

## INÍCIO DA INFECÇÃO POR *S. TYPHIMURIUM* EM CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Heonir ROCHA<sup>(1)</sup>, Michael McCrory<sup>(2)</sup> e Moema Magnavita Gomes de OLIVEIRA<sup>(3)</sup>

### RESUMO

Camundongos com esquistossomose experimental (infecção com 80 cercárias) e um grupo controle apropriado, foram inoculados por via intravenosa com  $10^5$  de *S. typhimurium* e sacrificados após 30 minutos, 2 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas. Em condições de assepsia foi procedida à cultura quantitativa de fígado, baço e sangue, para verificação do curso da infecção. Animais esquistossomóticos e do grupo controle apresentaram capacidade equivalente de fagocitar as bactérias inoculadas — Enquanto no grupo controle a quantidade inicial de bactérias no fígado e baço decrescia com 6 horas, e se mantinha neste nível pelo período da observação, no grupo esquistossomótico depois de ligeira diminuição, as bactérias se multiplicavam, e dentro de 24 horas já se observava retorno da bacteremia em alguns animais. Esta observação sugere que as células do sistema retículo-histiocitário do animal esquistossomótico embora conservem o poder fagocitário perdem a capacidade de destruir a *S. typhimurium* que foi fagocitada.

### INTRODUÇÃO

Observações experimentais anterior<sup>10</sup> revelaram que a injeção venosa ou peritoneal de *S. typhimurium* em camundongos experimentalmente infetados com *S. mansoni* resultava em multiplicação desta bactéria no fígado e baço destes animais, acompanhada de invasão circulatória mais intensa e de maior letalidade do que no grupo controle. Tudo fazia crer que as bactérias apreendidas no sistema retículo-histiocitário ao invés de serem inibidas em sua multiplicação ou destruídas, preservavam a capacidade de se multiplicar no animal esquistossomótico produzindo assim uma infecção mais severa. Neste estudo, a infecção foi acompanhada a partir de 24 horas da inoculação bacteria-

na, ficando alguns aspectos importantes da fase inicial da infecção a requerer esclarecimentos: 1) se o animal esquistossomótico captava as bactérias do sangue circulante igualmente ao grupo controle; 2) quando é que estas bactérias começavam a se multiplicar no fígado e baço dos camundongos esquistossomóticos; 3) se a multiplicação se fazia igualmente no fígado e no baço; 4) se a invasão circulatória era precedida pela multiplicação tissular da bactéria. Como estes pontos eram de importância fundamental para o entendimento da patogênese desta infecção bacteriana nos animais com esquistossomose, resolvemos proceder a este experimento.

Trabalho realizado no Hospital Prof. Edgard Santos, com a ajuda do Commonwealth Fund (Programa Bahia-Cornell)

- (1) Professor Titular, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil
- (2) Médico Interno, Harlem Hospital (Dr. McCrory era estagiário da Cornell University Medical College do Programa Bahia-Cornell)
- (3) Professor Assistente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Animais** — Foram utilizados neste estudo camundongos albinos adultos, de ambos os sexos, alimentados com dieta-padrão e recebendo água *ad libitum*. Um grupo destes animais foi infetado com cercárias do *S. mansoni* (grupo T), e o outro permaneceu como controle (grupo C).

**Produção de esquistossomose experimental** — Camundongos a serem infetados pelo *S. mansoni* foram submetidos a imersão parcial do corpo, durante 30 (trinta) minutos, em água contendo um número conhecido de cercárias, que permitisse a penetração de cerca de 80 (oitenta) em cada animal. Este método já foi descrito com detalhe anteriormente<sup>9</sup>. Após esta exposição, os animais permaneciam em observação durante 40 a 50 dias, quando então eram submetidos a exame de fezes (exame direto), e somente aqueles que revelassem ovos viáveis de *S. mansoni* eram incluídos no estudo.

**Bactéria** — Utilizamos a raça de *S. typhimurium* KK, de patogenicidade para o camundongo comprovada e conhecida através de estudos anteriores<sup>6</sup>. Esta bactéria foi isolada em 1960 de uma amostra de fezes de uma criança com gastroenterite. A cultura-estoque foi mantida congelando-se a -20°C, alíquotas de uma cultura de 12 a 18 horas desta bactéria em caldo tripticase-soja (BBL).

**Inoculação da bactéria** — O inóculo de *S. typhimurium* foi preparado procedendo-se ao subcultivo em caldo tripticase-soja de alíquotas da cultura-padrão, e depois incubando por 12 a 18 horas a 37°C. Eram, então, realizadas diluições sucessivas em solução salina até que fôsse atingida a diluição desejável, tendo-se em conta que a cultura-padrão, após este período de incubação, deveria conter cerca de 10<sup>8</sup> bactérias por ml. A quantidade de bactéria inoculada foi sempre conhecida através da contagem feita em placas disseminadas de agar simples, e o número de colônias determinado após 24 horas de incubação a 37°C, por meio de contador do tipo Quebec-Spencer.

