

## CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO POR *E. COLI* EM CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Heonir ROCHA (1), José Guilherme MOTTA (2) e Gilberto REBOUÇAS (3)

### RESUMO

Camundongos adultos, infetados com aproximadamente 150 cercárias, foram inoculados por via venosa com doses variadas de *E. coli*. Os animais estudados haviam sido infetados 40 a 50 dias da inoculação bacteriana, e apresentavam ovos de *S. mansoni* ao exame parasitológico (direto) de fezes. Foram injetadas doses de  $3,0 \times 10^3$ ,  $2,0 \times 10^4$  e  $5,0 \times 10^6$  *E. coli* em grupos de animais esquistossomóticos e grupos contrôles (total de 279 camundongos). Para determinar a distribuição de bactéria pelos tecidos, grupos de 6 animais (3 esquistossomóticos e 3 contrôles) foram sacrificados a intervalos variáveis (1, 3, 5 e 7 dias) após a injeção bacteriana, sendo procedidas culturas quantitativas do fígado, baço, rim esquerdo, pulmão e sangue. Com doses de  $2,0 \times 10^4$  e  $5,0 \times 10^6$  houve maior multiplicação bacteriana no fígado e baço dos animais esquistossomóticos, especialmente com a dose mais alta. Neste caso foi notória a elevada bacteremia e freqüentes os abscessos hepáticos, com maior multiplicação bacteriana no fígado do que no baço. Os abscessos hepáticos foram interpretados como de provável colangite supurada.

Os animais esquistossomóticos apresentaram maior mortalidade imediata (1.º dia) apenas após a injeção intravenosa de  $5,0 \times 10^6$  *E. coli*.

Não ficou esclarecido o defeito básico dos mecanismos de defesa do hospedeiro, responsável por esta diferença de suscetibilidade à infecção,

### INTRODUÇÃO

Estudos de natureza clínica<sup>3, 8, 10, 11</sup>, têm revelado aspectos peculiares da infecção por certas bactérias do gênero *Salmonella* quando o hospedeiro atingido é portador de esquistossomose mansônica, especialmente da forma hepatoesplênica. Mais recentemente, observações experimentais demonstraram maior suscetibilidade de camundongos infetados com *S. mansoni* à infecção por *S. typhimurium*<sup>9</sup>. Nos animais esquistossomóticos a *Salmonella* se multiplicava no fígado e baço

de modo mais intenso do que no grupo controle, resultando daí infecção mais severa, com maior índice de mortalidade. Estas observações clínicas e experimentais sugeriram uma inter-relação, a ser melhor esclarecida em sua natureza e especificidade, do hospedeiro com esquistossomose mansônica e infecção por bactérias do gênero *Salmonella*. Seria de todo necessário verificar, antes de mais nada, se uma maior suscetibilidade a infecção também se observava neste hospedeiro frente a outras bactérias.

Trabalho realizado no Hospital Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Brasil, com a ajuda dos Institutos Nacionais de Saúde dos U.S.A. (U.S. Department of Health, Education and Welfare, Grant n.º AI-07022-02)

- (1) Professor Catedrático, Departamento de Clínica Médica
- (2) Veterinário da Fundação Gonçalo Moniz
- (3) Professor Adjunto, Departamento de Clínica Médica

O presente estudo visou documentar o comportamento de camundongos esquistossomóticos e controles normais frente à injeção intravenosa de *E. coli*, bastonete Gram negativo que habitualmente não induz infecção sistêmica nestes animais. Procurou-se, para isso, acompanhar a distribuição desta bactéria nos tecidos de camundongos esquistossomóticos e controles normais, assim como os índices de mortalidade cumulativa, a diversos intervalos após a inoculação de doses variadas de *E. coli*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados neste estudo 279 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 minutos, em água contendo um número conhecido de cercárias, que permitisse a penetração de cerca de 150 em cada animal. Esta técnica já foi utilizada e descrita em estudo anterior<sup>7</sup>. Depois disso 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.

**Bactérias:** Utilizamos uma raça de *E. coli*, isolada de pacientes com infecção do tracto urinário e cujas características foram descritas anteriormente<sup>4</sup>. A cultura estoque foi mantida congelando a -20°C alíquotas de uma cultura de 12 a 18 horas em caldo tripticase soja (BBL).

