

IMUNIZAÇÃO DE RATOS COM LARVAS INFECTANTES DE *STRONGYLOIDES RATTI* IRRADIADAS EM FONTE DE COBALTO-60¹

JACKSON VICTOR DE ARAÚJO², MARCOS PEZZI GUIMARÃES³ e ANTÔNIA C. CELIEZAR GARCIA⁴

RESUMO - Foi realizado um estudo do comportamento de ratos imunizados com larvas de *Strongyloides ratti* irradiadas na dose de 50 Kr em fonte de Cobalto-60. Foram utilizadas duas cepas de *S. ratti* mantidas em ratos de laboratório (*Rattus norvegicus albinus*) e 48 ratos divididos em quatro grupos de doze ratos nos testes de cada cepa. Foram realizadas, a partir do sexto dia após a infecção inicial e de cinco em cinco dias, contagens de ovos por grama de fezes (OPG), titulação de imunoglobulinas da classe G anti-*S. ratti* pela técnica de ELISA, contagens diferenciais de leucócitos, e necrópsias periódicas. Observou-se melhor proteção nos animais imunizados e desafiados com larvas não irradiadas das duas cepas de *S. ratti* no 30º dia. Os títulos de imunoglobulinas da classe G anti-*S. ratti* foram detectados a partir do 10º dia e apresentaram picos entre o 15º e 25º dia em todos os grupos. Houve maior participação percentual de linfócitos nos grupos infectados, em relação ao grupo controle não infectado, a partir do 10º até o 45º dia.

Termos para indexação: animais domésticos, comportamento de ratos, larvas irradiadas, imunoglobulinas.

IMMUNIZATION OF RATS WITH INFECTIVE LARVAE OF 60 Co IRRADIATED *STRONGYLOIDES RATTI*

ABSTRACT - A study was made of the behavior of rats immunized with 50 Kr dose 60 Co irradiated larvae of *Strongyloides ratti*. Two *S. ratti* strains maintained in laboratory rats (*Rattus norvegicus albinus*) and forty eight rats separated into four groups of twelve rats each were utilized to test each strain of *S. ratti*. EPG counts, white cell differential counts in peripheric blood, periodic necropsies and Ig G anti-*S. ratti* tests by the ELISA technique were made on the 6th day and at 5-day intervals after the initial infection. A better protection was observed in animals challenged with non-irradiated larvae of the 2 *S. ratti* strains on the 30th day. The Ig G anti-*S. ratti* serum titers were detected from the 10th day on, presenting peaks between the 15th and 25th days in all groups. There was a high percentage of lymphocytes from the 10th day until the 45th day in the stained blood film of the infected group in relation to the non-infected control group.

Index terms: domestic animals, rats behaviour, irradiated larvae, immunoglobulins.

INTRODUÇÃO

Strongyloides ratti é um nematóide que parasita naturalmente ratos selvagens e pode ser mantido facilmente em laboratório. Este helminto tem sido amplamente utilizado como modelo para o estudo da resposta de animais domésticos e do homem a infecções por *Strongyloides* sp.

¹ Aceito para publicação em 27 de novembro de 1990
Trabalho financiado pelo CNPq-UFMG.

² Méd. - Vet., M.Sc. em Parasitol. Prof. - Assist., Dep. de Vet., UFV, CEP 36570 Viçosa, MG. Bolsista do CNPq.

³ Méd. - Vet., Dr. em Parasitol., Prof. - Titular, Dep. de Parasitol., ICB/UFMG, Caixa Postal 2486, CEP 30000 Belo Horizonte, MG. Bolsista do CNPq.

⁴ Microbiol., M.Sc. em Parasitol., Dep. de Parasitol., ICB/UFMG.

A expulsão de vermes adultos e a resistência a desafios com larvas infectantes de *S. rattii* são medidas imunologicamente.

Murrell (1981) demonstrou a importância de imunoglobulinas da classe G (IgG) na proteção a estágios larvais, enquanto Korenega et al. (1986) demonstraram o papel de imunoglobulinas da classe E (IgE) em resposta a vermes adultos. Genta et al. (1983) relata a importância do papel de linfócitos em infecções por *S. rattii*. Entretanto, os mecanismos de ação de imunoglobulinas e células na proteção à Strongyloidose ainda precisam ser elucidados.

