

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE UM ISOLADO DE *Leptospira* ATRAVÉS DE HISTOPATOLOGIA

ALESSANDRA NEIS¹; LEONARDO GARCIA MONTE²; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN²; MARTA GONÇALVES AMARAL³

¹Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alessandra_neis@hotmail.com

²Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas

³Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – martagamaral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (ADLER E DE LA PENA, 2010). O principal reservatório destes microrganismos são os roedores sinantrópicos, como o *Rattus norvegicus*. Entretanto, animais domésticos e de produção (p. ex. cães e bovinos) também podem atuar como hospedeiros (MONTE et al., 2015). A transmissão das leptospires ocorre principalmente através da urina contaminada, uma vez que o microrganismo coloniza os rins, especialmente a região proximal dos túbulos renais (ADLER E DE LA PENA, 2010).

Os surtos de leptospirose aumentam em estações chuvosas, já que o patógeno pode sobreviver no solo e na água por longos períodos (MONAHAN et al., 2009). Os sinais clínicos ou sintomas nos hospedeiros mamíferos variam desde febre e dores de cabeça até desordens que podem causar a morte (FAINE et al., 1999). Em bovinos, a leptospirose frequentemente é relacionada como a causa de abortos, diminuição na produção de leite, perda de peso e morte, o que leva a importantes perdas econômicas no setor pecuário (MONTE et al., 2015).

O método de referência para o diagnóstico da leptospirose é o teste de aglutinação microscópica (MAT), que utiliza uma bateria de leptospires vivas para a detecção de anticorpos antígeno específicos (FAINE et al., 1999). Por este motivo, o isolamento e caracterização de novos isolados é uma estratégia importante para o controle dessa enfermidade.

Nesse contexto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a virulência de uma cepa de *Leptospira* (*Leptospira interrogans* sorogrupo Australis sorovar Muenchen) (MONTE et al., 2015) previamente caracterizada através de análises histopatológicas.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo e contagem celular

Leptospira interrogans sorogrupo Australis sorovar Muenchen (Cepa Aceguá) foi obtida no Laboratório de Imunodiagnóstico, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (CDTec/UFPel) (MONTE et al., 2015). O cultivo bacteriano foi realizado a 30°C em tubos de 5mL contendo meio Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH), com a adição de 10% de meio de enriquecimento (Difco-USA) e sem a adição de antibióticos. Após o

crescimento alcançar a fase exponencial (aproximadamente 7 dias), a concentração celular foi estimada utilizando câmara de Petroff-hausser.

2.2 Análise histopatológica

Uma concentração de 10^8 leptospiras/mL foi inoculada na região peritoneal de um hamster de 28 dias. Como controle negativo, outro animal foi inoculado com solução salina. Após o início dos sinais clínicos sugestivos de leptospirose, o animal foi sacrificado para a coleta dos tecidos. Para tal, rim, pulmão e fígado foram retirados e fixados em formalina 10% (pH 7,0), seguido de desidratação em concentrações crescentes de álcool, 50 °GL, seguido de 70 °GL, 80 °GL, 90 °GL e álcool absoluto, por 2h cada. A passagem pelo álcool absoluto foi repetida por duas vezes. A seguir, procedeu-se a diafanização, submetendo os tecidos a 3 banhos de xilol subsequentes, de 1h cada. Após esta etapa, fez-se a inclusão dos órgãos em 3 banhos em parafina líquida a 60°C por 1h, sendo que a segunda passagem ocorreu em estufa a vácuo. Em seguida, as amostras foram colocadas em molde adequado para a formação do bloco de parafina (microtomia de 5µm) (CULLING et al., 1985). As lâminas foram então coradas em Hematoxilina e Eosina (HE). Deste modo, foi possível analisar os órgãos infectados e estabelecer um paralelo entre as lesões teciduais do animal inoculado com as leptospiras e do animal controle. As análises histológicas foram realizadas em microscopia de campo claro (Microscópio Olympus BX51) e a captura das imagens utilizando câmera digital Olympus DP 72. Os animais foram tratados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histopatológica do modelo biológico infectado mostrou que o animal desenvolveu infecção aguda letal, caracterizada por lesões renais, hepáticas e pulmonares (Figura 1). Os danos mais significativos foram a presença de infiltração linfocítica em torno da veia centrolobular do fígado (Figura 1A) e hemorragia pulmonar (Figura 1B), além da presença de leucócitos e necrose tubular nos rins (Figura 1C). O animal controle não apresentou alteração patológica (Figura 1 D, E e F).

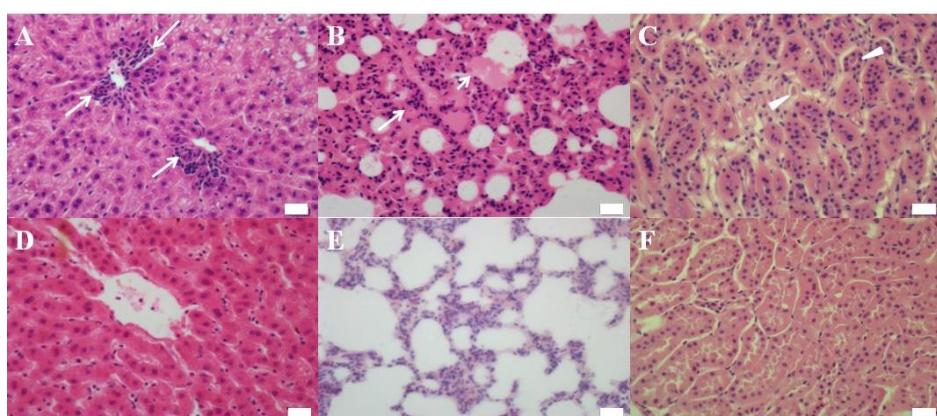


Fig. 1. Análise histopatológica do hamster inoculado com a cepa Aceguá (*L. interrogans* sorovar Muenchen). (A) Infiltração linfocítica hepática na veia

centrolobular. (B) Edema pulmonar, congestão vascular, hemólise alveolar (seta menor) e infiltração linfocítica septo-alveolar (seta maior). (C) Cilindros de hialina nos túbulos renais (seta). D, E e F representam o fígado, o pulmão e o epitélio renal tubular do hamster inoculado com solução salina (controle negativo), respectivamente. Barras representam 10 µm.

4. CONCLUSÕES

A *Leptospira interrogans* sorogrupo Australis sorovar Muenchen foi capaz de causar lesões características de leptospirose nos tecidos renais, pulmonares e hepáticos no modelo biológico suscetível hamster. Esses achados sugerem que o isolado Aceguá pode ser útil em ensaios de prevenção e controle da leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Clayton, v.140, n.3, p.287-296, 2010.
- CULLING, C.F.A.; ALLISON R.T.; BARR, W.T. **Cellular Pathology Technique**, London: Butterworth & Co. Ltd., 1985. v.4.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. **MediSci**, Melbourne, v.2, n.272, p. 117-138, 1999.
- MONAHAN, A.M.; CALLANAN, A.J.; NALLY, J.E. Host-Pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, Dublin, v.46, n.6, p. 793-799, 2009.
- MONTE, L.G.; RIDIERI, K.F.; JORGE, S.; OLIVEIRA, N.R.; HARTWIG, D.D.; AMARAL, M.G.; HARTLEBEN, C.P.; DELLAGOSTIN, O.A. Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine foetus. **Comparative, Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, England, v.1, n. 5, p. 1-4, 2015.