

## HELMINTOS DE RATOS WISTAR DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS CRIADOS EM BIOTÉRIO CONVENCIONAL

C.J. Scaini<sup>1</sup>, M.F. Teixeira<sup>2</sup>, M. do C. Traversi<sup>3</sup>, M.G.T. Rheingantz<sup>4</sup>, V.M. Signorini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Parasitologia, Departamento de Patologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rua General Osório, s/nº, CEP 96200-400, Rio Grande, RS, Brasil. E-mail: dpacjs@furg.br

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivos determinar as espécies e o índice de infecção de helmintos do sistema digestivo de ratos Wistar de diferentes faixas etárias de um biotério convencional. Para pesquisa de ovos dos helmintos, foram utilizados os métodos de Willis e Graham, sendo examinados 168 animais. O emprego de três repetições do método de Graham aumentou a eficácia na detecção de animais positivos para *Syphacia* sp. (Nematoda, Syphaciidae). Além disso, foi constatada, através de necropsias parasitológicas, a prevalência de 100% de *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) em ratos jovens e adultos, e que apenas os animais jovens (30 e 60 dias) apresentaram índices de infecção superiores ( $P < 0,01$ ) aos dos lactentes (21 dias). Também foi identificada a presença de *Hydatigera taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cistoda, Taeniidae) no fígado de um rato adulto, sendo descritas as alterações hepáticas observadas no exame histopatológico.

PALAVRAS-CHAVE: *Rattus norvegicus*, *Syphacia muris*, *Hydatigera taeniaeformis*, biotério convencional.

### ABSTRACT

HELMINTHS OF CONVENTIONALLY MAINTAINED WISTAR RATS WITH DIFFERENT AGES. The present work aimed to determine the species and infection levels of helminthes, which were collected from the digestive system of conventionally maintained Wistar rats with different ages. The methods used to research the helminth eggs in 168 rats were those of Willis and Graham. The use of three repetitions of the Graham method enhanced the detection efficacy of positive animals for *Syphacia* sp. There was detected a 100% prevalence of *S. muris* in necropsis, in the young and adults; only the youngest animals (30 and 60 days) showed higher infection levels ( $p < 0.01$ ) than lactents (21 days). *Hydatigera taeniaeformis* was also identified in the liver of one adult rat and the hepatic alterations shown are described in the histopathological exam.

KEY WORDS: *Rattus norvegicus*, *Syphacia muris*, *Hydatigera taeniaeformis*, conventional animal house.

### INTRODUÇÃO

Os cuidados com a condição sanitária dos animais de laboratório são indispensáveis para que não haja interferências nos resultados de pesquisas e em testes biológicos. Os ratos e camundongos criados em biotérios convencionais são freqüentemente acometidos pelo oxiurídeo *Syphacia* sp. (Nematoda, Syphaciidae). Embora seja considerado pouco patogênico, algumas desordens intestinais são atribuídas a este parasita, tais como prolapso retal, intussuscepção, enterite, impactação fecal, perda de peso (FLYNN *et al.*, 1989) e alteração da resposta imune (TAFES, 1976).

No Brasil, alguns trabalhos foram realizados para determinar as principais espécies de parasitos

de ratos e camundongos de biotérios convencionais. Os principais helmintos registrados em camundongos foram *Syphacia* sp., *S. obvelata* (Rudolphi, 1802), *Aspicularis tetraptera* (Nitzsch, 1821) (Nematoda, Heteroxynematidae) e *Hymenolepis nana* (Siebold, 1852) (Cestoda, Hymenotepididae) (*Vampirolepis nana*) (SILVA SANTOS *et al.*, 1985; PINTO *et al.*, 1994; BRESSAN *et al.*, 1997; BAZZANO *et al.*, 2002), enquanto que em ratos foram identificados *Syphacia* sp., *A. tetraptera* e *H. nana* (BRESSAN *et al.*, 1997). Posteriormente, foi realizado um estudo morfológico em exemplares de *S. muris* detectados em ratos das linhagens Wistar (*outbred*), Low/M e AM/2/Torr (*inbred*), não sendo verificadas diferenças morfológicas entre estes, assim como não foi

<sup>2</sup>Secretaria Municipal de Educação e Cultura, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Pelotas, Instituto Biologia, RS, Brasil.

observada diferença em relação ao índice de infecção entre as linhagens (PINTO *et al.*, 2001).