Chaia & Murta (1967) foram os primeiros autores a estudar a ação da irradiação em fonte de Cobalto-60 sobre as larvas de *S. rattii*, e estabeleceram que larvas submetidas à dose de 50 Kr produziam vermes estéreis. Estudos posteriores, utilizando larvas irradiadas em fonte de cobalto-60, foram realizados por Rego & Kahtalian (1972).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de ratos imunizados com larvas irradiadas em fonte de cobalto-60 a subseqüentes desafios.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas cepas de *Strongyloides rattii*: Cepa São Paulo, mantida há mais de 20 anos em ratos de laboratório (*Rattus norvegicus albinus*), e Cepa selvagem, obtida, há três anos, de ratos de rua (*Rattus norvegicus*) e mantida por passagens seriadas em ratos de laboratório.

As larvas infectantes de *S. rattii* foram obtidas após coprocultura em carvão vegetal à estufa de 26°C, por dois dias, e recuperadas em aparelho de Baermann, com água a 42°C. Em seguida, as larvas infectantes foram lavadas e ressuspendidas por três vezes em Salina Buffer fosfato (PBS) e contadas com o uso de pipeta graduada de, 0,1 ml. Algumas larvas infectantes foram irradiadas em bomba de cobalto-60 na dose de 50 Kr.

Foram utilizados 48 ratos de laboratório do sexo masculino e com oito semanas de idade, divididos em quatro grupos de doze ratos, para cada uma das duas cepas de *S. rattii* utilizadas. Os ratos de cada grupo receberam o seguinte tratamento:

- Grupo 1 - Administração subcutânea de 2.000 larvas infectantes irradiadas, e, 15 dias após, desafio com 2.000 larvas infectantes não irradiadas.

- Grupo 2 - Administração subcutânea de 2.000 larvas infectantes irradiadas, e, 30 dias após, desafio com 2.000 larvas infectantes não irradiadas.

- Grupo 3 - Administração subcutânea de 2.000 larvas infectantes não irradiadas.

- Grupo 4 - Ratos livres de infecções helmínticas.

A partir do sexto dia após a infecção inicial, e de cinco em cinco dias, foram realizados os seguintes exames laboratoriais:

- Contagem de ovos por grama de fezes (OPG), usando câmara de McMaster segundo técnica de Whitlock (1948).

- Titulação de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti-*S. rattii* do soro pela ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), segundo técnica de Sato et al. (1985), utilizando placas de ELISA e conjugado (anti-IgG total de ratos) marcado com peroxidase.

- Contagens diferenciais de leucócitos do sangue periférico após coloração de GIEMSA.

Para a obtenção de vermes adultos, foram realizadas necrópsias periódicas de dois ratos. Os intestinos foram revertidos em provetas de 500 ml contendo salina 0,9% a 42°C por seis horas, e colhido o sedimento. Do grupo 1, as necrópsias foram realizadas 20,30 e 40 dias após a infecção inicial. Do grupo 2, as necrópsias foram realizadas 35, 45 e 55 dias após a infecção inicial, e as dos grupos 3 e 4, 10, 20 e 30 dias após a infecção inicial.

Para fins de análise estatística, os resultados foram analisados pelo teste T, de Student, segundo Snedecor & Cochran (1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão representadas as distribuições das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e dos vermes adultos recuperados, após as necrópsias, da cepa São Paulo.

Nos grupos 1 e 2, o número de OPG manteve-se negativo até o 15º dia e 30º dia, respectivamente. Isto indica que a irradiação das larvas em Cobalto-60, na dose de 50 Kr, produziu vermes adultos estéreis.

Após o desafio com larvas não irradiadas, o grupo 1 apresentou uma tendência de aumento do número de OPG até o 30º dia, para depois

declinar e se negativar no 55º dia. No grupo 2, o OPG após o desafio se manteve em níveis baixos; no grupo 3, o pico de produção de ovos ocorreu no 10º dia, com queda gradual até o 40º dia.

Nas necrópsias foi recuperada maior quantidade de vermes adultos no grupo 3, havendo diferença significativa ($P \leq 0,05$) deste grupo em relação aos demais. Nos grupos 1 e 2, foi recuperada menor quantidade de vermes adultos no grupo 2 e maior quantidade no grupo 1 após o desafio, com diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Na Tabela 2 estão representadas as distribuições das contagens de ovos por grama de fezes (OPG), e dos vermes adultos recuperados, após as necrópsias, da cepa selvagem.

