

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**LUCAS MARTINS GAYER**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Leptospira* spp. ATRAVÉS DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS  
NO TECIDO RENAL DE MAMÍFEROS NÃO VOADORES DO ECÓTOMO  
CERRADO BRASILEIRO E MATA ATLÂNTICA**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

**LUCAS MARTINS GAYER**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Leptospira* spp. ATRAVÉS DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS  
NO TECIDO RENAL DE MAMÍFEROS NÃO VOADORES DO ECÓTOMO  
CERRADO BRASILEIRO E MATA ATLÂNTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Monteiro Correia Lima

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AB	Alcian blue (azul de Alcian)
HE	Hematoxilina-Eosina
MAT	Soroaglutinação microscópica
OIE	Organização Mundial de Sanidade Animal
PAS	Periodic acid-Schiff (ácido periódico de Schiff)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
WS	Warthi-Strarry

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai Celestial por ter me dado oportunidade de estar aonde estou e por ter me ajudado em tudo.

Agradeço aos meus pais, Marilma e Antônio Jorge, por serem os melhores pais possíveis, me ajudando, me confortando, me incentivando desde meus 6 anos de idade a ser um Médico Veterinário. Por estarem sempre ao meu lado, entendo que não poderia ter pais melhores, quando fiz mudanças em minha vida foram os primeiros a me incentivarem. Essa conquista também é de vocês.

Agradeço ao meu irmão Ernesto, por todo momento de risada, conselho, apoio.

Ao meu irmão e padrinho Antônio Jorge, por nunca ter deixado me faltar nada, inclusive carinho, atenção e amor. E por torcer diariamente e comemora toda vitória que tive durante toda minha vida.

Aos meus avós, Marcondes e Maria, que estiveram presentes em minha vida por pouco tempo, mas sei que olham e cuidam por mim de algum lugar.

Aos meus avós Ernesto e Arlinda, que mesmo não os conhecendo, sei que estão felizes por minhas conquistas.

Agradeço à minha família no geral, em especial às minhas tias Marluce e Marília (Tia Lila), que sempre foram anjo que cuidam de mim, me incentivam e sempre comemoram minhas vitórias.

Agradeço a minha orientadora e "mãe postiça", prof. Dra. Anna Monteiro Correia Lima, que sempre acreditou em mim e que no primeiro dia que conversamos me falou que faria tudo que eu quisesse, sendo mais que uma orientadora pra mim na universidade. A senhora comemorou a realização desse trabalho, e tinha tanta fé nele que em todos os momentos que eu desacreditei a senhora foi um ponto essencial de suporte.

A minha co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra<sup>a</sup>. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi que também ajudou a idealizar esse projeto e foi uma pessoa que me ajudou em todos os momentos, acreditando em mim e incentivando a fazer esse projeto. Nunca esquecerei da frase em nossa primeira conversa: "Se eles conseguiram, você também vai conseguir. Só basta você tentar."

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Quirino Moreira por ter iniciado este projeto e ter me dado a chance de participar do mesmo. Com certeza contribuiu muito para minha graduação e me ajudou a ser um pesquisador melhor.

Agradeço ao Igor Castro, técnico do laboratório de histopatologia veterinária da UFU, por toda ajuda no momento de confecções das lâminas e idéias para o projeto.

Agradeço todo apoio do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, em especial a Gabriela, Fernanda, Melissa, Gabriela, Lara e Andréia.

Agradeço ao Laboratório de Patologia Veterinária - UFU.

Agradeço a todos os meus professores durante esta graduação, estou me tornando um profissional melhor devido a toda a atenção que me foi dedicada por todos eles.

Agradeço ao Instituto de Ciências Biomédicas, em especial o prof. Dr. Marcelo Emílio Belletti.

Agradeço aos membros do Colegiado da FAMEV 2019, por terem se tornado amigos incríveis. Em especial à prof. Dra Kênia de Fátima Carrijo, que foi um dia minha professora mas passou a ser uma grande amiga que escutou meus desabafos e problemas durante minha graduação.

Agradeço à Associação Atlética Agrárias, em especial minha amiga de vida Marielle Harnisch, que passou vários momentos excelentes e outros nem tanto ao meu lado.

À empresa Júnior Conavet e a todos que estiveram nela comigo e me fizeram pensar fora da universidade, em especial meu amigo Marco Vinício que se tornou uma amizade para a vida.

Ao DACAW, por ter sido minha segunda casa e ter me ajudado a ter uma visão diferente sobre a vida e como a universidade funciona para cada estudante. Estive em 3 gestões e em uma delas como vice-presidente, pude aprender com diversas pessoas como a vida é boa. Agradeço todos os dias por ter tido esta oportunidade e a todos que estiveram junto de mim nessa caminhada.