**Injeção das bactérias:** O inóculo de *E. coli* foi preparado procedendo-se o subcultivo, em caldo tripticase soja, de alíquotas da cultura padrão, e depois incubado por 4 horas a 37°C. Eram, então, procedidas diluições sucessivas a 1/10, em solução salina, até que fôsse atingida a diluição desejável, levando-se em conta que a cultura padrão, após es-

te período de incubação, deveria conter cerca de  $10^8$  bactérias por ml. A injeção venosa foi feita com volume de 0,1 ml. O número de bactérias inoculadas foi sempre conhecido através de contagem, feita em placas de disseminação em ágar simples utilizando-se para as diluições sucessivas a cultura padrão, sendo o número de colônias anotado após 24 horas de incubação a 37°C, por meio de contador do tipo Quebec-Spencer. Foram utilizadas doses de  $3,0 \times 10^3$ ,  $2,0 \times 10^4$  e  $5,0 \times 10^6$  *E. coli*.

**Contagem de bactérias nos tecidos:** Após sacrifício dos camundongos a intervalos variados da inoculação bacteriana, procedia-se, em condições 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 estéril. Procedia-se, então, conservando-se os rigores de assepsia, à retirada do rim esquerdo, do baço, de um fragmento de fígado e dos pulmões. Estes órgãos eram pesados, e fazia-se uma diluição apropriada em água destilada estéril para obter uma grama do tecido por ml da suspensão. Por meio de diluições sucessivas e disseminação em placas de ágar simples ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) foi possível avaliar o número de bactérias por g de tecido. As placas disseminadas eram incubadas a 37°C, e a contagem de bactérias procedida através de contador de colônias. De uma placa representativa de cada tecido foram repicadas 2 a 3 colônias em meios bacteriológicos apropriados, para a devida identificação.

**Mortalidade:** Para verificar a mortalidade ocasionada pelas doses variadas de *E. coli*, camundongos com esquistossomose e controles normais receberam a injeção venosa de bactérias e foram acompanhados, diariamente, anotando-se o número de animais mortos durante o período de 14 dias de observação. Ao mesmo tempo, acompanhava-se a mortalidade de camundongos infetados com *S. mansoni*, que não haviam recebido qualquer inoculação bacteriana (15 animais). Para as doses de  $3,0 \times 10^3$  e  $2,0 \times 10^4$  *E. coli* foram acompanhados 15 camundongos do grupo Esquistossomose e 15 do grupo Controle; para a dose de  $5,0 \times 10^6$ , o grupo controle foi de 50 e o teste de 88 animais.

*Estudo histológico:* Tanto nos animais do grupo esquistossomose quanto nos do grupo controle, foi retirado um fragmento do fígado e do segmento terminal do intestino e fixado em solução de formol a 10%. As secções deste material foram coradas pela hematoxilina eosina para o devido estudo histológico.

RESULTADOS

Após a injeção intravenosa de  $3,0 \times 10^8$  *E. coli*, observou-se o desaparecimento rápido da bactéria da corrente circulatória de camundongos esquistossomóticos e normais, havendo, entretanto, uma tendência para a multiplicação bacteriana no fígado e baço dos animais esquistossomóticos (Tabela I). Com dose de  $2,0 \times 10^4$  *E. coli*, este fato tornou-se mais nítido, já se começando a perceber a ocorrência de elevada bacteremia mesmo três dias após a injeção bacteriana nos camundongos esquistossomóticos (Tabela II). Quando a dose ascendeu para  $5,0 \times 10^6$  *E. coli*, foi marcante a diferença entre os dois grupos: a bacteremia era mais intensa, assim como era bem maior a multiplicação bac-

teriana no fígado e baço de animais esquistossomóticos. Em alguns casos foi possível observar, macroscopicamente, numerosos abscessos no fígado de animais esquistossomóticos. Com esta dose houve, consistentemente, maior multiplicação de *E. coli* no fígado do que no baço (Tabela III).

Em todos os animais em que se documentava grande bacteremia, o número de *E. coli* no fígado e/ou baço estava muito elevado (mais de 100.000 bactérias por g de tecido).

É interessante assinalar que os cultivos do pulmão revelaram número bem maior de bactérias nos camundongos esquistossomóticos. O número de bactérias por g de tecido foi maior nos pulmões do que nos rins e no sangue.

