

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO POR *SALMONELLA* *TYPHI* EM CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL: MULTIPLICAÇÃO DA BACTÉRIA NOS *SCHISTOSOMA MANSONI*

Heonir ROCHA ⁽¹⁾, Moema M. G. de OLIVEIRA ⁽²⁾, Vanette S. OLIVEIRA ⁽³⁾ e
Aluizio PRATA ⁽⁴⁾

RESUMO

Camundongos, com esquistossomose experimental, foram inoculados com *Salmonella typhi* por via venosa, e sacrificados de uma a quatro semanas após a infecção inicial. Houve maior número de bactérias recolhidas do fígado e baço de animais esquistossomóticos do que do grupo controle. Até quatro semanas após a injeção inicial ainda se isolaram bactérias do baço dos camundongos esquistossomóticos, enquanto que a infecção desaparecia após duas semanas no grupo controle. *Salmonella typhi* se multiplicou em *Schistosoma mansoni* durante a 1.^a semana, sendo ainda recolhidas em pequeno número na 2.^a semana. Não foi possível demonstrar a permanência prolongada desta bactéria nos *S. mansoni*, não parecendo ser este um mecanismo importante de manutenção da infecção bacteriana neste modelo experimental.

INTRODUÇÃO

Desde 1959 se sabe, através descrição de investigadores brasileiros e chineses, da ocorrência de um quadro clínico caracterizado por bacteremia prolongada por *Salmonella* em pacientes portadores de infecção por *S. mansoni* ou *S. japonicum*. O mecanismo interno deste tipo peculiar de infecção não foi ainda esclarecido. Estudos experimentais, em camundongos com esquistossomose mansônica, inoculados com *S. typhimurium* por via venosa ou por via peritoneal, sugeriram que existe uma incapacidade do sistema retículo-histiocitário destes animais de destruir as bactérias normalmente fagocitadas⁵. Mais tarde foi demonstrado em pacientes com he-

patesplenomegalia esquistossomótica uma diminuição na capacidade de migração leucocitária¹, e uma deficiência na capacidade antibacteriana do soro para algumas bactérias do gênero *Salmonella*⁶. Todos estes dados revelavam a existência de defeitos nos mecanismos de defesa, mas não explicavam, de todo, a ocorrência de uma bacteremia prolongada.

Recentemente foi observado que quando camundongos com esquistossomose experimental recebem a inoculação venosa de germes Gram-negativos, as bactérias penetram e se multiplicam no interior do *S. mansoni*, particularmente no cecum, terminando por

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

- (1) Professor Titular, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil
- (2) Professor Assistente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Brasil
- (3) Professor Assistente, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Brasil
- (4) Professor Titular, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

matá-lo³. Embora esta descoberta tenha sido interpretada como de potencial interesse para o controle biológico da esquistossomose, achamos que ela abriu caminho para que se investigasse a possibilidade do *S. mansoni* poder servir de ponto de multiplicação e persistência de certas bactérias, responsabilizando-se, pelo menos em parte, pela bacteremia prolongada de alguns pacientes esquistossomóticos infetados por salmonela.

Neste trabalho resolvemos investigar se *S. typhi* injetada em camundongos com esquistossomose experimental penetra nos *S. mansoni*, nêles se multiplicando, e se pode permanecer nêles por tempo prolongado.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais — Foram utilizados neste estudo camundongos com dieta padrão e recebendo água *ad libitum*. Um grupo destes animais foi infetado com cercárias de *S. mansoni* (Grupo T), e outro permaneceu sem infecção, como controle (Grupo C).

Produção da 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 em cada animal. Este método já foi descrito com detalhe anteriormente². 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 uma raça de *S. typhi* recolhida de portador de salmonelose prolongada. A cultura estoque foi mantida congelando a -20°C alíquotas de uma cultura de 12 a 18 horas desta bactéria em caldo tripticase soja (BBL).

Infecção bacteriana — Para as injeções intravenosas utilizamos dose de 10⁵ bactérias.

