

MALÁRIA EXPERIMENTAL: CONTAMINAÇÃO DE CEPAS E ANIMAIS DE BIOTÉRIO POR EPERYTHROZON COCCOIDES

Heitor Franco de ANDRADE JR., Márcia Dalastra LAURENTI, Hiro GOTO, Maria Irma Seixas DUARTE & Carlos Eduardo Pereira CORBETT

RESUMO

Neste artigo descrevemos a contaminação acidental de uma cepa de malária de roedor (*Plasmodium berghei*) por um hemoparasita (*Eperythrozoon coccoides*), levando a alterações importantes no comportamento da malária experimental. A demonstração do parasita foi feita por microscopia óptica e eletrônica e a fonte de contaminação foi detectada em roedores normalmente utilizados na manutenção da cepa, obtidos do mesmo biotério. As medidas disponíveis para o controle deste tipo de infecção são discutidas propondo-se a utilização de tetraciclina em matrizes e posterior utilização de animais F1 não tratados. Comenta-se a importância deste tipo de contaminação experimental.

UNITERMOS: *Eperythrozoon coccoides* — Malária experimental — Contaminação

INTRODUÇÃO

A contaminação de modelos experimentais por alguns parasitas pode determinar alterações das características das doenças, levando a interpretações errôneas que invalidam os experimentos. Um dos parasitas frequentemente implicado em contaminações acidentais é o *Eperythrozoon coccoides*¹², um hemoparasita do sangue de roedores que vive na superfície de hemácias e no plasma de roedores, em particular camundongos³. A transmissão é feita através de materiais contendo sangue infectado, sendo de transmissibilidade muito alta, bastando uma hemácia contaminada para dar início à infecção⁷. O vetor natural é um ectoparasita de camundongo, *Poliplax serrata*, que transmite a infecção por picada ou solução de continuidade da pele, não havendo ciclo do parasita no inseto⁴. A transmissão pelo leite ou via transplacentária não foi confirmada¹⁶, embora tenha sido sugerida frente à grande prevalência da infecção em biotérios aparentemente livres de ectoparasitas².

A infecção de camundongos por *E. coccoides* apresenta duas fases diferentes. A primei-

ra, de proliferação, dura até 8 a 10 dias e caracteriza-se pelo aparecimento de grande número de parasitas no sangue. A seguir instala-se uma fase latente, que coincide com o aparecimento de anticorpos específicos, com diminuição importante no número de parasitas circulantes. Esta fase só é detectada quando o animal é submetido a manobras imunossupressoras, como a esplenectomia, que provocam um aumento no número de parasitas circulantes⁹. Com o uso de ciclofosfamida, a infecção aguda inicial se mantém, com 100% de letalidade⁵.

Os mecanismos de controle do parasita parecem estar relacionados à fagocitose dependente de anticorpos, sendo que em animais em fase latente de infecção, há um aumento da capacidade fagocítica inespecífica do hospedeiro⁶.

Há Autores que sugerem que a possibilidade de reativação da fase latente ocorreria durante toda a vida do animal¹⁶, embora outros Autores tenham determinado que a fase latente

teria a duração de 8 a 10 semanas após o quadro agudo inicial⁵.

A infecção por *E. coccoides* pode modificar o comportamento de outras doenças concomitantes, que tornam-se mais lentas e benignas, devido provavelmente à competição entre os parasitas, como acontece com a malária e a babesiose experimentais^{1,10,11}.

A detecção deste agente é basicamente morfológica¹⁴, pois não foi conseguido até o momento o cultivo, nem em meios livres de células nem em culturas de tecido¹.