A mortalidade de animais esquistossomóticos recebendo doses elevadas de *E. coli* ( $5,0 \times 10^6$ ) foi maior do que a do grupo controle (Fig. 1). Note-se, entretanto, que a diferença decorreu essencialmente da mortalidade imediata (1º dia após a injeção), sugerindo maior sensibilidade dos animais esquistossomóticos aos efeitos da endotoxina e da grande bacteremia inicial.

TABELA I

Multiplicação de *E. coli* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (T) e controles normais (C), após inoculação intravenosa de  $3,0 \times 10^8$  bactérias

Dias após inoculação bacteriana	Log. do número de <i>E. coli</i> por g de tecido							
	Baço		Fígado		Sangue		Rim	
	T	C	T	C	T	C	T	C
1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	4,7	< 1	2,2	< 1	< 1	< 1	2,1	< 1
	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
3	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	< 1	< 1	3,1	1,1	< 1	< 1	< 1	< 1
	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
5	2,9	2,2	3,6	2,5	< 1	< 1	2,3	< 1
	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	4,5	< 1	4,1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

TABELA II

Multiplicação de *E. coli* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (T) e controles normais (C), após inoculação intravenosa de  $2,0 \times 10^4$  bactérias

Dias após inoculação bacteriana	Log. do número de <i>E. coli</i> por g de tecido							
	Baço		Fígado		Sangue		Rim	
	T	C	T	C	T	C	T	C
1	5,4	4,3	6,1	3,2	5	< 1	1,2	< 1
	6,2	< 1	3,7	< 1	< 1	< 1	1,6	< 1
	3,2	2,2	6,1	2,2	3,1	< 1	1,5	< 1
	4,5	2,3	3,7	1,1	< 1	< 1	6	< 1
	1,4	1,3	7,5	1,7	< 1	< 1	< 1	< 1
	4,3	1,3	3,9	< 1	< 1	< 1	1,4	< 1
3	6,3	3,1	6,2	4,1	4,5	< 1	3,9	< 1
	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	3,1	< 1	2,7	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	3,2	2,6	2,7	2,1	< 1	< 1	< 1	< 1
	4,2	< 1	3,3	< 1	< 1	< 1	5,0	< 1
	3,4	< 1	3,1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
5	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	3,9	< 1	2,1	1,4	< 1	< 1	< 1	< 1
	1,7	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

TABELA III

Multiplicação de *E. coli* em tecidos de camundongos infetados com *S. mansoni* (T) e controles normais (C), após inoculação intravenosa de  $5,0 \times 10^6$  bactérias

Dias após inoculação bacteriana	Log. do número de <i>E. coli</i> por g de tecido									
	Baço		Fígado		Sangue		Rim		Pulmão	
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
3	> 8	2,1	> 8	1,7	3,8	< 1	3,2	< 1	3,6	< 1
	4,8	3,7	> 8	2,1	3,1	< 1	1,3	< 1	3,6	< 1
	5,6	4,1	> 8	2,7	4,3	< 1	2,1	< 1	5,0	3,1
5	5,4	2,4	> 8	2,5	5,2	< 1	3,5	< 1	> 6	< 1
	> 8	< 1	> 8	< 1	5,1	< 1	5,0	< 1	> 6	< 1
	4,8	1,9	> 8	1,4	4,2	< 1	3,1	< 1	5,1	< 1
7	4,2	3,2	> 8	3,2	3,4	< 1	3,6	< 1	4,5	2,9
	5,3	3,5	> 8	2,8	4,4	< 1	2,9	< 1	5,0	< 1
	4,5	< 1	> 8	< 1	4,5	< 1	2,9	< 1	5,3	< 1