Apesar dos estudos realizados nessa área, existe carência de informações sobre o índice de infecção por parasitas em ratos de laboratório de diferentes faixas etárias, assim como existe necessidade de investigações que busquem revelar infecções por outras espécies de helmintos. Além disso, o parasitismo em ratos de laboratório também pode ser considerado um problema de saúde pública, pois já foram detectadas infecções em seres humanos, por algumas espécies de helmintos que acometem estes animais (UECO & ZABALA, 1990; ŠTERBA *et al.*, 1977).

Este trabalho teve como objetivos pesquisar ovos de helmintos, assim como determinar as espécies e o índice de infecção destes parasitas no sistema digestivo de ratos Wistar de diferentes faixas etárias, de um biotério convencional, buscando subsídios para auxiliar no controle das espécies detectadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 (Rodentia, Muridae), da linhagem Wistar, de um biotério convencional pertencente a uma instituição de ensino e pesquisa localizada no Rio Grande do Sul. A colheita das amostras para pesquisa de ovos de helmintos, o sacrifício e a necropsia dos animais seguiram os critérios éticos estabelecidos segundo APA (1989) e CONNOR & FUENZALINDA-PUELMA (1990). A fase experimental deste estudo foi dividida em duas etapas.

### Etapa I – Pesquisa de ovos de helmintos

Nesta etapa, foram examinados 12 ratos lactentes de 3-7, 10-14 e 17-21 dias, 22 jovens de 26-30 e 56-60 dias e 22 adultos de 86-90, 116-120, 146-150 e 176-180 dias. A identificação dos 168 animais (50% de machos e 50% de fêmeas) foi realizada através da solução de ácido pírico.

De cada rato, foram realizadas três colheitas de fezes e do material da região perianal (fita gomada), com intervalo de dois dias entre elas, sendo a última executada no dia em que seria realizada a necropsia parasitológica prevista na segunda etapa deste trabalho. As amostras de fezes foram examinadas através do método de flutuação de WILLIS (1921) modificado e do material perianal pelo método de Graham (1941), com modificações.

### Etapa II - Identificação de espécie e determinação do índice de infecção

Inicialmente, foi retirada uma amostragem aleatória, de três machos e três fêmeas de 7, 14, 21, 30, 60, 90,

120, 150 e 180 dias, totalizando 54 animais. Após o sacrifício dos animais em câmara de éter etílico, todos os órgãos do sistema digestivo foram submetidos a exame macroscópico. A seguir, os conteúdos dos órgãos gastrintestinais foram diluídos em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,85%. Após sedimentação espontânea, os nematódeos recuperados foram fixados em formalina a 10%, identificados e quantificados de acordo com a espécie, forma evolutiva e sexo. Também foram recuperadas larvas de nematódeos da parede intestinal, em solução fisiológica, a 4°C, por 3 horas. Todos os fígados com suspeita de parasitismo foram fixados em formalina a 10%, e preparados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos (7µm) foram corados através da técnica de Hematoxilina-Eosina e analisados em microscópio óptico.

### Análise estatística

Os dados referentes à recuperação de nematódeos foram transformados em  $\log(X + 1)$  e submetidos à análise da variância (F-teste), através do delineamento de blocos ao acaso, utilizando o nível de significância de 0,01. As médias foram comparadas através do teste de Dunkey. Foi utilizado o sistema de análise estatística SANEST (ZONTA & MACHADO, 1985).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A positividade detectada para ovos de *Syphacia* sp. nos ratos lactentes de 21 dias e nos animais jovens e adultos (30 a 180 dias) foi, respectivamente, de 80,6% (29/36) e 95,5% (126/132) através do método de Graham, e em 27,8% (10/36) e 45,5% (60/132) com o método de Willis, em três repetições.

Os resultados, por repetição, da pesquisa de ovos de *Syphacia* sp. pelo método de Graham, nos ratos jovens e adultos (30 a 180 dias), que constituíram o maior grupo de animais (132), foram os seguintes: no primeiro exame foi detectada positividade em 72% (95/132) dos animais, no segundo em 80,3% (106/132) e no terceiro em 86,4% (114/132).

