

CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE UMA CEPA DE *LEPTOSPIRA BORGPIETERSENII* DO SOROGRUPO BALLUM EM HAMSTER

DINIZ, Juliana Alcoforado^{1,2}; **SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto**^{2,3};
COLONETTI, Karina²; **BONEL-RAPOSO, Josiane**³; **ALEIXO, José Antonio**
Guimarães²

SILVA, Éverton Fagonde^{2,3}

1 – Instituto de Biologia – UFPel; 2 – Centro de Biotecnologia – UFPel; 3 – Faculdade de Veterinária – UFPel.

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
juju_adiniz@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose difundida no mundo inteiro segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), essa doença tem como agente etiológico as espécies patogênicas da bactéria *Leptospira*. Os reservatórios das leptospirosas são animais silvestres e domésticos doentes, particularmente os roedores sinantrópicos. Os humanos são considerados como hospedeiros acidentais da enfermidade, infectando-se principalmente através do contato direto com água, urina e tecidos animais contaminados (FAINE et al, 1999).

Anteriormente, SILVA et al (2008) caracterizaram a virulência de 5 cepas de *Leptospira*, que foram isoladas de humanos e animais em Pelotas (RS) e Salvador (BA), as quais são pertencentes as espécies *L. interrogans* e *L. noguchii*, sendo consideradas importantes causadoras de leptospirose no Brasil e no Mundo. Recentemente, foram isoladas 4 cepas de camundongos, próximo ao campus da UFPel, pertencentes a *L. borgpetersenii*, sorogrupo Ballum (SILVA et al, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo, determinar a dose letal 50% (DL50) da cepa 4E de *L. borgpetersenii* em hamsters, avaliando parâmetros clínicos e histopatológicos dos animais, de ambos os sexos, inoculados com diluições seriadas desta cepa. Após a padronização, esta cepa, assim como as outras caracterizadas anteriormente pelo nosso grupo, será utilizada para testar vacinas recombinantes contra a leptospirose humana e animal.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Experimento de Dose letal 50% (DL50)

Leptospira borgpetersenii virulentas, de baixa passagem, foram cultivadas a 30°C em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco-EUA) adicionado de 10% de suplemento comercial (Difco-EUA). As células foram contadas em microscopia de campo escuro usando uma câmara de contagem Petroff-Hausser. Para o ensaio de DL50, grupos de quatro hamsters com nove semanas de idade, pareados por sexo, foram inoculados com seis diferentes diluições seriadas (10^4 a 10^0) do cultivo de leptospirosas com PBS, através da via intraperitoneal (SILVA et al., 2008). Todos os animais foram monitorados diariamente para o aparecimento dos sintomas e óbitos. Para cada experimento,

o cálculo da DL50 foi realizado através da fórmula de Reed e Muench (1938). Todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e necropsiados após o vigésimo quinto dia após a infecção.

Histopatologia

Diariamente e ao final do experimento, amostras de rins, pulmões e fígado de dois hamsters sadios e dos hamsters de cada uma das diluições, foram removidas e colocadas em formol tamponado, para a conservação do material histológico imediatamente após a sua remoção. Em colaboração com o Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária (UFPEI), local onde foi realizada a técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), os tecidos foram fixados em blocos de parafina e, posteriormente, foram cortados em secções de tecido de 3-4 µm, sendo colocados em lâminas previamente silanizadas. Seguindo-se um protocolo para realização da coloração, o primeiro passo foi desparafinizar o material histológico com lavagem de 5 minutos em água corrente. Em seguida corou-se o tecido com hematoxilina por aproximadamente 2 minutos seguido por mais uma lavagem de 10 minutos, sendo depois corado com eosina por um minuto. Após passar por água acética a 1% o corte histológico foi submetido a passagens em álcool absoluto e xilol, por fim a lâmina foi montada em bálsamo do Canadá para posterior análise em microscopia.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a infecção, os animais foram observados diariamente, durante duas vezes ao dia, para a análise do aparecimento dos sinais clínicos característicos da enfermidade, como prostração, piloereção, diminuição de peso e isolamento. Os primeiros sinais clínicos começaram após 72 horas da infecção e os primeiros óbitos no oitavo dia, em três machos inoculados com 10^4 leptospiras (Fig. 1). O intervalo de dias em que ocorreram os óbitos variou de 8 a 18 dias, semelhante ao que foi descrito por SILVA et al (2008) para cepas das espécies *L. interrogans* e *L. noguchii*.

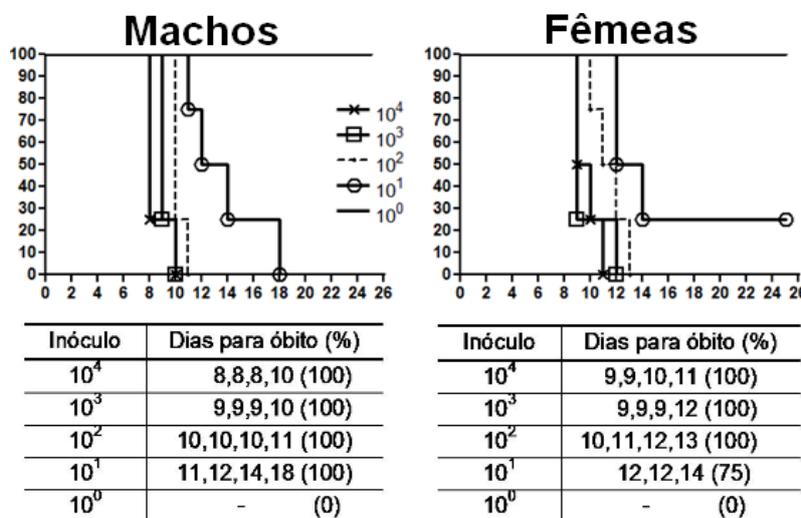


Figura 1. Curvas de sobrevivência dos machos (A) e fêmeas (B), de acordo com cada uma das diluições do antígeno e os dias para óbito.

