

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2004) 41:194-200
ISSN printed: 1413-9596
ISSN on-line: 1678-4456

Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*

The influence of the route of inoculation on the development of the leptospiral infection in hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *pomona*

Nicodemus Alves de MACEDO¹;
Zenáide Maria de MORAIS²;
Cláudio Roberto de Almeida CAMARGO³;
Clebert José ALVES⁴;
Sérgio Santos de AZEVEDO²;
Rodolfo NÜRMBERGER JÚNIOR⁵;
Sílvio Arruda VASCONCELLOS²

1 – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI
2 – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP
3 – Instituto Butantã da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo - SP
4 – Departamento de Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande - PB
5 – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP

Resumo

Foi investigada a influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*. As vias de inoculação ensaiadas foram: intraperitoneal, subcutânea, oral, conjuntival e escarificação cutânea. O inóculo infeccioso foi constituído por uma cultura em meio de Fletcher, com 20 a 30 leptospiros por campo microscópio no aumento de 200 vezes. Os animais controle foram inoculados apenas com meio de Fletcher. Foram colhidas amostras de soro sanguíneo e fragmentos de rins na fase agônica da doença ou no 21^o dia pós-infecção, quando todos os animais foram sacrificados. Para a pesquisa de leptospiros, foi feito o exame direto com microscopia óptica em campo escuro e cultivo em meio de Fletcher, pela técnica das diluições seriadas. A detecção de aglutininas anti-leptospiros foi realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica. A instalação e evolução da leptospirose foram afetadas pela via de inoculação. A via oral foi a menos efetiva em estabelecer a infecção. Não foi observada associação estatística entre a frequência de portadores e a via de inoculação.

Palavras-chave:

Via de inoculação.
Hamsters.
Sorovar *pomona*.

Correspondência para:

SÍLVIO ARRUDA VASCONCELLOS
Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP
savasco@usp.br

Recebido para publicação: 02/12/2003
Aprovado para publicação: 25/03/2004

Introdução

O hamster (*Mesocricetus auratus*) tem sido a espécie de eleição para o estudo da

etiopatogenia da leptospirose.^{1,2} Infecções experimentais nestes animais foram efetuadas com diversos sorovares de *Leptospira spp*: *canicola*³, *hardjo*^{4,5,6}, *icterohaemorrhagiae*⁷,

pomona^{8,9,10,11,12}, *szwajizak*⁵ e *grippotyphosa* e *autumnalis*.¹² As vias utilizadas para a aplicação do inóculo infeccioso também foram distintas: intraperitoneal^{3,4,5,8,9,10,11,12}, nasal e ocular¹³, subcutânea⁶, conjuntival, intracraniana e oral¹⁴ e escarificação cutânea.⁷ Os quadros obtidos nestas investigações variaram com a estirpe de leptospira e a via de inoculação adotada, tendo sido registrados casos de doença letal altamente aguda com mortes entre o quarto e o quinto dia pós-infecção, e outros crônicos caracterizados por nefrite intersticial.

A despeito do grande número de investigações já realizadas, nenhuma atentou para a análise comparativa do comportamento de um mesmo inóculo infeccioso aplicado simultaneamente por diferentes vias em grupos homogêneos de uma mesma espécie animal.

Do ponto de vista de modelo biológico experimental para estudos de etiopatogenia e epidemiologia da leptospirose, seria de grande valia a reprodução em condições controladas das modalidades de fontes de infecção apresentadas nos casos de infecção natural (doentes, portadores convalescentes e portadores sadios)¹⁵. O esclarecimento destas indagações poderá ser obtido a partir da análise da resposta de uma espécie de hospedeiro a um mesmo inóculo infeccioso aplicado por vias distintas.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e evolução da leptospirose em hamsters jovens machos, infectados com uma estirpe virulenta do sorovar *pomona*.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*) criados em biotério convencional, com peso corpóreo entre 80 e 100 gramas, machos, com estado geral de saúde aparentemente bom, mantidos em gaiolas individuais forradas com maravalha autoclavada e alimentados com ração

comercial *ad libitum* e água da rede pública.