**Grupos experimentais** — Para acompanhar a dinâmica da infecção grupos de camundongos esquistossomóticos e animais

controle foram infetados com 10<sup>5</sup> de *S. typhimurium*, e sacrificados após 30 minutos, 2 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas.

**Contagem de bactérias nos tecidos** — Após sacrifício dos camundongos a intervalos variados após a inoculação bacteriana, procedia-se, em condições de assepsia, a ampla abertura da cavidade abdominal e depois da torácica. Por punção direta do coração, retirava-se 0,1ml de sangue que era lançado em 9,9ml de água destilada. Procedia-se, então, conservando-se os rigores de assepsia, à retirada do rim esquerdo, do baço e de um fragmento do fígado. Estes órgãos eram pesados, e fazia-se uma diluição apropriada em água estéril para que se tivesse uma grama do tecido por ml da suspensão.

Por meio de diluições sucessivas e placas disseminadas em agar simples (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup>) foi possível avaliar o número de bactérias por g de tecido. As placas disseminadas eram incubadas a 37°C, e a contagem de bactérias feita através contador de colônias. De uma placa representativa da cultura de cada tecido foram repicadas 2 a 3 colônias em meios bacteriológicos apropriados, para a devida identificação.

#### RESULTADOS

Trinta minutos após inoculação de 10<sup>5</sup> *S. typhimurium*, a quantidade de bactéria recolhida do fígado, baço e sangue dos animais esquistossomóticos e do grupo controle foi equivalente (Tabela I). Já com duas horas da inoculação inicial não mais se encontraram bactérias no sangue dos animais de ambos os grupos; a quantidade de bactérias isoladas do fígado e baço neste período continuou semelhante (Tabela II). Pareceu haver, entretanto, pequeno decréscimo no número de bactérias no fígado e baço dos animais de ambos os grupos após 6 horas da inoculação inicial (Tabela III). Com 12 horas, entretanto, os animais do grupo controle começaram a dominar melhor a infecção, enquanto que no fígado e baço dos animais esquistossomóticos o número de bactérias se mantinha estacionário (Tabela IV). Já com 24 horas houve multiplicação bacteriana no fígado e baço dos animais esquistossomóticos, enquanto que

TABELA I

Distribuição de *S. typhimurium* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (teste) e camundongos normais (contrôle) 30 minutos após a inoculação bacteriana por via intravenosa

Tecidos cultivados	Teste					Contrôle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Fígado	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Baço	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Sangue	0	0	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>

TABELA II

Distribuição de *S. typhimurium* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (teste) e camundongos normais (contrôle) 2 horas após a inoculação bacteriana por via intravenosa

Tecidos cultivados	Teste					Contrôle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Fígado	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
Baço	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
Sangue	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA III

Distribuição de *S. typhimurium* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (teste) e camundongos normais (contrôle) 6 horas após a inoculação bacteriana por via intravenosa

Tecidos cultivados	Teste					Contrôle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Fígado	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
Baço	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
Sangue	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA IV

Distribuição de *S. typhimurium* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (teste) e camundongos normais (contrôle) 12 horas após a inoculação bacteriana por via intravenosa

Tecidos cultivados	Teste					Contrôle				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Fígado	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
Baço	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
Sangue	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA V

Distribuição de *S. typhimurium* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (teste) e camundongos normais (contrôle) 24 horas após a inoculação bacteriana por via intravenosa

Tecidos cultivados	Teste			Contrôle		
	1	2	3	1	2	3
Fígado	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
Baço	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Sangue	10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0

continuava estacionário no grupo controle. Importante foi a constatação do retôrno da bacteremia em animais esquistossomóticos, (Tabela V).

Por ocasião do sacrifício os camundongos infetados com *S. mansoni* apresentaram fígado e baço volumosos e enegrecidos, e o fígado mostrava uma superfície irregular com pontilhado cinza-esbranquiçado.

#### DISCUSSÃO

Como se verificou no presente estudo, o poder de captação imediata de *S. typhimurium* pelo fígado e baço dos animais esquistossomóticos foi semelhante ao do grupo controle. Isso não é surpreendente porque em várias experiências já divulgadas, fazendo-se uso da injeção venosa de bactérias, tem-se demonstrado que a fase rápida inicial do "clearance" destas bactérias praticamente não se altera face a várias situações anormais para o hospedeiro, tais como choque<sup>4</sup>, irradiação maciça<sup>5</sup>, insuficiência renal<sup>1</sup>, fome<sup>12</sup> ou a presença de uma infecção severa<sup>3</sup>, entre outras.

O que pareceu alterada foi a capacidade dos animais esquistossomóticos de impedir que as bactérias fagocitadas persistissem, e, particularmente, se multiplicassem no fígado e baço, dentro das primeiras 12 horas da inoculação inicial. Neste particular, várias agressões que não alteram a fase inicial do "clearance" tornam o hospedeiro incapaz de se liberar da bactéria inoculada<sup>11</sup>. Em camundongos submetidos a fome, por exemplo, nas primeiras horas, a rapidez de remoção da *Klebsiella pneumoniae* é comparável ao grupo controle. Entretanto, en-

quanto a população microbiana permanece estável por 10-12 horas e depois começa a decrescer nos camundongos controle, no grupo submetido a fome existe multiplicação intensa 4 a 10 horas após a injeção bacteriana<sup>11</sup>.