Foram observadas alterações no curso da malária experimental por *P. berghei* em camundongos e hamsteres, em nosso laboratório, com diminuição da parasitemia, curso prolongado da infecção e menor letalidade. A presença de *E. coccoides* foi identificada em esfregaço de sangue parasitado pelos Dr. Virgílio E. Rosário (I.E. Chagas, Belém-PA) e David Walliker (Universidade de Edimburgo). A partir deste achado nos propusemos a: identificar a contaminação por *E. coccoides* de nossa cepa de *P. berghei*; detectar a infecção latente por *E. coccoides* nos animais utilizados na manutenção da malária experimental; propor e avaliar medidas terapêuticas e de controle da infecção, e finalmente avaliar criticamente o comportamento de nossa cepa ou de outras cepas de malária experimental em nosso biotério.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e parasitas

A cepa de *P. berghei* que vinha sendo utilizada em nossos experimentos (PbE) foi obtida do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, onde era mantida por inóculos peritoneais de sangue infectado em camundongos, sem passagem por vetor anofelino por muitos anos. A outra cepa de *P. berghei* utilizando, (ANKA), foi gentilmente fornecida pelo Dr. David Walliker, da Universidade de Edimburgo.

Os animais (camundongos, camundongos Balb/C, ratos e hamsteres) utilizados nos experimentos, foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo mantidos em ambiente telado, livres de ectoparasitas por pulverização

com produto comercial (Bolfo, Bayer do Brasil) e em meios absorventes esterilizados.

Microscopia óptica

Para os estudos em microscopia óptica, utilizamos esfregaços de sangue periférico obtidos de cauda ou punção cardíaca dos vários animais, corados pelo Giemsa ou Romanowski. As lâminas foram observadas em microscopia óptica, determinando-se o número de corpúsculos por 1 000 hemácias.

Microscopia eletrônica

A amostra de sangue colhida por punção cardíaca de camundongo infectado por cepa suspeita, foi fixada em suspensão com 20 volumes de glutaraldeído a 2% tamponado com fosfato por 1 hora a 4°C. Após centrifugação a 700g por 10 minutos e lavagem das células com solução salina tamponada com fosfato, o precipitado foi pós-fixado com 20 volumes de tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora a 4°C. Para a formação de um precipitado estável as células foram então centrifugadas a 10000g por 5 minutos, sendo o precipitado processado para inclusão em Araldite e ultramicrotomia. Os cortes foram observados em microscópio eletrônico Zeiss EM-9, após contrastação com acetato de chumbo.

Investigação da infecção latente por *E. coccoides* em animais experimentais

Na pesquisa da infecção latente, foram avaliados animais que eram utilizados para a manutenção das cepas de malária experimental, sem tratamento prévio. A detecção da infecção foi feita através da reativação da eperitrozoonemia, após esplenectomia. Camundongos (2), hamsteres (4) e ratos (2) foram submetidos a esplenectomia, sendo que outro grupo de animais foi mantido em nossas condições ambientais, para avaliação da introdução da infecção intra-laboratorial.

Pesquisa da contaminação do *E. coccoides* das cepas de *P. berghei*

Para a pesquisa da contaminação e sua possível influência no comportamento das cepas de malária experimental, foram mantidos ex

perimentos utilizando camundongos não tratados e camundongos isogênicos Balb/C livres de *E. coccoides*. Camundongos (5 por grupo) foram inoculados com 10^5 hemácias parasitadas por via intraperitoneal, sendo obtidos esfregaços diários da cauda, com determinação da eperitrozonemia e parasitemia, após coloração pelo Giemsa. A avaliação foi interrompida quando alcançava-se uma mortalidade de 50%.

RESULTADOS

Identificação morfológica da contaminação da cepa PbE de *P. berghei* por *Eperythrozoon coccoides*

A pesquisa foi feita no sangue periférico de camundongo albino inoculado com 10^6 hemácias parasitadas da cepa PbE, sendo que pode-se observar na Fig. 1 um esfregaço de sangue pe-