O inóculo infeccioso foi constituído por uma cultura pura de *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*, tipificada pela prova de adsorção de aglutininas, obtida a partir de macerado de rim de hamster, previamente inoculado pela via intraperitoneal, com 0,5 mL de cultura de referência e sacrificado no quinto dia pós-infecção. A diluição de trabalho foi a que apresentava de 20 a 30 leptospiros por campo microscópio no aumento de 200 vezes.

O experimento foi conduzido em dez repetições, de modo que em cada etapa um mesmo inóculo infeccioso foi aplicado nas cinco vias ensaiadas: intraperitoneal, subcutânea, escarificação cutânea, oral e conjuntival, sendo um hamster para cada via. Os animais inoculados pela via conjuntival receberam 0,3 mL do inóculo infeccioso, sendo 0,15 mL em cada olho. Para as demais vias, o volume de inóculo infeccioso foi sempre de 0,5 mL. No caso dos animais que foram inoculados por escarificação cutânea, 0,25 mL do inóculo infeccioso foi depositado na face interna dos membros posteriores. Para cada grupo experimental, houve sempre um animal testemunha, no qual o inóculo infeccioso foi substituído pelo placebo (meio de Fletcher), pela via intraperitoneal.

Durante 21 dias pós-infecção, todos os animais foram observados diariamente, duas vezes ao dia. Os animais que vieram a apresentar sintomas clínicos durante esse período foram sacrificados em fase agônica, necropsiados e examinados macroscopicamente. Foram colhidos fragmentos de rim dos quais foram preparadas suspensões a 10% (peso-volume), para a pesquisa direta de leptospiros à microscopia óptica em campo escuro. A seguir, no caso de resultado negativo, foi realizada a cultura em meio de Fletcher, pela técnica das diluições seriadas.¹⁶ Por ocasião da necrópsia, a partir do coágulo existente no interior do coração, foi obtida uma amostra de soro sanguíneo destinada à pesquisa de aglutininas anti-leptospiros. No

21º dia da inoculação experimental, todos os animais sobreviventes foram sacrificados e submetidos aos procedimentos anteriormente citados. Para a pesquisa de aglutininas séricas anti-leptospiras, utilizouse a técnica de soroaglutinação microscópica, conforme descrito por Galton et al.¹⁷

Na análise estatística dos resultados, as variáveis qualitativas foram submetidas aos testes de Cochran ou binomial, para

amostras relacionadas, e as variáveis quantitativas (tempo de observação) foram submetidas à prova de Friedman¹⁸. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Resultados

A tabela 1 apresenta os informes clínicos e laboratoriais segundo as 60 unidades e os dez grupos experimentais utilizados.

Tabela 1

Hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans sororovar pomona*, segundo o grupo experimental, o número de identificação, a via de inoculação, a evolução clínica e a natureza do resultado dos exames *post mortem*. São Paulo, 2003

Grupo experimental	Nº de identificação	Via de inoculação	Evolução clínica				Resultado dos exames <i>post mortem</i>		
			Óbito por leptospirose*	Sacrifício*	Sintomas de leptospirose	Lesões macroscópicas	Pesquisa do agente nos rins		Pesquisa de aglutininas no soro**
							Exame direto	Cultura	
01	01	IP	05	...	P	P	P	N	N
	02	SC	P	P	P	N	N
	03	CJ	10	...	P	N	P	N	N
	04	OR	...	21	N	N	P	N	N
	05	EC	11	...	P	P	P	N	200
	06	CT	...	21	N	N	N	N	N
02	07	IP	05	...	P	P	P	N	N
	08	SC	P	P	P	N	N
	09	CJ	...	21	N	N	N	N	N
	10	OR	...	21	N	N	N	N	N
	11	EC	09	...	P	P	P	N	N
	12	CT	...	21	N	N	N	N	NR
03	13	IP	05	...	P	P	P	N	N
	14	SC	07	...	P	P	N	P	N
	15	CJ	10	...	P	P	P	N	N
	16	OR	09	...	P	P	P	N	N
	17	EC	09	...	P	P	P	N	N
	18	CT	...	21	N	N	N	N	N
04	19	IP	05	...	P	P	P	N	N
	20	SC	...	21	N	N	N	N	400
	21	CJ	10	...	P	P	P	N	N
	22	OR	...	21	N	N	N	N	N
	23	EC	09	...	P	P	P	N	N
	24	CT	...	21	N	N	N	N	N
05	25	IP	06	...	P	P	P	N	N
	26	SC	...	21	N	N	P	N	1.600
	27	CJ	...	21	N	N	P	P	N
	28	OR	...	21	N	N	N	N	N
	29	EC	...	21	N	P	P	N	N
	30	CT	...	21	N	N	N	N	N
06	31	IP	05	...	P	P	P	P	N
	32	SC	...	21	N	N	N	N	800
	33	CJ	...	21	N	N	N	N	N
	34	OR	11	...	P	P	P	N	N
	35	EC	11	...	P	P	N	P	100
	36	CT	...	21	N	N	N	N	N