Nos grupos 1 e 2, o número de OPG manteve-se negativo até o desafio, indicando que a exposição das larvas ao Cobalto-60 produziu vermes estéreis.

Após o desafio, o número de OPG dos grupos 1 e 2 se manteve em níveis baixos, enquanto que no grupo 3 o pico de produção de ovos foi no 10º dia, com queda gradual até o 40º dia.

Nas necrópsias foi recuperada maior quantidade de vermes adultos no grupo 3, havendo diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) deste grupo em relação aos demais. Nos grupos 1 e 2, foi recuperada menor quantidade de vermes adultos no grupo 2 e maior quantidade no grupo 1 após o desafio, com diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Estes resultados sugerem que houve melhor proteção a desafios nos animais do grupo 2, tanto com larvas da cepa São Paulo quanto da selvagem. Rego & Kahtalian (1972) também encontraram exames de fezes positivos de ratos imunizados com larvas irradiadas na dose de 50 Kr em fonte de Cobalto-60 e desafiados com larvas não irradiadas.

Murrell (1980) e Korenega et al. (1983) relatam que os vermes adultos são expelidos do intestino em um período máximo de quatro semanas após a infecção, e os animais adquirem alta resistência a subseqüentes infecções; entretanto, no presente trabalho foram evidenciadas contagens de OPG positivas até o 40º dia em ratos infectados com larvas das duas cepas.

TABELA 1. Distribuição das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e vermes adultos recuperados após as necrópsias de ratos infectados com a cepa São Paulo.

Dias após a infecção inicial	Contagens de ovos por grama de fezes (OPG)				Vermes adultos recuperados após as necrópsias			
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄
6º	0	0	6.000	0				
10º	0	0	8.600	0			65	0
15º	0	0	3.800	0				
20º	400	0	1.200	0	31,5		92	0
25º	300	0	400	0				
30º	500	0	200	0	92,5		63,5	0
35º	300	200	200	0		4		
40º	200	0	200	0	3,5			
45º	100	0	0	0		51		
50º	100	200	0	0				
55º	0	0	0	0		1		

G₁ = Grupo 1 G₂ = Grupo 2 G₃ = Grupo 3 G₄ = Grupo 4

TABELA 2. Distribuição das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e vermes adultos recuperados após as necrópsias de ratos infectados com a cepa selvagem.

Dias após a infecção inicial	Contagens de ovos por grama de fezes (OPG)				Vermes adultos recuperados após as necrópsias			
	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄
6º	0	0	4.100	0				
10º	0	0	6.100	0			112,5	0
15º	0	0	2.100	0				
20º	200	0	600	0	40,5		377,5	0
25º	0	0	500	0				
30º	100	0	200	0	8		29	0
35º	0	0	100	0		1		
40º	0	0	300	0	0			
45º	0	400	0	0		6		
50º	0	0	0	0				
55º	0	200	0	0		5		

G₁ = Grupo 1 G₂ = Grupo 2 G₃ = Grupo 3 G₄ = Grupo 4

Na Fig. 1 estão representados os títulos de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti-*S. ratti* de ratos dos grupos 1, 2 e 3 infectados com a cepa São Paulo.

Em todos os grupos, as imunoglobulinas da classe G foram detectadas a partir do 10º dia. No grupo 1, o pico de IgG foi encontrado no 15º dia e manteve-se em um platô até o 30º dia, para em seguida declinar. No grupo 2, o pico de IgG foi encontrado no 20º dia, e os títulos caíram rapidamente após este pico. No grupo 3, os títulos de IgG se comportaram como no grupo 1, para depois declinar a partir do 35º dia. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Na Fig. 2 estão representados os títulos de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti-*S. ratti* de ratos dos grupos 1, 2 e 3 infectados com a cepa selvagem.

Nestes grupos, os títulos de IgG foram detectados a partir do 10º dia. No grupo 1, o pico de IgG foi encontrado no 20º dia, cinco dias após o desafio. No grupo 2, o pico de IgG foi encontrado no 15º dia com declínio a partir do 25º dia. No grupo 3, o pico de IgG foi encontrado no 25º dia, e depois declinou.