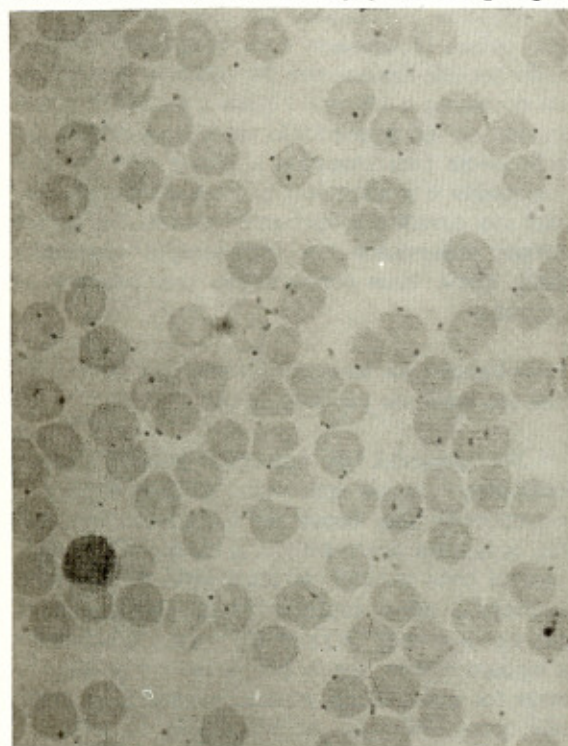


Fig. 1 — Fotomicrografia de esfregaço de sangue periférico na fase aguda, mostrando corpúsculos de *E. coccoides*. Giemsa 630 \times

riférico obtido no 3.º dia após a infecção. Existem cerca de 1000 corpúsculos de *E. coccoides* por 1000 hemácias, com alguns livres no plasma e o restante aderido à superfície de hemácias.

Os achados ultraestruturais deste camundongo podem ser observados na Fig. 2, onde é mos-

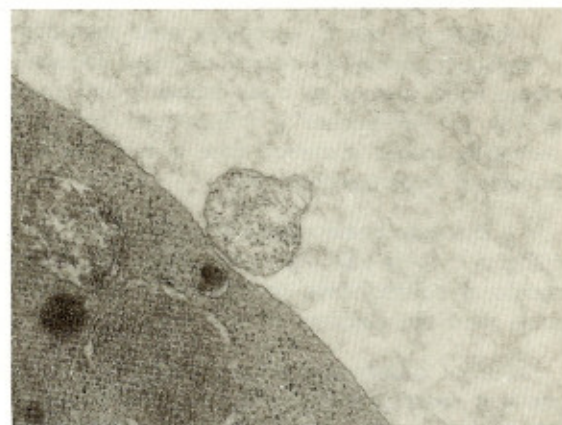


Fig. 2 — Fotomicrografia eletrônica de um corpúsculo de *E. coccoides* aderido à superfície de um reticulócito. 35000 \times

trado um corpúsculo com morfologia ovalada, aderido à superfície de um reticulócito parasitado, com pouco material interposto entre a sua membrana e a do reticulócito, sem formação de concavidade evidente ou concentração de material no lado citoplasmático do reticulócito. O protoplasma do parasita apresenta grânulos e filamentos sem presença de estrutura definida havendo subestruturas de membranas do lado oposto ao da ligação com o reticulócito.

Investigação da fonte de infecção

Na pesquisa da fonte de contaminação procuramos observar a presença de infecção latente em animais utilizados na manutenção da cepa e sem tratamento prévio, através da esplenectomia.

Na Fig. 3a podemos observar o comportamento da eperitrozonemia nos animais testados quando analisados por grupos de animais. Todos os grupos de animais apresentaram um aumento numérico dos corpúsculos compatíveis com reativação enquanto animais controles mantidos em nosso laboratório não apresentaram alteração significativa nos níveis de corpúsculos. Os níveis médios dos grupos foram diferentes para as várias espécies estudadas. Os hamsters apresentaram sempre níveis menores de corpúsculos.