Contagem de bactérias nos tecidos — Após sacrifício dos camundongos a intervalos va-

riados da inoculação bacteriana (uma, duas, três e quatro semanas) procedia-se, em condição de assepsia, ampla abertura da cavidade abdominal e depois da torácica. Por punção direta do coração, retirava-se 0,1 ml de sangue que era lançado em 9,9 ml de água destilada. Procedia-se, então, com os mesmos rigores de assepsia, à retirada de todo o fígado e do baço, colocando-os em placa de Petri esterilizada. Um fragmento do fígado e o baço eram então pesados, e procedia-se uma diluição apropriada em água destilada estéril de modo a que se tivesse uma grama de tecido por ml de suspensão. Fazendo-se, depois, diluições sucessivas em água destilada estéril e placas disseminadas em ágar simples (10², 10³, 10⁵) foi possível avaliar o número de bactérias por grama de tecido. As placas disseminadas foram inoculadas a 37°C e a contagem de bactérias procedida através contador de colônias. De uma placa representativa de cada tecido foram repicadas 2 a 3 colônias em meios bacteriológicos apropriados para a devida identificação.

Retirada dos esquistossomas do fígado — Utilizando luvas estéreis, o fígado de cada camundongo foi esmagado cuidadosamente, colocando-se depois 2 ml de água destilada na placa de Petri para permitir a mais fácil visualização dos esquistossomas que foram liberados. Por meio de alça de platina estéril os vermes foram pescados e colocados em tubo de triturador Ten Broeck, contendo 10 ml de água destilada estéril. Os esquistossomas, por gravidade, se depositavam no fundo dos tubos.

Verificação da presença de bactérias nos Schistosoma mansoni

O tubo de triturador com 10 ml de água destilada contendo os esquistossomas foi agitado por alguns minutos, para uma boa homogeneização. Depois que os *S. mansoni* se depositavam novamente no fundo do tubo, retirávamos 9 ml, e completávamos o volume inicial (10 ml) com água destilada estéril. Este procedimento foi repetido três vezes. Da última vez deixamos 2 ml no tubo, cultivando 1 ml sobrenadante, e a parte remanescente, contendo os *S. mansoni*, foi também cultivada após homogeneizar os para-

sitas com triturador Ten Broeck. Tanto o líquido sobrenadante (1 ml) quanto o líquido contendo a suspensão de *S. mansoni* (1 ml) foram cultivados quantitativamente para se determinar o número de bactérias por ml. As placas foram inoculadas a 37°C por 24 horas, e o número de colônias avaliado em contador tipo Quebec-Spencer.

RESULTADOS

1) Infecção por *S. typhi* em camundongos com esquistossomose mansônica — A distribuição de *S. typhi* no fígado, baço e

sangue em camundongos com esquistossomose mansônica e em animais controle pode ser vista nas Tabelas I, II, III e IV. Um aspecto que ressalta é a permanência mais prolongada, e em maior número, de bactérias ao nível do fígado e particularmente baço dos camundongos infetados com *S. mansoni*. Mesmo em animais sacrificados 4 (quatro) semanas após inoculação inicial, *S. typhi* pôde ser ainda recolhida do baço de alguns deles.

2) Presença de *S. typhi* em *S. mansoni* — *S. mansoni* recolhido de animais que receberam inoculação venosa de *S. typhi* mos-

TABELA I

Isolamento de *S. typhi* em tecidos de camundongos com *S. mansoni* (T) e camundongos normais (C) uma semana após a inoculação bacteriana

Órgão Cultivado	Camundongos											
	Com esquistossomose (T)								Contrôle (C)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4
Fígado	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	0	0	0	0
Baço	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁶	10 ²	10 ⁴	10 ²	0	0	10 ⁴
Sangue	10 ²	0	0	10 ¹	0	0	10 ¹	0	0	0	0	0

TABELA II

Isolamento de *S. typhi* em tecidos de camundongos infestados com *S. mansoni* (T) e camundongos normais (C) duas semanas após a inoculação bacteriana

Órgão Cultivado	Camundongos												
	Com esquistossomose (T)								Contrôle (C)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	
Fígado	10 ⁶	10 ³	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ¹	10 ¹	0	0
Baço	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	0	10 ⁴	
Sangue	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	0	10 ²	10 ¹	10 ¹	10 ¹	0	0	0	

ROCHA, H.; OLIVEIRA, M. M. G. de; OLIVEIRA, V. S. & PRATA, A. — Algumas características da infecção por *Salmonella typhi* em camundongos com esquistossomose experimental: multiplicação da bactéria nos *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:399-404, 1971.