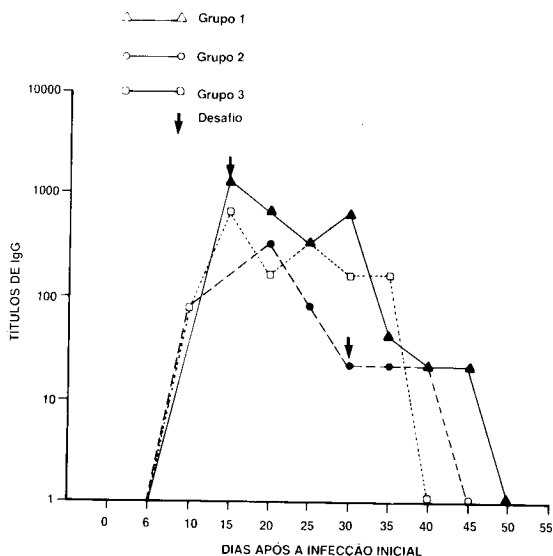


FIG. 1. Títulos de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti - *Strongyloides ratti* de ratos infectados com a cepa São Paulo.

Não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos 1, 2 e 3.

Os animais do grupo 4 não apresentaram títulos de imunoglobulinas da classe G em todos os teores.

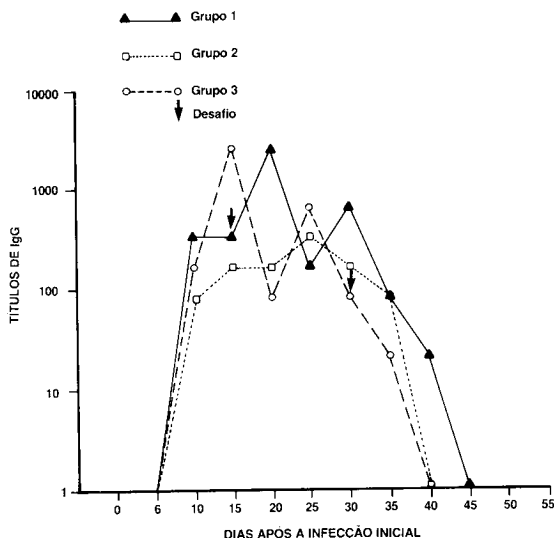


FIG. 2. Títulos de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti - *Strongyloides ratti* de ratos infectados com a cepa selvagem.

Murrel (1981) demonstrou a importância de IgG na proteção a infecções por *S. ratti*; entretanto, o seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Genta et al. (1983) detectaram títulos de IgG a partir do 8º dia após a infecção, com pico no 24º dia de declínio a partir do 30º dia, e em desafio posterior, no 120º dia, ocorreu ligeira elevação dos títulos de IgG.

No presente trabalho, houve elevação dos títulos de IgG, após o desafio, somente no grupo 1, infectado com larvas da cepa selvagem. Entretanto, este resultado poderia ser decorrente da elevação natural da curva de IgG, devido à infecção inicial. O rápido declínio dos títulos de IgG poderia ser resultado do curto período de vida média de imunoglobulinas desta classe. Rousseaux & Bazin (1979) observaram uma vida média de apenas cinco dias.

Nas contagens diferenciais de leucócitos, tanto em animais infectados com larvas da cepa São Paulo quanto da cepa selvagem, houve maior participação percentual de linfócitos nos grupos infectados em relação ao grupo 4 a partir do 10º dia (Fig. 3 e 4). Estes dados con-

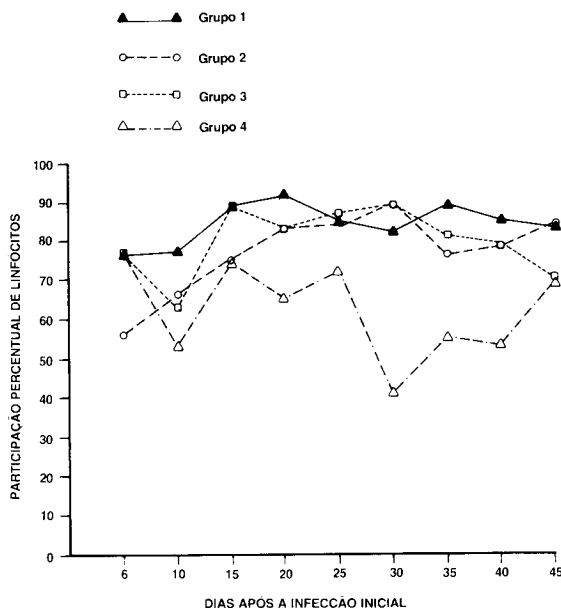


FIG. 3. Participação percentual de linfócitos na contagem diferencial de leucócitos de ratos infectados com larvas de *Strongyloides ratti* da cepa São Paulo e do grupo-controle.