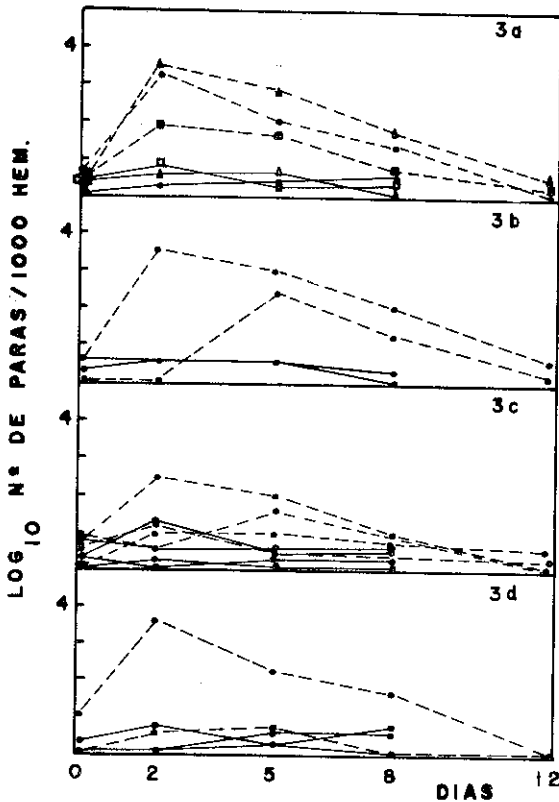


Fig. 3 — Evolução de eperitrozoonemia em animais de biotério
3a — Evolução média nas espécies pesquisadas:
Ratos (▲) Camundongos (●) Hamsteres (□)
3b — Evolução da eperitrozoonemia no rato
3c — Evolução da eperitrozoonemia no hamster
3d — Evolução da eperitrozoonemia no camundongo
As linhas tracejadas (---) representam os animais esplenectomizados, enquanto que a linha contínua (—) representa os animais controles de infecção neste experimento.

A análise dos dados mostra que o comportamento que cada espécie animal apresentou não foi homogêneo e que pode ser observado nas figuras: 3b (ratos), 3c (hamsteres) e 3d (camundongos). Todos os ratos esplenectomizados apresentaram eperitrozoonemia elevada, enquanto que hamsteres e camundongos apresentaram animais sem reativação associados com animais com reativação evidente. Os níveis de eperitrozoonemia em hamsters foi sempre inferior ao das outras espécies. Em todos os animais houve retorno aos níveis basais no 12.º dia da esplenectomia. A porcentagem de animais, independente da espécie que apresentaram reativação foi 60% (5 de 8 animais).

Pesquisa da contaminação e avaliação do comportamento das cepas de malária experimental

Para a detecção biológica da contaminação por *E. coccoides* da cepa PbE de *P. berghei*, foram utilizados dois tipos de camundongos, um grupo contaminado (albino) e outro livre de *E. coccoides* (Balb/C). Para avaliação do comportamento da cepa, foi utilizada uma cepa de *P. berghei* ANKA.

Na Fig. 4a podemos observar a evolução da cepa PbE em camundongos albinos, notando o aparecimento, no 2.º dia, de eperitrozoonemia intensa que se reduziu no 5.º dia, para se elevar novamente, desta vez em associação com o desenvolvimento da parasitemia malárica. Em camundongos Balb/C inoculados com a cepa PbE (Fig. 4b) tanto a eperitrozoonemia quanto a parasitemia malárica, mantiveram níveis bastante semelhantes aos encontrados em camundongos albinos, tendo sido encontrada uma mortalidade de 50% ao nível do 18.º dia do inóculo. Nos camundongos Balb/C infectados com a cepa ANKA (Fig. 4c) houve uma elevação rápida da parasitemia, significativa em relação à cepa PbE ($p < 0,01$), sem aparecimento de aumento significativo da eperitrozoonemia. A mortalidade de 50% ocorreu no 13.º dia, tendo estes animais apresentados níveis mais elevados de parasitemia malárica.