A pesquisa de ovos associada às necropsias parasitológicas demonstrou que o método de Graham apresentou maior eficácia para o diagnóstico de ovos desse parasita. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por BRESSAN *et al.* (1997). Mesmo com a maior eficácia deste método, existe a necessidade da realização de repetições para aumentar sua sensibilidade. Os resultados isolados das três repetições (72%, 80,3%, 86,4%) foram inferiores ao resultado final, o qual revelou que 95,5% dos animais estavam positivos. Estes resultados mostraram a necessidade da realização de repetições em estudos epidemiológicos e na avaliação de rotina do estado sanitário dos animais para obtenção de resultados fidedignos.

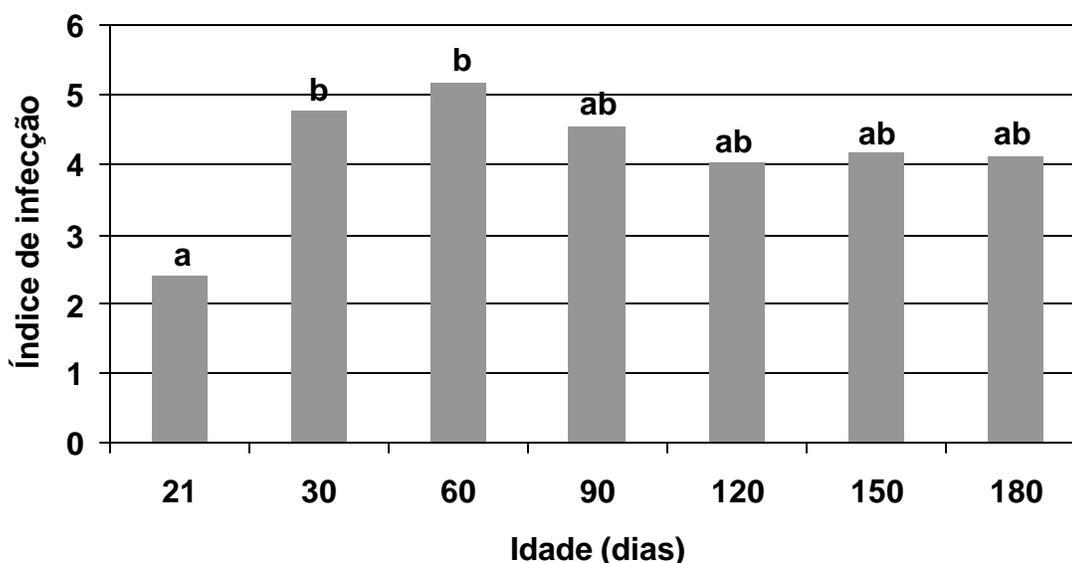


Fig. 1 - Índice de infecção por *S. muris* em ratos de laboratório de diferentes faixas etárias. Os dados foram transformados em log (X+1). Letras desiguais, na coluna, indicam diferença significativa ( $P < 0,01$ ), através do teste de Dunkey.

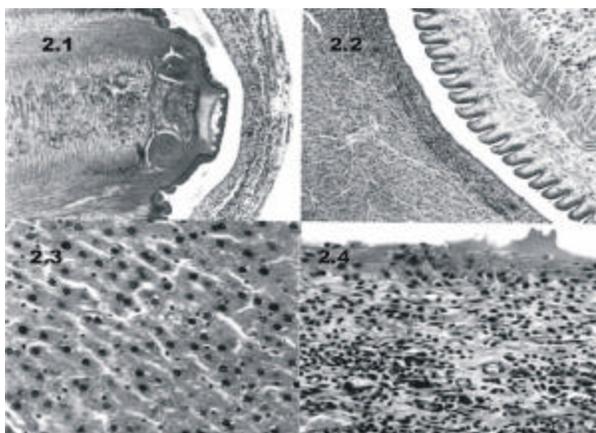


Fig. 2 - 2.1) Extremidade anterior da larva de *H. taeniaeformis* no interior do cisto, com escólex invaginado; 2.2) Microtríquias da larva; 2.3) Parênquima ao redor do cisto, com alguns hepatócitos apresentando vacúolos citoplasmáticos; 2.4) Reação inflamatória crônica que forma a parede do cisto.