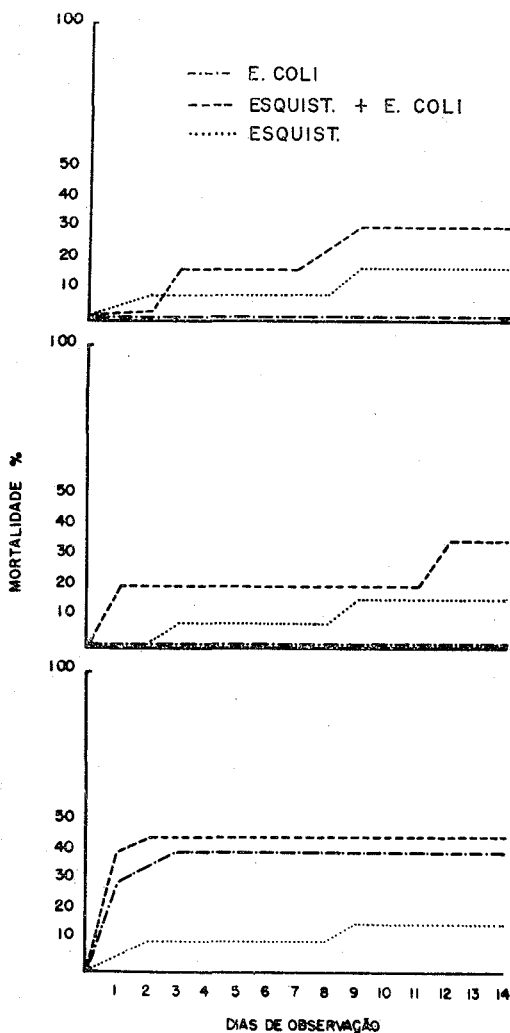


Fig. 1 — Distribuição da mortalidade cumulativa com doses crescentes de *E. coli* injetada por via venosa ( $3,0 \times 10^3$ ,  $2,0 \times 10^4$  e  $5,0 \times 10^6$ )

#### DISCUSSÃO

Neste estudo ficou bem evidente a maior suscetibilidade de camundongos esquistossomóticos à infecção por *E. coli*. É interessante observar que com este modelo experimental este fato foi mais nítido do que quando uma raça de *S. typhimurium* foi utilizada como agente infetante. Com doses de  $2,0 \times 10^4$  *E. coli*, houve, consistentemente, maior multiplicação no fígado e baço de camundongos esquistossomóticos, com diferenças para os controles de até 10.000 vezes. A infecção, entretanto, ainda podia ser controlada pelos animais, desde que a tendência, com o pas-

sar dos dias, foi para uma diminuição do número de *E. coli* no fígado e baço, e desaparecimento da bacteremia (Tabela II). Aliás, em apenas 3 de 15 animais esquistossomóticos (e em nenhum dos do grupo controle) houve elevada bacteremia com esta dose. Quando a dose de *E. coli* foi aumentada ( $5,0 \times 10^6$ ), todos os animais esquistossomóticos evidenciaram elevada bacteremia, em flagrante diferença com o grupo controle que conseguiu manter limpa a corrente circulatória desde o primeiro dia da injeção bacteriana. Aqui, mais uma vez, ficou evidente a inter-relação entre a multiplicação de bactérias no fígado e baço e a ocorrência de bacteremia. Em geral quando um animal evidenciava bacteremia dias após a inoculação inicial, o número de bactérias neste órgão estava muito elevado (mais de  $10^5$  por g de tecido).

A ocorrência de multiplicação bacteriana semelhante no fígado e baço de camundongos esquistossomóticos, e muito superior ao grupo controle, quando as doses de *E. coli* inoculadas foram de  $2,0 \times 10^4$ , sugere a existência de defeito no sistema retículo-histocitário nos animais esquistossomóticos. A semelhança de que se verificou com *S. typhimurium*, este defeito não pareceu ser da função fagocitária, mas, provavelmente da capacidade de destruir as bactérias captadas. Esta dissociação de funções do sistema retículo-histocitário não é fato surpreendente, já tendo sido sugerida por várias observações experimentais<sup>1, 5, 6</sup>.

Enquanto o comportamento do fígado e baço vinha sendo comparável com doses de  $3,0 \times 10^3$  e  $2,0 \times 10^4$  de *E. coli*, houve notória diferença quando o inóculo bacteriano se elevou para  $5,0 \times 10^6$ . Nenhum abscesso hepático foi notado com a dose de  $2,0 \times 10^4$ , apesar de haver multiplicação de *E. coli* no fígado dos animais, e este achado foi freqüente com a inoculação de  $5,0 \times 10^6$ . Nestes casos a multiplicação bacteriana foi muito maior no fígado do que no baço, fato bem diverso do que se verificou com *S. typhimurium*, refletindo, mais provavelmente, diferenças das espécies bacterianas utilizadas. O encontro de múltiplos abscessos após doses elevadas de *E. coli* ( $5,0 \times 10^6$ ) sugeriu a existência de fatores locais no fígado que permitissem esta intensa proliferação bacteriana, estabelecendo uma nítida diferença em relação ao baço. As bactérias podiam estar se multiplicando