TABELA III

Isolamento de *S. typhi* em tecidos de camundongos infestados com *S. mansoni* (T) e camundongos normais (C) três semanas após a inoculação bacteriana

Órgão Cultivado	Camundongos												
	Com esquistossomose (T)								Contrôle (C)				
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	
Fígado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baço	0	10 ²	0	0	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	0	0	0	0	0
Sangue	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA IV

Isolamento de *S. typhi* em tecidos de camundongos infestados com *S. mansoni* (T) e camundongos normais (C) quatro semanas após a inoculação bacteriana

Órgão Cultivado	Camundongos								
	Com esquistossomose (T)						Contrôle (C)		
	1	2	3	4	5	6	1	2	3
Fígado	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baço	10 ²	0	0	0	10 ⁴	0	0	0	0
Sangue	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA V

Isolamento de *S. typhi* de *S. mansoni* recolhidos de camundongos infetados experimentalmente, sacrificados a intervalos variados

	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
Água de lavagem	10 ²	0	0	0
<i>S. mansoni</i>	10 ⁸	10 ³	0	0

Animais com infecção por *S. mansoni* que receberam inoculação de *S. typhi*

TABELA VI

Investigação da ocorrência de bactérias em tecidos de camundongos infestados com *S. mansoni* (C₁) e em camundongos normais (C₂) sacrificados a intervalos variados

Órgão Cultivado	Época de verificação*							
	1 semana		2 semanas		3 semanas		4 semanas	
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂
Fígado	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0
Baço	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0
Sangue	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0
Total	12	12	12	12	12	12	9	9

x — Total de animais / n.º de infetados

traram muito maior número de bactérias do que o líquido sobrenadante onde estavam colocados (Tabela V) sugerindo que as bactérias se concentravam no parasita, embora a permanência fôsse por apenas duas semanas. *S. mansoni* recolhidos de animais que não sofreram inoculação bacteriana não continham bactérias.

3) *Verificação da ocorrência espontânea de bactérias em fígado, baço e sangue de camundongos com esquistossomose* — Em nenhum dos 45 camundongos com esquistossomose experimental (Contrôle C₁) sacrificados com 1, 2, 3 ou 4 semanas, se encontrou bactéria no fígado, baço ou no sangue. Igualmente, foram examinados 45 camundongos sem esquistossomose (Contrôle C₂), e nenhum deles (Tabela VI) mostrou a presença de bactéria nos mesmos tecidos cultivados.

DISCUSSÃO

Ficou evidente, pelos resultados deste estudo, que os camundongos infestados com *S. mansoni* não conseguiram se libertar do inoculum de *S. typhi* à maneira do grupo controle. Desde o início, houve maior número de bactérias recolhidas dos tecidos de ani-

mais esquistossomóticos, e *S. typhi* pôde ser isolada do baço destes animais até 4 semanas da injeção inicial; em contraposição, no grupo controle desde a primeira semana alguns camundongos já não tinham bactérias no fígado, e da terceira semana em diante os tecidos cultivados (fígado, baço e sangue) estavam estéreis. Este dado sugere uma diminuição das defesas do camundongo esquistossomótico ou a existência de um mecanismo de persistência da infecção nestes animais. Foi interessante a demonstração de que *S. typhi* injetada por via venosa se concentra nos *S. mansoni* recolhidos do fígado de camundongos esquistossomóticos sacrificados após uma semana. Havia muito mais *S. typhi* na suspensão dos *S. mansoni* do que na suspensão de fígado, baço ou na cultura de sangue destes animais. Embora não tivesse ficado demonstrada a localização precisa destas bactérias, é presumível que estivessem no interior do parasita, à semelhança do que foi documentado com outros Gram-negativos inoculados por via venosa em animais esquistossomóticos³. Não se conseguiu demonstrar a persistência de *S. typhi* nos *S. mansoni* por período prolongado. Apenas por duas semanas após a inoculação foi possível isolar esta bactéria dos *S. mansoni*. Ou a *S. typhi* era destruída no interior do parasita, ou o *S. mansoni* que se