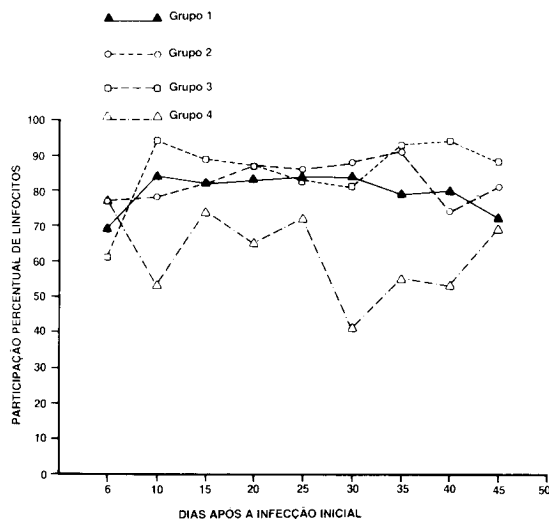


FIG. 4. Participação percentual de linfócitos na contagem diferencial de leucócitos de ratos infectados com larvas de *Strongyloides ratti* da cepa selvagem e do grupo-controle.

cordaram com os de Genta et al. (1983), que observaram uma forte resposta blastogênica de linfócitos no sangue periférico de ratos infectados com pico no 16º dia. Entretanto, estes autores observaram queda após este pico até o 26º dia. No presente trabalho, as participações percentuais de linfócitos permaneceram altas até o 45º dia. Houve diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) do grupo 4 em relação aos outros grupos.

CONCLUSÕES

1. Houve melhor proteção a desafios nos animais imunizados e desafiados com larvas não irradiadas das duas cepas de *S. ratti* no 30º dia.
2. Os títulos de imunoglobulinas da classe G anti-*S. ratti* do soro foram detectados a partir do 10º dia, e apresentaram picos entre o 15º ao 25º dia, em todos os grupos.
3. Houve maior participação percentual de linfócitos no sangue periférico nos grupos infectados, em relação ao grupo controle não infectado a partir do 10º dia e persistiram até o 45º dia.

REFERÊNCIAS

- CHAIA, G.; MURTA, C.C. Immunization of rats with irradiated *Strongyloides* larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.9, n.3, p.163-168, 1967.
- GENTA, R.M.; OTTESEN, E.A.; GAM, A.A.; NEVA, F.A. Immunologic responses to experimental strongyloidiasis in rats. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, Heidelberg, v.69, n.5, p.667-675, 1983.
- KORENEGA, M.; NAWA, Y.; MINORI, T.; TADA, I. *Strongyloides ratti*. The role of enteral antigenic stimuli by adult worms in the generation of protective immunity in rats. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.55, n.3, p.358-363, 1983.
- KORENEGA, M.; NAWA, Y.; TADA, I. Ig E response in *Strongyloides ratti* infected rats with special reference to the life cycle of the parasite. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, Heidelberg, v.72, n.2, p.213-220, 1986.
- MURRELL, K.D. Protective role of immunoglobulin G in immunity to *Strongyloides ratti*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.67, n.2, p.167-173, 1981.
- MURRELL, K.D. *Strongyloides ratti*: Acquired resistance in the rat to the preintestinal migrating larvae. **Experimental Parasitology**, Orlando, v.50, n.3, p.417-425, 1980.
- REGO, A.A.; KAHTALIAN, A. Tentativa de imunização de ratos utilizando larvas irradiadas de *Strongyloides ratti*. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.97-99, 1972.
- ROUSSEAUX, J.; BRAZIN, H. Rat immunoglobulins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.1, p.61-78, 1979.
- SATO, Y.; MASASHIRO, T.; OTSURU, M. Detection of antibodies in strongyloidiasis by enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.79, p.51-55, 1985.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. 6. ed. Ames: Iowa University College, 1971. 593p.
- WHITLOCK, H.V. Some modifications of McMaster helminth egg counting technique and apparatus. **Journal of the Council Scientific and Industrial Research**, Melbourne, v.21, p.177-180, 1948.