DISCUSSÃO

A demonstração de corpúsculos de *E. coccoides* durante a infecção experimental por *P. berghei* cepa PbE foi conseguida por métodos morfológicos, tanto por microscopia óptica como eletrônica. Os achados ultraestruturais definem o agente contaminante pois as características ultraestruturais são apenas compatíveis com *E. coccoides*, afastando outros hemoparasitas como a *Haemobartonella muris*, que causaria uma concavidade bastante acentuada da membrana da hemácia¹⁴

As alterações de comportamento encontradas na cepa PbE estão relacionadas com a presença deste contaminante, proveniente do inóculo de sangue contaminado, determinando uma competição entre os parasitas, provavelmente por fatores nutricionais¹ que seriam consumidos

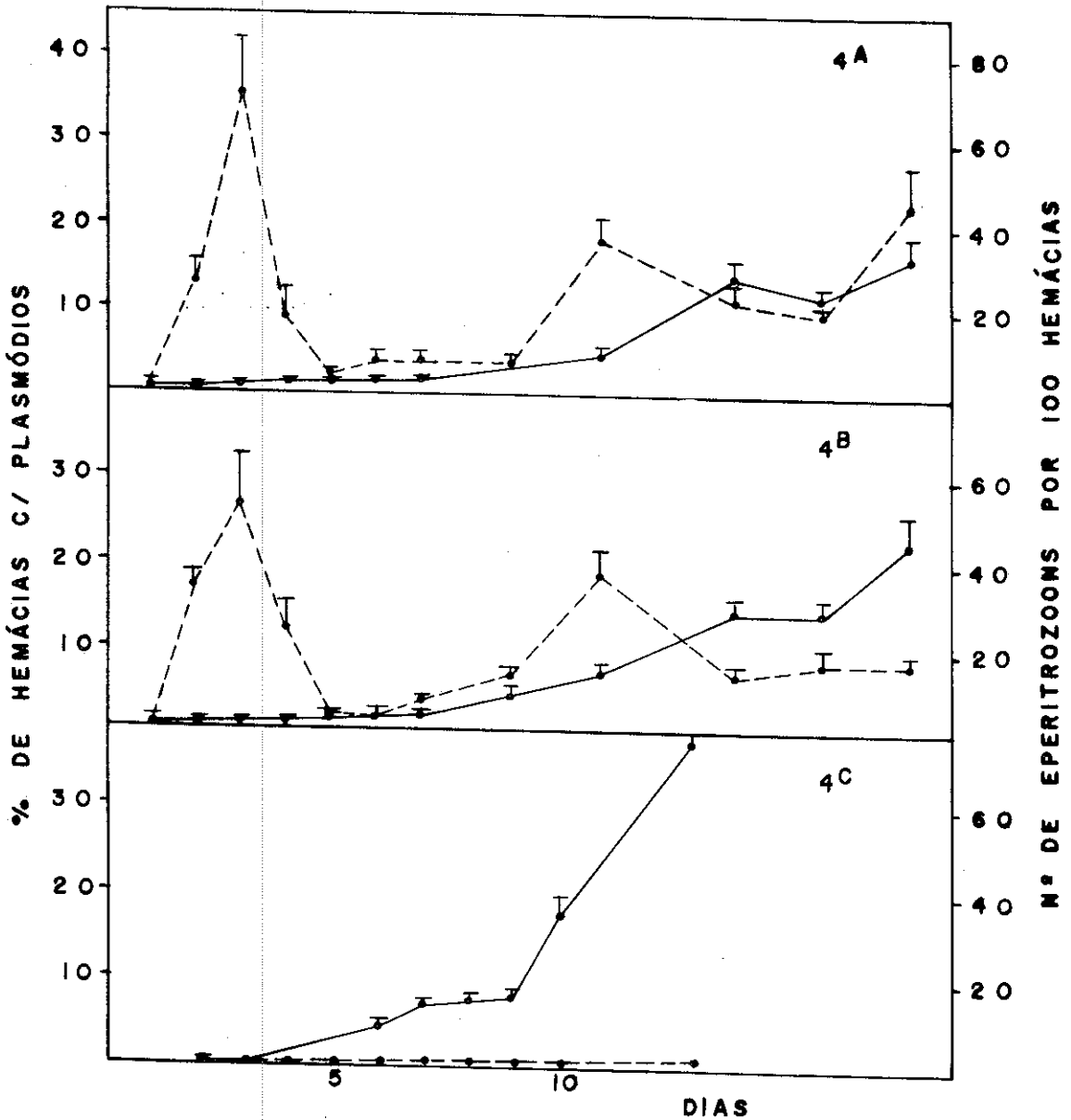


Fig. 4 — Análise do comportamento das cepas em animais experimentais, em relação ao desenvolvimento de parasitemia e eperitrozoonemia