“infetasse” vinha a morrer, se desintegrando, deixando a bactéria à mercê das defesas do hospedeiro. Em favor desta última hipótese fica a demonstração de uma baixa nítida de oviposição, e recolhimento de menor número de *S. mansoni* nos camundongos que foram inoculados com *S. typhi*, sugerindo um efeito letal da bactéria sobre alguns parasitas⁴.

O fato de que nos animais sacrificados com três e quatro semanas, as bactérias eram isoladas apenas do baço, onde não se encontram os *S. mansoni*, estando o fígado já estéril, também sugere que os parasitos não conseguiram reter as bactérias que neles se acumulavam na fase inicial da infecção. Nem tampouco as bactérias ficam retidas ou se multiplicam nos granulomas, abundantes no fígado e pouco freqüentes no baço.

Não encontramos infecção espontânea nos tecidos de camundongos esquistossomóticos nem nos *S. mansoni* recolhidos desses animais.

Todos êstes fatos sugerem que, embora *S. typhi*, nas condições desta experiência, se multiplique inicialmente em *S. mansoni* recolhido de camundongos esquistossomóticos após inoculação venosa, esta bactéria não se mantem no parasito por tempo prolongado. Dêste modo, não parece se constituir em mecanismo importante de manutenção do processo infeccioso.

SUMMARY

Some characteristics of Salmonella typhi infection in experimental schistosomiasis: growth of the bacteria in the Schistosoma mansoni

Mice with experimental *S. mansoni* infection as well as appropriate controls were injected intravenously with *S. typhi* and sacrificed at varying time intervals (one, two, three and four weeks). Up to weeks bacteria could be recovered from the spleen of animals with *S. mansoni* infection, while *S. typhi*

could be detected from control animals after two weeks. There was, also, greater number of bacteria in the liver and spleen of mice with schistosomiasis. Curious was the finding of *S. typhi* multiplication in *S. mansoni* collected from mice injected within the first week, but bacteria decreased in titer in the second week and from then on could not be detected in the worms. It was then impossible to get convincing evidence that *S. typhi* could remain within *S. mansoni* of infected animals, being an important source of continuous salmonella infection in those cases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNANDES, D. J. & ROCHA, H. — Características da reação inflamatória em pacientes com forma hépato-esplênica de esquistossomose mansônica e calazar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:129-134, 1967.
2. MOTTA, J. G. da; OLIVEIRA, V. S. & BARRETO, A. C. — Susceptibilidade de camundongos lactentes à infecção por *S. mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:337-342, 1965.
3. OTTENS, H. & DICKERSON, G. — Bacterial invasion of Schistosomes. *Nature (London)* 223:506-507, 1969.
4. PRATA, A.; OLIVEIRA, V. S. & ROCHA, H. — Influência da *Salmonella typhi* na postura do *S. mansoni* em camundongos. (A ser publicado).
5. ROCHA, H.; CASTILHO, E. A.; BARRETO, A. C. & HOOK, E. W. — Características da infecção por *S. typhimurium* em camundongos com *S. mansoni*. *Gaz. Med. Bahia* 68: 6-18, 1968.
6. ROCHA, H.; OLIVEIRA, M. M. G. de; TELES, E. S. & REBOUÇAS, G. — Atividade antibacteriana do soro de pacientes com forma hépato-esplênica da esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10: 364-370, 1968.

Recebido para publicação em 17/3/1971.