P = Positivo; N = Negativo; NR = Não realizado; * = expresso em dias após a inoculação; ** = título expresso como a recíproca da maior diluição do soro com 50% de leptospiras aglutinadas por campo microscópico; *** = Positivos/examinados; IP = Intraperitoneal; SC = Subcutânea; CJ = Conjuntival; OR = Oral; EC = Escarificação cutânea; CT = Controle (placebo inoculado pela via IP)

Salienta-se o comportamento dos animais inoculados pela via intraperitoneal, em que todos morreram entre o 5º e o 9º dias pós-inoculação, com confirmação clínica e laboratorial da doença. Destaque-se também a ausência de qualquer sintoma clínico e a negatividade dos exames *post mortem* nos animais inoculados com placebo (grupo controle), pela via intraperitoneal. Constatou-se que, entre os 40 hamsters inoculados experimentalmente com leptospirosas, por outras vias que não a intraperitoneal, todos os 25 que vieram a óbito durante os 21 dias de observação tiveram a confirmação da doença pelos sintomas clínicos e exame *post mortem*. Os sintomas mais freqüentes foram: apatia, prostração, adinamia, anorexia, desidratação e hemorragias. As lesões macroscópicas predominantes foram hemorragias e icterícia. Especial destaque deve ser dado ao quadro de panofalmitis purulenta unilateral no animal de número 51 (inoculado pela via conjuntival).

Na tabela 2 é apresentada a freqüência de óbito, segundo a via de inoculação e o grupo experimental. Observou-se que os extremos de efetividade na instalação da doença de 3/10 e 10/10 estão respectivamente associados às vias oral e intraperitoneal. Dentre os 10 grupos experimentais ensaiados, o número cinco apresentou um comportamento bastante

peculiar com a ocorrência de apenas um óbito por leptospirose, para o animal inoculado pela via intraperitoneal (animal número 25). A análise estatística, segundo o teste de Cochran, não revelou diferenças significativas, no entanto, a análise pareada das combinações de vias (duas a duas), através do teste binomial, só conferiu significado estatístico para os valores observados nas vias intraperitoneal e oral.

A tabela 3 apresenta as freqüências de sobreviventes no 21º dia pós-inoculação, segundo a via de inoculação e o grupo experimental. Houve variação na confirmação da infecção, segundo a via de inoculação. Enquanto para as vias intraperitoneal, subcutânea e escarificação cutânea existiu 100% de confirmação da infecção (isolamento da bactéria ou conversão sorológica), para a via conjuntival, este valor foi de apenas 80%, e para a oral, de 40%. Constatou-se, ainda, na tabela 3, que cinco animais caracterizaram-se como portadores sadios (um no grupo 01, três no grupo 05 e um no grupo 09). O estudo da freqüência de portadores, segundo a via de inoculação, pelo teste de Cochran, não revelou a existência de associação estatística. Salienta-se ainda que, dentre estes cinco animais caracterizados como portadores, houve quatro não reatores na pesquisa de aglutininas anti-leptospirosas.