4A — Camundongo out-bred x cepa PbE

4B — Camundongo in-bred F1 x cepa PbE

4C — Camundongo in-bred F1 x cepa ANKA

Parasitemia malárica (—)

Eperitrozoonemia (- - -)

As barras representam o erro padrão de cada ponto.

dos pelos corpúsculos, gerando uma deficiência relativa para o crescimento de *P. berghei*, de maneira semelhante ao que ocorre em animais com dieta deficiente em ácido fólico⁸.

Um achado significativo foi a ocorrência de uma reativação da eperitrozoonemia durante as fases de maior parasitemia malárica. Isto provavelmente se deve a um comprometimen

te da atividade fagocítica pela infecção malárica que resulta em deficiência no controle da eperitrozoonemia¹. Este fato é extremamente importante pois é nesta fase que é obtido material para manutenção da cepa de malária.

A introdução deste contaminante está relacionada com a prevalência da infecção nos biotérios, geralmente devido a surtos de ectoparasitoses, ocasionando um número grande de animais com infecções latentes. O achado de infecção latente em três grupos de roedores normalmente utilizados para a manutenção da cepa mostra a origem da contaminação do inóculo. Não foram detectados ectoparasitas nos animais utilizados, na época da recepção do biotério central, mas existem descrições de infecção latente em biotérios livres de ectoparasitas¹.

A eliminação da contaminação em cepas de Plasmódios de roedor é um problema de difícil solução, pois o parasita é aderido à hemácias, não é separável por meios convencionais de centrifugação e apresenta uma grande estabilidade em materiais sob refrigeração^{13,16}. Existem tratamentos que controlam a infecção mas a droga de escolha, a neorastenamina, não é mais fabricada, não sendo encontrada no mercado. A opção de tratamento são as tetraciclina¹⁵, mas estas afetam os plasmódios, além de provocarem lesões ósseas e hepáticas¹⁷. A opção encontrada de obtenção de animais F1, a partir de matrizes previamente tratadas com tetraciclina revelou-se eficaz não mostrando alterações no comportamento da cepa ANKA, nem o aparecimento de corpúsculos na fase de maior parasitemia malárica.

A evolução da malária experimental induzida pela cepa ANKA de *P. berghei* foi semelhante ao modelo experimental utilizado em nosso laboratório, antes da contaminação, com níveis de parasitemia e letalidade semelhante (R. V. C. ASSIS, comentário pessoal).

A utilização de animais experimentais contaminados por *E. coccoides* é um problema importante e pode levar a resultados errôneos em experimentos tecnicamente bem executados. As alterações determinadas no sistema imune por este parasita acarretam também interferências graves em estudos imunológicos, sendo obrigatório o controle deste tipo de infecção em to-

dos dos biotérios, para obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. O tratamento das matrizes com tetraciclina e a eliminação de ectoparasitas, com obtenção de animais F1 parece ser a maneira mais segura, no momento, de obtenção de animais sem qualquer tratamento e livres do contágio com este parasita.

Friza-se que a contaminação de nossa cepa é fenômeno recente, pois a recuperação de esfregaços obtidos em 1980, da cepa PbE não mostrou a presença de corpúsculos perihemáticos.