A DL50 foi calculada utilizando-se a fórmula de REED et al (1938), revelando a dose de 6,81E+00, 4,22E+00 e 5,18E+00, para fêmeas, machos e geral, respectivamente, sendo que a variação entre dias para óbito e doses pode ser evidenciada nas curvas de sobrevivência para todos os animais (Fig. 1).

Animais mortos e moribundos foram necropsiados e os pulmões, rins e fígado foram coletados para a histopatologia. Animais sobreviventes foram similarmente examinados. Durante a necropsia evidenciou-se lesões macroscópicas em graus variáveis entre os animais infectados com diferentes doses, tais como icterícia, hemorragia pulmonar e congestão de órgãos como rins e intestinos (Fig. 2).

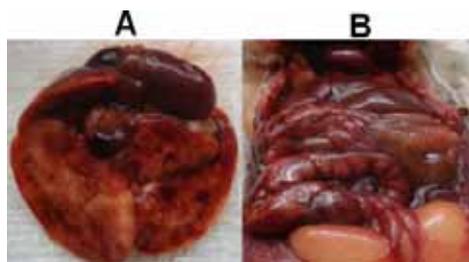


Figura 2. Achados macroscópicos representativos, em animais mortos e moribundos. (A) hemorragia pulmonar. (B) Icterícia leve e congestão de órgãos abdominais.

Com a utilização da técnica de coloração com HE, pode-se evidenciar que os animais inoculados com diferentes diluições do antígeno durante o experimento de DL50, apresentaram lesões em graus que variaram de discretas a severas nos órgãos analisados. Na Tab. 1, é possível observar a descrição de algumas dessas principais lesões presentes nos tecidos de acordo com as diferentes concentrações da bactéria e o sexo do animal.

Tabela 1. Análise histopatológica através da coloração de HE, de acordo com a diluição da bactéria e o sexo dos animais.

Análise Histopatológica	10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Óbitos	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Congestão e hemorragia renal										
Moderada	3/4	-	3/4	4/4	3/4	-	1/4	1/4	1/4	1/4
Severa	-	-	1/4	-	1/4	4/4	3/4	3/4	3/4	2/4
Degeneração e necrose tubular										
Moderada	-	-	1/4	3/4	3/4	3/4	-	1/4	1/4	1/4
Severa	-	-	2/4	-	1/4	1/4	4/4	3/4	3/4	2/4
Glomérulos atroficos	-	-	1/4	1/4	4/4	3/4	4/4	3/4	3/4	3/4
Congestão e hemorragia Hepática										
Discreta	3/4	3/4	3/4	2/4	2/4	1/4	-	-	4/4	2/4
Moderada	1/4	-	1/4	1/4	2/4	3/4	4/4	4/4	-	2/4
Severa	-	-	-	1/4	-	-	-	-	-	-
Degeneração e necrose de hepatócitos	-	-	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Edema, congestão e hemorragia Pulmonar										
Discreta	-	1/4	1/4	2/4	1/4	-	1/4	-	2/4	3/4
Moderada	3/4	-	2/4	2/4	2/4	2/4	1/4	3/4	1/4	-
Severa	-	-	1/4	-	1/4	2/4	1/4	1/4	1/4	1/4

4 CONCLUSÕES

Concluí-se que a cepa 4E de *L. borgpetersenii* sorogrupo Ballum causa a leptospirose letal com inóculos menores do que 10 leptospiros em modelo animal. O resultado da padronização da DL50 da cepa 4E permite que ela possa ser utilizada em ensaios que visam o teste de vacinas contra a leptospirose, por reproduzir experimentalmente a doença, com gravidades em graus variáveis de acordo com o inóculo, assim como é encontrado na leptospirose em humanos e animais.

5 REFERÊNCIAS

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and Leptospirosis*. **MediSci: Melbourne**, Australia, 272p.1999.

REED, L.J.; MUENCH, H.A. Simple method of determining fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p.494–497. 1938.

SILVA, É.F., SANTOS, C.S., ATHANAZIO, D.A., SEYFFERT, N., SEIXAS, F.K., CERQUEIRA, G.M., FAGUNDES, M.Q., BROD, C.S., REIS, M.G., DELLAGOSTIN, O.A., KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, n.31, p. 3892-3896. 2008.

SILVA, É.F., FELIX, S. R. ; CERQUEIRA, G. M. ; FAGUNDES, M. Q. ; NETO, A. C. P. S. ; GRASSMANN, A. A. ; AMARAL, M. G. ; GALLINA, T. ; DELLAGOSTIN, O. A. . Preliminary Characterization of *Mus musculus*-Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 336-337, 2010.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2003.