.** Preservation of living metacyclic forms of the *Trypanosoma brucei* Group. *Nature* 1962; 194: 1186.
2. **Cunningham MP, Lumsden WHR, Webber WAF.** Preservation of viable trypanosomes in lymph tubes at low temperature. *Exp Parasitol* 1963; 14: 280-4.
3. **Jeffery GM.** Survival of trophozoites of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum* in glycerolized whole blood at low temperatures. *J Parasitol* 1962; 48: 601-6.
4. **Weinman D, McAllister J.** Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence. *Am J Hyg* 1947; 45: 102-21.
5. **Herbert WJ, Lumsden WHR, McK French A.** Survival of Trypanosomes after rapid cooling and storage. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 1968; 62: 209-12.
6. **Polge C, Soltys MA.** Preservation of trypanosomes in the frozen state. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 1957; 51: 519-26.
7. Center for Disease Control. Serology of Toxoplasmosis. In: Palmer DF, Cavallaro JJ, Walls K, Sulzer A, Wilson M, eds. Procedural guide revised. Georgia: U/S/ Department of Health, education and Welfare, 1976: 12-5, 26. Immunology Series No. 1.