Apenas o nematódeo *S. muris* (Yamaguti, 1935) (Nematoda: Oxyurida) foi identificado nas necropsias parasitológicas, confirmando o resultado obtido na pesquisa de ovos de helmintos gastrintestinais. Esta espécie foi a única entre os nematódeos que encontrou condições favoráveis para o seu estabelecimento e disseminação no biotério estudado devido, provavelmente, à curta duração do seu ciclo evolutivo e a sua fácil transmissão. Entretanto, a maioria dos trabalhos registra infecção mista em ratos e camundongos de biotérios convencionais (SILVA SANTOS *et al.*, 1985; PINTO *et al.*, 1994; BRESSAN *et al.*, 1997; BAZZANO *et al.*, 2002).

A prevalência de *S. muris* foi de 66,7% (4/6) nos ratos lactentes de 21 dias, e 100% nos ratos jovens (12/

12) e adultos (24/24). Pode ser observado na Figura 1, que o índice médio de infecção registrado em lactentes de 21 dias (10,3 exemplares) foi significativamente inferior ( $P < 0,01$ ) em relação aos obtidos em ratos com 30 (118,8 exemplares) e 60 dias (175,4 exemplares), porém estes não foram significativamente superiores ( $P > 0,01$ ) em relação aos observados nos animais adultos com 90 (93,5 exemplares), 120 (55,5 exemplares), 150 (64,6 exemplares) e 180 dias (60,6 exemplares).

Somente os ratos de 30 e 60 dias apresentaram índices de infecção por *S. muris* mais altos ( $P < 0,01$ ) do que os lactentes de 21 dias. Estes resultados podem indicar que esta faixa etária é susceptível à maior carga parasitária, mesmo não sendo observada diferença significativa ( $P > 0,01$ ) em relação aos ratos adultos de 90 a 180 dias (Fig. 1). Além disso, não houve diferença ( $P > 0,01$ ) em relação ao sexo dos animais. Os oxiurídeos foram recuperados no ceco (7.822 exemplares) e cólon (640 exemplares), sendo que apenas em um animal foram detectados exemplares também no intestino delgado (15 exemplares).

O cisticerco do Cestoda *H. taeniaeformis* Batsch, 1786 (Cyclophyllida: Teniidae) foi identificado no fígado de uma fêmea adulta (Fig. 2.1). Este cisticerco foi encontrado no interior de um cisto branco-amarelado, localizado no lobo hepático direito. Através do exame histopatológico, pôde-se observar, circunscrevendo o cisto, tecido conjuntivo com reação inflamatória crônica, apresentando importante infiltração linfoplasmocitária e presença de numerosos macrófagos e mastócitos, além de uma intensa vascularização sangüínea, com vasos hiperêmicos (Figs. 2.2 e 2.4). Além disso, foi observada presença de vacúolos citoplasmáticos nos hepatócitos localizados próximo à lesão (Fig. 2.3).

A reação inflamatória crônica no parênquima hepático forma a parede do cisto, sendo desencadeada pela penetração das microtríquias (Fig. 2.2), localizadas na superfície da larva pós-oncosfera (ENGELKIRK & WILLIAMS, 1983). Alguns estudos realizados com animais infectados experimentalmente, apresentando várias formações císticas, mostraram alterações degenerativas no tecido hepático, tais como extensas áreas de fibrose de substituição, processo inflamatório crônico em todo o parênquima (NASCIMENTO *et al.*, 1987) e focos de necrose (BANERJEE, 1972). No presente trabalho, as observações foram realizadas em um animal infectado naturalmente, talvez por essa razão, o fígado albergava apenas um cisto. Mesmo assim, pôde ser verificada a presença de vacúolos citoplasmáticos em alguns hepatócitos adjacentes à lesão, o que sugere degeneração celular.

A detecção de *H. taeniaeformis* indica a provável contaminação, por ovos deste cestódeo, na maravalha não esterilizada que era utilizada como cama para os animais, pois esta era procedente de locais de fácil acesso aos possíveis hospedeiros definitivos do cestódeo (gatos e ocasionalmente cães). Este achado é um indicador da necessidade da introdução de várias medidas de higiene que impeçam a introdução desta infecção parasitária em biotérios.