O comportamento do fígado e baço dos animais com *S. mansoni* com referência à quantidade de *S. typhimurium* encontrada nestes órgãos foi semelhante. Se as bactérias se localizassem preferencialmente na textura dos granulomas, seria de esperar que o número de bactérias no fígado fôsse maior do que no baço. Por outro lado, apesar do pequeno fragmento de fígado cultivado, é muito provável que alguns *S. mansoni* tivessem sido incluídos no material homogeneizado e cultivado. Se as bactérias se localizassem e se multiplicassem sistematicamente nos *S. mansoni*, seria também mais provável o encontro de um número maior de bactérias no fígado, o que não ocorreu.

O retôrno de bactérias para o sangue dos animais esquistossomóticos 24 horas após a inoculação inicial demonstra que a infecção estava em franca atividade. As células do sistema retículo-histiocitário conseguiam fagocitar, mas não conseguiram matar ou inibir a multiplicação da *S. typhimurium*, fato que se sabe ocorrer em algumas situações<sup>2</sup>. Não ficou evidente o motivo deste fenômeno — Sabe-se que estas células quando fagocitando hemácias no curso de anemia hemolítica provocada em camundongos, perdem a capacidade de matar *S. typhimurium* inoculada por via venosa ou peritoneal, tornando-se o animal muito sensível à infecção<sup>6, 7, 8</sup>. No caso da esquistossomose, merece especulação o possível efeito maléfi-

co do pigmento que, como elemento estranho, fica no interior destas células, chegando mesmo a tornar o baço e fígado destes animais de coloração enegrecida. Este aspecto, e mais os possíveis efeitos nocivos sobre o sistema retículo-histiocitário de produtos resultantes da degradação de ovos e parasitas, merecem investigação.

#### SUMMARY

##### *The establishment of S. typhimurium infection in mice infected with S. mansoni*

Mice infected with *S. mansoni* (80 cercariae) and appropriate controls were subjected to intravenous injection of *S. typhimurium* ( $10^5$ ), and sacrificed at different time intervals (30 minutes, 2, 6, 12 and 24 hours) after the inoculation and liver, spleen and blood of those animals were cultured quantitatively. The number of bacteria recovered from animals with *S. mansoni* infection and controls were similar at 30' and 2 hours. From 6 hours on, the normal animals (controls) tended to control the infection, while in mice with *S. mansoni* infection after a slight decrease in number of organisms in liver and spleen there was a tendency to multiplication of the bacteria, which was more evident at 24 hours. Those results suggested that the phagocytic function of the reticulo endothelial cells was similar in mice infected with *S. mansoni* and controls. The ability to destroy the phagocytized *S. typhimurium* however was deranged in the animals with *S. mansoni* infection, the exact mechanism being still unknown.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BALCH, H. H. & EVANS, J. R. — The influence of acute renal failure on resistance to infection: an experimental study. *Ann. Surg.* 144:191-197, 1956.

2. BENACERAF, B.; BIOZZI, H.; HALPERN, B. N. & STIFFEL, C. (eds.) *Physiopathology of the Reticulo-endothelial System*. Springfield, Charles C. Thomas, 1957.
3. BIOZZI, G.; BENACERAF, B. & HALPERN, B. N. — The effect of *Salm. typhi* and its endotoxin on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice. *Brit. J. Exp. Path.* 36:226-235, 1955.
4. FINE, J. — Relation of bacteria to the failure of blood volume therapy in traumatic shock. *New Eng. J. Med.* 250:889-895, 1954.
5. GORDON, L. E.; COOPER, D. M. & MILLER, C. P. — Clearance of bacteria from the blood of irradiated rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89:577-579, 1955.
6. KAYE, D. & HOOK, E. W. — The influence of hemolysis on blood loss on susceptibility to infection. *J. Immun.* 91:65-75, 1963.
7. KAYE, D. & HOOK, E. W. — The influence of hemolysis on susceptibility to *Salmonella* infection: additional observations. *J. Immun.* 91:518-527, 1963.
8. KAYE, D. & HOOK, E. W. — Influence of autoimmune anemia on susceptibility to *Salmonella* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117:20-23, 1964.
9. MOTTA, J. G. da; OLIVEIRA, V. S. & BARRETO, A. C. — Suscetibilidade de camundongos lactentes à infecção por *S. mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:337-342, 1965.
10. ROCHA, H.; CASTILHO, E. A. de; BARRETO, A. C. & HOOK, E. W. — Características da infecção por *S. typhimurium* em camundongos infectados com *S. mansoni*. *Gaz. Med. Bahia* 68:6-18, 1968.
11. ROGERS, D. E. — Host mechanisms which act to remove bacteria from the bloodstream. *Bact. Rev.* 24:50-65, 1960.
12. SMITH, J. M. & DUBOS, R. J. — The effect of nutritional disturbances on the susceptibility of mice to staphylococcal infections. *J. Exp. Med.* 103:109-118, 1956.

Recebido para publicação em 24/2/1971.