Tabela 2

Freqüência de óbitos por leptospirose em hamsters experimentalmente inoculados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona, segundo o grupo experimental e a via de inoculação. São Paulo, 2003

Grupo experimental	IP	SC	CJ	OR	EC	TOTAL*
01	1	1	1	0	1	4/5
02	1	1	0	0	1	3/5
03	1	1	1	1	1	5/5
04	1	0	1	0	1	3/5
05	1	0	0	0	0	1/5
06	1	0	0	1	1	3/5
07	1	1	1	0	1	4/5
08	1	1	1	0	1	4/5
09	1	1	1	0	0	3/5
10	1	1	1	1	1	5/5
TOTAL*	10/10	7/10	7/10	3/10	8/10	35/50

IP = Intraperitoneal; SC = Subcutânea; CJ = Conjuntival; OR = Oral; EC = Escarificação cutânea.

* = Positivos/examinados.

Tabela 3

Freqüência de hamsters sobreviventes no 21º dia pós-infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*, segundo o grupo experimental, a via de inoculação e a confirmação da presença de leptospiros no tecido renal ou de aglutininas séricas anti-leptospiros. São Paulo, 2003

Grupo experimental	IP	SC	CJ	OR	EC	TOTAL*
01	0*	0*	0*	1*	0 ^Δ	1/5
02	0*	0*	1	1	0*	2/5
03	0*	0*	0*	0*	0*	0/5
04	0*	1 ^Δ	0*	1	0*	2/5
05	0*	1 ^Δ	1*	1	1*	4/5
06	0*	1 ^Δ	1	0*	0 ^Δ	2/5
07	0*	0*	0*	1	0*	1/5
08	0 ^Δ	0*	0*	1	0*	1/5
09	0*	0*	0*	1	1*	2/5
10	0*	0*	0*	0*	0*	0/5
TOTAL	0/10	3/10	3/10	7/10	2/10	15/50

IP = Intraperitoneal; SC = Subcutânea; CJ = Conjuntival; OR = Oral; EC = Escarificação cutânea.

* = Confirmação da presença de leptospiros nos rins.

Δ = Confirmação da presença de aglutininas séricas anti-leptospiros

Discussão

A confirmação clínica e laboratorial da leptospirose em todos os 25 animais que morreram de infecção, excluídos os inoculados pela via intraperitoneal, durante o período de observação, permite a avaliação comparativa da influência da via de inoculação sobre a instalação e evolução da doença.

Do ponto de vista da instalação da infecção, a via menos eficaz foi a oral. Apenas 40% dos infectados por esta via tiveram a infecção confirmada. Stavitsky¹⁴, obteve resultado semelhante em hamsters inoculados com o sorotipo *icterohaemorrhagiae* e Burnstein e Baker¹⁹, referiram o mesmo quando da inoculação oral do sorotipo *pomona* em suínos.

A ocorrência de 80% de animais infectados dentre os inoculados pela via conjuntival, quando comparados com os 100% obtidos pelas vias intraperitoneal, subcutânea e escarificação cutânea, pode ser interpretada como conseqüência dos mecanismos inespecíficos de defesa existentes nesta porta de entrada.

No que se refere à freqüência de óbitos por leptospirose, dentre os inoculados, segundo as diferentes vias, observou-se significância estatística apenas para as vias intraperitoneal (10/10) e oral (3/10). Estes resultados concordam com os obtidos por Abdu e Sleight⁸, Andreani⁴, Badiola, J., Thiermann e Chevillat⁵, Kronhaus, Barriola e

Savan⁹, Miller e Wilson¹⁰, Sanger et al.¹¹, Sapp et al.³, e, no relativo à via intraperitoneal, e com Stavitsky¹⁵, quanto à via oral. A constatação de valores variando entre 70 e 80% para as demais vias sugere a existência de mecanismos inespecíficos de defesa na conjuntiva ocular, pele e tecido subcutâneo, mais eficazes do que os mecanismos existentes no peritônio.

Todos os animais que sucumbiram por leptospirose durante o período de observação apresentaram um quadro de evolução aguda. A variação na duração do tempo de observação após a infecção é outro indicador da existência de diferentes tipos de interação estabelecidos entre o agente e o hospedeiro: para as vias intraperitoneal e subcutânea, foram obtidos valores médios 40% a 50% menores que os verificados para as outras vias. As bactérias devem ter encontrado maior dificuldade para ganhar a circulação sanguínea ou linfática quando da instalação através daquelas vias.