em áreas lesadas pelos ovos ou pelos vermes; ou, então, em canalículos biliares parcialmente construídos pelos granulomas e pela lesão inflamatória intra-hepática observada na doença. O aspecto histológico sugere esta última hipótese como a mais provável. É interessante ressaltar que as bactérias do gênero coliforme, especialmente *E. coli*, são as mais frequentes causadoras de colangites<sup>2</sup>, e estudos experimentais mostram a tendência à multiplicação intra-hepática de bactérias desta espécie quando se promove obstrução da drenagem de bile. Esta observação de que, também com *E. coli*, o hospedeiro infetado pelo *S. mansoni* se apresentou com menor resistência à infecção sugere que o problema não é específico para *Salmonellas* e reflete, provavelmente, uma alteração mais geral dos mecanismos de defesa. Este fato deve ser verificado e comprovado em outras investigações experimentais e clínicas.

#### SUMMARY

#### *Characteristics of E. coli infection in mice infected with S. mansoni*

Adult albino mice previously infected with approximately 150 cercaria of *S. mansoni* and a group of normal control animals were inoculated by the intravenous route with *E. coli* in doses of  $3.0 \times 10^3$ ,  $2.0 \times 10^4$  and  $5.0 \times 10^6$  bacteria. All animals with Schistosomiasis had been exposed to the cercaria of *S. mansoni* 40 to 50 days before the bacterial inoculation and were shown to have eggs of *S. mansoni* on direct stool examination.

To evaluate the tissue distribution of the injected bacteria, groups of 6 animals (3 schistosomotic and 3 controls) were sacrificed at different intervals after the inoculation (1, 3, 5 and 7 days) and quantitative cultures of liver, spleen, left kidney, lungs and blood were performed.

After inoculation with  $2.0 \times 10^4$  and  $5.0 \times 10^6$  *E. coli* there was a greater bacterial multiplication in the liver and spleen of the animals with Schistosomiasis, especially with the higher dose. In this case, there was a strikingly high bacteremia and liver abscesses were frequently found, while the bacterial multiplication was greater in the liver than in the spleen. The formation of liver abscesses

was interpreted as being derived from suppurative cholangitis. The animals with Schistosomiasis showed a higher early mortality (first day) only after the inoculation of  $5.0 \times 10^6$  *E. coli*.

The basic defect of the defense mechanisms to explain the greater susceptibility to infection of the host with Schistosomiasis is not clear and must await further studies.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENACERRAF, B.; BIOZZI, G.; HALPERN, B. N. & STIFFEL, C. — *Physiopathology of the reticulo-endothelial system*. Editado por B. N. Halpern, B. Benacerraf & F. J. Delafresnaye. Springfield, Charles C. Thomas, 1957, pág. 52.
2. DIDIER, F. V. — *Contribuição ao estudo das infecções das vias biliares. Estudo clínico e experimental*. Tese, 1963.
3. FERREIRA, J. M. — Febre tifoide. *Rev. Med.* (São Paulo) 38:181-188, 1954.
4. GUZE, L. B. & BEESON, P. B. — Experimental pyelonephritis. I — Effect of ureteral ligation on the course of bacterial infection in the kidney of the rat. *J. Exp. Med.* 104:803-815, 1956.
5. KAYE, D. & HOOK, E. W. — The influence of hemolysis on susceptibility to Salmonella infection: additional observations. *J. Immun.* 91:518-527, 1963.
6. KAYE, D. & HOOK, E. W. — Influence of autoimmune anemia on susceptibility to Salmonella infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117:20-23, 1964.
7. 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.
8. NEVES, J. & LOBO MARTINS, N. R. da — Salmonelose septicêmica prolongada. Subsídio à sua patogenia. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7:233-240, 1965.
9. ROCHA, H.; CASTILHO, E. A.; BARRETO, A. C. & HOOK, E. W. — Características da infecção por *S. typhimurium* em camundongos com esquistossomose mansônica (Em impressão) *Gas. Med.* (Bahia).
10. TAI, T. Y.; HSU, C. Y.; CHANG, H. C. & LIU, Y. K. — Typhoid and paratyphoid fevers occurring in cases of Schistosomiasis. *Chin. Med. J. (Peking)* 76:426-436, 1958.
11. TEIXEIRA, R. S. — Typhoid fever of protracted course. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2:65-70, 1960.

Recebido para publicação, em 13/2/1968.