Agradeço a minha amiga Andressa Brito por me ajuda na correção deste trabalho e por toda a paciência. E a minha amiga Lize Borges pela traduções de artigos e textos.

Agradeço aos meus amigos Kamilla Carvalho, Wanner Menezes, Bruna Dorna, Nathalia Silva, Lize Borges, Amanda Lima, Natasha Pontes, Bethânia Gouveia, Nathan Cassiolato, Lucas Camargos, entre outros que passaram na minha vida neste anos de faculdade. Sou grato a meus amigos por todas as alegrias, esse trabalho também é de vocês.

Em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos Maressa Braga, Arthur Alves, Andressa Brito, Aline Medeiros e Cecília Soares que foram meu suporte diário e que sempre estiveram junto de mim nos momentos mais difíceis, brigaram comigo e me incentivaram em todos os momentos necessários. E só queria falar que eu amo um rebordose.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar a *Leptospira* spp. em tecido renal de mamíferos silvestres não voadores da região do rio Paranaíba, testados para leptospirose pelos testes de PCR e MAT com intuito de detectar a bactéria no rim destes animais do cerrado. Foram utilizadas 68 amostras de tecido renal provenientes de mamíferos silvestres não voadores capturados na região do rio Paranaíba, sendo realizadas as técnicas de colorações histológicas de Alcian Blue e impregnação de prata pela técnica de Warthin-Starry, além da técnica de Hematoxilina - Eosina para a detecção de lesões renais. Amostras de urina e rim foram testadas em PCR, enquanto a presença de *Leptospira* spp., por evidênciação da proteína de membrana Lip132. O soro sanguíneo de cada um dos 68 animais foi testado na soroglutinação microscópica em campo escuro (MAT) para o diagnóstico sorológico. Os resultados da PCR e do MAT foram confrontados com os resultados das lesões renais encontradas em cada amostra. Verificou-se que a coloração de Hematoxilina-Eosina detectou 36,76% de lesões no tecido renal dos mamíferos, sendo a nefrite intersticial com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário a alteração mais frequente. Na coloração de Warthin-Starry por impregnação de nitrato de prata evidenciou-se a presença de *Leptospira* spp. em 7,35% das amostras, enquanto na técnica de Alcian Blue verificou-se de 4,41% das amostras a presença do agente. A presença do agente em conjunto com evidênciação das alterações microscópicas seria um grande achado, assim sendo possível relacionar as bactérias com lesões causadas no tecido renal. A coloração de HE possibilitou a identificação de lesões sugestivas de leptospirose, quanto as colorações de Alcian Blue e Warthin-Starry evidenciaram a presença da própria *Leptospira* spp.

**Palavras-chave:** Leptospirose; Roedores; *Leptospira*

## ABSTRACT

The present work aimed to diagnose *Leptospira spp.* in renal tissue of non-flying wild mammals of the Paranaíba river region, in order to detect the bacteria in the kidney of these animals of the Brazilian Cerrado. Sixty-eight renal tissue samples from non-flying wild mammals of the Rio Paranaíba region were used. Histopathological staining techniques such as Alcian Blue and silver impregnation using the Warthin-Starry technique were also performed besides the Hematoxylin-Eosin for the detection of kidney damage caused by this agent. The samples used had already been tested in PCR, for the presence of *Leptospira spp.*, by evidence of Lip132. Blood serum from each of the 68 animals was tested in dark field microscopic agglutination (MAT) for serological diagnosis. The results of PCR and MAT were compared with the results of renal lesions found in each sample. Hematoxylin-Eosin staining detected around 36,76% lesions in mammalian renal tissue, and interstitial nephritis with lymphoplasmic inflammatory infiltrate was the most common alteration. Warthin-Starry staining by silver nitrate impregnation showed the presence of *Leptospira spp.* in about 7,35% while in the Alcian Blue technique the presence of the agent was found in about 4,41% samples. The presence of the agent as well as the evidence of microscopic alterations would be a great finding, thus being possible to relate the bacteria with lesions caused in the renal tissue. There were lesions in the renal tissues of non-flying mammals of the Cerrado, indicating probable infection. HE staining made it possible to identify characteristic lesions of the infection suggestive of leptospirosis, while Alcian Blue and Warthin-Starry stains showed the presence of *Leptospira spp.*.