Conclusões

A instalação e evolução da leptospirose em hamsters foram influenciadas pela via de inoculação. A via oral foi a menos efetiva em estabelecer a infecção. Não foi possível estabelecer relação entre a condição de portador e a via de inoculação.

Abstract

The influence of the route of inoculation on the development of the leptospiral infection was investigated in 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. The routes of inoculation were intraperitoneal, subcutaneous, oral, conjunctival and scrapped skin. All animals received the leptospiral inoculum cultivated in Fletcher's medium, with 20 to 30 leptospire per field under 200x magnification. The controls were inoculated only with Fletcher's medium. Samples of blood sera and the kidney fragments were collected in the agonic stage of the disease or at 21st experimental day, when all survivors were killed. The antibodies detection was done by the microscopic agglutination test and the bacteria detection by the dark field microscopic examination and culture in Fletcher's medium, by the tenfold dilutions technique. The presence and development of disease was affected by the route of infection. The oral route was the less effective for promoting the disease. There was no association between the frequency of carrier state and the route of infection.

Key-words:

Route of inoculation.
Hamsters.
Serovar *pomona*.

Referências

- ALVES, C. J. et al. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 2, p. 193-199, 1992.
- OLIVA, R. et al. Pathologic-clinical characterization of Leptospirosis in a Golden Syrian Hamster Model. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 2, p. 165-170, 1994.
- SAPP, W. J. et al. Histopathological evaluation of livers of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1283-1292, 1980.
- ANDREANI, E. Leptosirosi da sierotipo *hardjo*. Prove di infezione sperimentale in animale di laboratorio. **Zooprofilassi**, v. 23, p. 557-569, 1968.
- BADIOLA, J.; THIERMANN, A. B.; CHEVILLE, N. F. Pathology features of leptospirosis in hamsters caused by *L. interrogans* serovars *hardjo* and *szwajizak*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 91-99, 1983.
- WOODS, S. R.; MALLEY, A. D.; FRERICHS, J. B. Isolation of a hamster lethal strain of *Leptospira interrogans* seotype *hardjo*. **Veterinary Record**, v. 112, p. 437-438, 1983.
- COX, P. J.; TWIGG, G. I. Observations on kidney damage in hamsters following a non-icterohaemorrhagic form of disease resulting from infection by *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 91, p. 153-157, 1981.
- ABDU, F.; SLEIGHT, S. D. Ethiology of experimental *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinarian**, v. 55, p. 74-86, 1965.
- KRONHAUS, A. E.; BARRIOLA, J. E.; SARAVÍ, M. A. Aislamiento y detección de *Leptospira interrogans* a partir de la medula ósea femoral de hamsters inoculados experimentalmente. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 70, p. 82-88, 1989.
- MILLER, N. G.; WILSON, R. B. Eletron microscopic study of the relationship of *Leptospira pomona* of the renal tubules of the hamsters during acute and chronic leptospirosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 28, p. 225-235, 1967.
- SANGER, V. L. et al. *Leptospira pomona* infection in hamsters. **Cornell Veterinarian**, v. 51, p. 489-498, 1961.
- VENUGOPAL, K.; RATNAM, S. Lesions and immune responses produced in hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of leptospira. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 1075-1077, 1990.
- BRUNNER, K. T. Notes on *Leptospira canicola* in hamsters (*Mesocricetus auratus*): pathogenesis, tratament and immunity. **California Veterinary**, v. 1, p. 18-20, 1948.
- STAVITSKY, A. B. Studies on the pathogenesis of leptospirosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 76, p. 179-192, 1945.
- VASCONCELLOS, S. A Leptospirose em animais domésticos e silvestres. Prevenção e controle. In: ESTADO DA ARTE E PRIORIDADES PARA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM LEPTOSPIROSE, 2000, Salvador. **Anais...** Salvador: Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2000. p. 181-208.
- SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, v. 1, p. 97-109, 1970.

17. GALTON, M. M. et al. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 81-85, 1965.
18. ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 669 p.
19. BURNSTEIN, T; BAKER, J. A. Leptospirosis in swine. **Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 53-64, 1954.