SUMMARY

Experimental malaria: Contamination of malaria strain and experimental animals by eperythrozoon coccoides

This report describes an accidental contamination of a murine malaria strain (*Plasmodium berghei*) by a hemoparasite (*Eperythrozoon coccoides*) which resulted in important modification of the experimental malarial infection behaviour. The hemoparasite was detected by optical and electron microscopy, and the contamination was attributed to rodents usually employed in the strain maintenance, obtained from the same colony. Control measures available for this type of accidental infections are discussed and proposed the use of parenteral tetracyclines in breeding animals using the untreated F1 animals, for experimentation. The importance of this contamination is discussed in some detail.

AGRADECIMENTOS

Aldo Erbeta Filho e Maria Lúcia das Graças Burin Barits, pela colaboração técnica. FINEP — pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, H. J.; CASELL, G. H. & LINDSAY, J. R. — Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. *Amer. J. Path.*, 64: 625-655, 1971.
2. BERRIER, H. H. & GAUGE, G. E. — *Eperythrozoonosis* transmitted "in utero" from carrier sow to their pigs. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 124: 98-100, 1954.
3. BRUYNOGHE, R. & VASSILIADIS, P. — Contribution a l'étude des eperythrozaires coccoides. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 7: 353-364, 1929.

4. ELIOT, C. P. — The insect vector for the natural transmission of *Eperythrozoon coccoides* in mice. *Science*, 84: 397, 1936.
5. GLASGOW, L. A.; MURRER, A. T. & LOMBARDI, P. S. — *Eperythrozoon coccoides*. Effect on interferon production and role of humoral antibodies in host resistance. *Infect. Immun.*, 9: 266-272, 1974.
6. HYDE, C. L.; FINERTY, J. F. & EVANS, C. B. — Antibody and immunoglobulin synthesis in germ-free and conventional mice infected with *Eperythrozoon coccoides*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 21: 506-511, 1972.
7. KREIER, J. P. & RISTIC, M. — Haemobartonellosis, *Eperythrozoonosis*, *Grahamellosis* and *Ehrlichiosis*. In: WEINMAN, D. & RISTIC, M., ed. — *Infections diseases of man and animals*. New York, Academic Press, 1968. v. 2, p. 382-472.
8. MAEGRAITH, B. G.; DEEGAN, T. & JONES, E. S. — Suppression of malaria (*P. berghei*) by milk. *Brit. med. J.*, 2: 1382-1384, 1952.
9. MARMONSTON, J. — Effect of splenectomy on a latent infection, *Eperythrozoon coccoides*, in white mice. *J. Infect. Dis.*, 56: 142-152, 1934.
10. OTT, K. A. & STAUBER, L. A. — *Eperythrozoon coccoides*: Influence on course of infection of *Plasmodium chabaudi* in mice. *Science*, 155: 1546-1548, 1967.
11. PETERS, W. — Competitive relationship between *Eperythrozoon coccoides* and *Plasmodium berghei* in the mouse. *Exp. Parasit.*, 16: 158-166, 1965.
12. SCHILLING, V. — *Eperythrozoon coccoides*, eine neue durch splenektomie aktivierbare Dauerinfektion der weissen Maus. *Klin. Wschr.*, 7: 1854-1855, 1928.
13. STANSLY, P. C. & NEILSON, C. F. — Sedimentation of *Eperythrozoon coccoides*. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 121: 363-365, 1966.
14. TANAKA, H.; HALL, W. T.; SHEFFIELD, J. B. & MOORE, D. H. — Fine structure of *Haemobartonella muris* as compared with *Eperythrozoon coccoides* and *Mycoplasma pulmonis*. *J. Bact.*, 90: 1735-1749, 1965.
15. THURSTON, J. P. — The chemotherapy of *Eperythrozoon coccoides* (Schilling, 1928). *Parasitology*, 43: 170-173, 1953.
16. THURSTON, J. P. — Observations on the course of *Eperythrozoon coccoides* infections in mice, and the sensitivity of the parasites to external agents. *Parasitology*, 45: 141-151, 1955.
17. WEINSTEIN, L. — Tetracyclines and Chlororanphenicol. In: GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. — *The pharmacological basis of therapeutics*. London, MacMillan, 1975. p. 1183-1200.

Recebido para publicação em 13/9/1985