**Keywords:** Leptospirosis; Non-flying mammals; *Leptospira spp.*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 A Leptospirose .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.1 Agente Etiológico .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.2 Patogenia e Sinais Clínicos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.3 Leptospira em roedores.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4. Pequenos mamíferos silvestres do cerrado .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Métodos de diagnóstico de Leptospira .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.1 Soroaglutinação.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2 PCR .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Material de confecção das lâminas.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Colorações histopatológicas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.1 Coloração Alcian Blue e Ácido Periódico de Schiff (PAS).....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2 Coloração de Warthin-Starry .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.3 Coloração Hematoxilina-Eosina.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Análise estatística.....</b>	<b>20</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Análises comparativas de técnicas .....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença cosmopolita, com potencial zoonótico e com maior ocorrência em áreas quentes e úmidas, que favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente (VINETZ, 2001). Entre os mamíferos, ela é transmitida através do contato direto entre animais infectados e pela exposição à água, solo e alimentos contaminados com a urina de animais portadores renais de *Leptospira* spp. O agente é carregado através de ambientes contaminados e animais silvestres, tanto selvagens quanto domésticos, representando uma ameaça constante (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2016). Os surtos em humanos geralmente são associados a chuvas fortes e inundações que ajudam a carrear o agente, infectando áreas com saneamento básico prejudicado e com pouco controle sanitário (LAU *et al.*, 2010).

Diversas espécies de mamíferos atuam como reservatórios da *Leptospira* spp., incluindo os humanos, e assim o agente se mantém e é transmitido na natureza. Os sorovares da *Leptospira* spp. não são espécie-específicos; contudo, alguns deles tem maior afinidade por algumas espécies (BHARTI *et al.*, 2003; LEVETT, 2014). Segundo Faine e colaboradores (1999), os principais reservatórios de *Leptospira* spp. são animais domésticos e silvestres, como os pequenos mamíferos, fazendo a manutenção e circulação deste agente no ambiente.

Em países endêmicos estima-se que existam mais casos da doença, entretanto o difícil diagnóstico resulta em uma baixa notificação; sabe-se que ocorrem cerca de um milhão de casos da doença em humanos por ano, não existindo uma estimativa de casos para os animais (ADLER *et al.*, 2014; HARTSKEERL *et al.*, 2011). Além da enfermidade em si, é possível observar, também, o prejuízo econômico causado pela doença em bovinos e pequenos ruminantes, tais como a diminuição na média de produção de leite, diminuição no ganho de peso diário, doenças reprodutivas com aborto dos produtos no terço final da gestação, dentre outros malefícios econômicos causados pelo agente (LAU *et al.*, 2010).

Os roedores são apontados como os principais transmissores da *Leptospira* spp. Condições como a expansão de centros urbanos para a zona rural causaram alterações no ecossistema onde estes animais habitavam, especialmente as três principais espécies de roedores sinantrópicos que são reconhecidos como pragas urbanas: *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* (SANTOS *et al.*, 2009). O sorovar que predomina no ambiente urbano é o Copenhageni e o seu reservatório principal é o *Rattus norvegicus* (rato marrom ou rato de esgoto), que por sua vez também é associado à manutenção de outros sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae (COSTA *et al.*, 2015; KO *et al.*, 1999; TUCUNDUVA-DE-

FARIA *et al.*, 2007; KO *et al.*, 1999; BAROCCHI *et al.*, 2001). No ambiente silvestre, os principais reservatórios são pequenos mamíferos. O sorovar Australis foi isolado de rato-d'água (*Nectomys squamipes*), e os sorovares Bataviae, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa e Castellonis apresentam como reservatório espécies da família Didelphidae, representada pelos gambás (CORDEIRO *et al.*, 1981).

Os estudos sobre a bactéria e o diagnóstico da leptospirose são o caminho para o controle da doença. A notificação eficaz de casos da doença, acarretariam num maior conhecimento da patologia para o diagnóstico correto, permitindo conhecer a prevalência aproximada dos índices de leptospirose no Brasil. A identificação do local de predileção do agente no organismo tem como objetivo a identificação do comportamento do agente e da sua patogenia. Os métodos de diagnósticos clínico e laboratorial da leptospirose são difíceis e muitas vezes negligenciados pelos profissionais da área da saúde, fazendo com que a doença seja pouco reconhecida e diagnosticada. Um dos fatores que influenciam diretamente nesta dificuldade é a grande variedade de sinais e falta de estrutura e profissionais capacitados na realização dos exames. A PCR, apesar de altamente sensível às *Leptospira spp.*, apresenta um alto valor e a necessidade de profissionais habilitados na confecção do exame, fazendo com que seja pouco utilizada na rotina clínica. Contudo, as técnicas de coloração histológica podem ser usadas também para a identificação direta desta bactéria nos tecidos, sendo mais baratas e com menor demanda de estrutura específica para sua realização.