Além de interferir no padrão sanitário dos ratos de laboratório e em experimentações, a infecção por *H. taeniaeformis* e *Syphacia* sp. constitui-se em um problema de saúde pública devido ao potencial zoonótico destas espécies (ŠTERBA *et al.*, 1977; JUECO & ZABALA, 1990).

## CONCLUSÕES

A prevalência de *S. muris* e a presença de *H. taeniaeformis* constatadas, indicam a necessidade da introdução de medidas de controle destes parasitas, sendo que os ratos jovens apresentam os principais índices de infecção por *S. muris*. O emprego de três repetições do método de Graham aumenta a eficácia deste em detectar ovos de *S. muris*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Tabajara Lucas de Almeida, pela orientação estatística.

Ao Professor Obirajara Rodrigues, pelo auxílio na confecção das fotomicrografias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APA. *Código de ética experiente com animais*. Rio de Janeiro: Sozed, 1989, 8p.

- BANERJEE, D. Histopathological changes in the liver of albino rats with *Cysticercus fasciolaris* infection. *J. Commun. Dis.*, v.4, n.2/3, p.156-161, 1972.
- BAZZANO, T.; RESTEL, T.I.; PINTO, R.M.; GOMES, D.C. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.6, p.847-853, 2002.
- BRESSAN, M.C.R.; CALGARO, G.A.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T. Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animals houses. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.34, n.3, p.142-146, 1997.
- CONNOR, S.S. & FUENZALINDA-PUELMA, H.L. Bioethics: issues and perspectives. Washington DC: PAHO, 1990. p.226-229. (Scientific publication n.527).
- ENGELKIRK, P.G. & WILLIAMS, J.F. *Taenia taeniaeformis* (Cestoda) in the rat: ultrastructure of the host-parasite interface on days 8 to 22 postinfection. *J. Parasitol.*, v.69, n.5, p.828-837, 1983.
- FLYNN, B.M.; BROWN, P.A.; ECKSTEIN, J.M. Treatment of *Syphacia obvelata* in mice using ivermectin. *Lab. Anim. Sci.*, v.39, n.5, 1989.
- GRAHAM, C.F. A device for the diagnosis of *Enterobius* infection. *Am. J. Trop. Med.*, v.21, p.159-161, 1941.
- JUECO, N.L. & ZABALA, Z.R. The nematodes of *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus mindanensis*. *Phil. Vet. Med.*, v.27, p.39-46, 1990.
- NASCIMENTO, E.; ROCHA, O.A.; MENDES, H.M.B.M.; TABOADA, D.C.; COSTA, H.M.A. *Hydatigera taeniaeformis*: Alterações histopatológicas provocadas em ratos e em gatos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.39, n.5, p.735-744, 1987.
- PINTO, R.M.; GONÇALVES, L.; NORONHA, D.; GOMES, D.C. Worm burdens in outbred and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n.1, p.133-136, 2001.
- PINTO, R.M.; VICENTE, J.J.; NORONHA, D.; GONÇALVES, L.; GOMES, D.C. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, n.1, p.33-40, 1994.
- SILVA SANTOS, I.C.; SCAINI, C.J.; REGINATO, R.P.; CERESER, V.H. Epidemiology and control of the principal helminths of mice. In: CONFERENCE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 11., 1985, Rio de Janeiro, RJ. *Abstracts*. Rio de Janeiro: 1985. p.14.
- ŠTERBA, J.; BLAZER, K.; BARUŠ, V. Contribution to the pathology of strobilocercosis (*Strobilocercus fasciolaris*) in the liver of man and some animals. *Folia Parasitol.*, v.24, n.1, p.41-46, 1977.
- TAFFS, L.F. Pinworms infections in laboratory rodents: a review. *Lab. Anim.*, v.10, p.1-13, 1976.
- WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med. J. Aust.*, v.2, p.375-376, 1921.
- ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. Sistema de Análise Estatística - SANEST. Pelotas: Departamento de Matemática Estatística e Computação - Universidade Federal de Pelotas, 1985.

Recebido em 12/5/03

Aceito em 5/12/03