Diante disso, foi proposto, como objetivo do presente trabalho, utilizar três colorações em técnicas histológicas em tecido renal de pequenos mamíferos não voadores silvestres, que passaram pela PCR e Soroaglutinação microscópica, possibilitar a visualização microscópica do agente e a confirmação da presença do bactéria no tecido renal destes animais, e com isso atestar a eficiência de tais colorações para o diagnóstico da leptospirose.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Leptospirose

#### 2.1.1 Agente Etiológico

Os agentes causadores da doença são as bactérias do gênero *Leptospira* spp., pertencente à ordem Spirochaetales, família *Leptospiraceae*. Atualmente, a família Leptospiraceae está dividida em 13 espécies patogênicas, com 26 sorogrupos contendo mais de 260 sorovares patogênicos e 60 sorovares saprófitos (não-patogênicos). A maioria das leptospirosas patogênicas são classificadas em *Leptospira interrogans*, enquanto a espécie *Leptospira biflexa* agrupa os sorovares saprófitos (ADLER *et al.*, 2014).

Quanto à forma, as bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas com extremidades em gancho, com 0,1 a 0,2µm de diâmetro e 6 a 12µm de comprimento, com dois flagelos, sendo um em cada polo da célula, possibilitando sua movimentação. Essas bactérias, ao mesmo tempo, possuem membrana dupla e a presença de lipopolisacarídeos, aspecto típico de bactérias Gram-negativas, e a associação íntima da membrana citoplasmática com a mureína, característica de bactérias Gram-positivas (ADLER *et al.*, 2014), fazendo com que sua classificação, nesse quesito, seja ambígua.

Essas bactérias são altamente sensíveis a desinfetantes comuns, antissépticos e à exposição à luz solar direta, sendo a água um dos meios onde o agente se mantém viável no ambiente, dependendo das características físicas e químicas do meio em questão. O ambiente ideal para as mesmas seria com temperatura média de 30°C e pH de 7,2 a 7,4 (LANGONI *et al.*, 1999).

Segundo Adler e colaboradores (2014), a membrana das leptospirosas é composta de mosaicos antigênicos de lipopolisacarídeos, sendo esse o modo de classificação. Em sua camada externa, essas bactérias apresentam a proteína LipL32, uma das principais proteínas que conferem ao agente o caráter patogênico, sendo a proteína majoritária da membrana da *Leptospira* (MALMSTROM *et al.*, 2009), altamente expressada durante a infecção e ausente na espécie *L. biflexa* (GUERREIRO *et al.*, 2001).

#### 2.1.2 Patogenia e Sinais Clínicos

As leptospirosas possuem a capacidade de penetrar em pele e mucosas, íntegras ou com solução de continuidade, e assim se disseminar para outros tecidos após a infecção (FAINE *et al.*, 1999). Após a entrada do agente em um organismo, acontece uma rápida translocação sem danos no tecido, seguida pela disseminação nos órgãos alvo e invasão do sistema imune (KO *et al.*, 1999). Desta forma, as leptospirosas patogênicas no organismo têm um período de

incubação de dois a cinco dias antes de atingir a corrente circulatória, onde irão se disseminar em diversos órgãos e causar uma sintomatologia variada, sendo mais comum a lesão em tecidos esplênicos, renais e hepáticos (ROSE,1966). Os mecanismos de patogenia da leptospira ainda não foram completamente elucidados, contudo, entende-se que exista uma ligação com as proteínas de membranas que formam as camadas internas e externas, assim fazendo a ligação com receptores dos tecidos do organismo afetado (ADLER *et al.*, 2014).

Até que o hospedeiro possa ter uma resposta imune eficaz contra o agente, ele estará na fase de leptospiremia, a fase de multiplicação do agente, que tem duração média de quatro a cinco dias. Quando acontece a instalação da infecção, ocorre a evolução da doença para a fase aguda, bem como o desenvolvimento de imunidade. Eliminação ou desenvolvimento de estado portador crônico variam, dependendo de fatores como a condição do hospedeiro e o sorovar envolvido na infecção (FAINE *et al.*, 1999).

Em casos agudos da doença, os mamíferos apresentam principalmente desidratação e icterícia intensas, observando-se petéquias na mucosa oral e nasal. Já em casos subagudos, os animais sobrevivem à fase de septicemia, mas vêm a óbito devido à uremia causada pelo acometimento renal (JONES *et al.*, 2000). Ocorrendo a disseminação e colonização das leptospiras nos rins, inicia-se outra fase, a leptospirúria, entre o sétimo e o décimo dia da infecção, onde o agente será eliminado através da urina para o meio ambiente e causando a formação de complexos imunes e reação inflamatória que leva a uma vasculite generalizada em pulmões, rins, fígado e coração (FAINE *et al.*, 1999).

Os principais sinais clínicos envolvem febre, anorexia, oligúria ou anúria, conjuntivite, icterícia, diarreia sanguinolenta, insuficiência hepática e renal e problemas reprodutivos. Em exames hematológicos e bioquímicos, pode-se observar algumas alterações, com lesão hepática e renal, podendo haver leucocitose, trombocitopenia, uremia, aumento da concentração sérica de creatinina e das enzimas hepáticas e bilirrubina indireta (ETTINGER & FELDMAN, 2004).

Os rins colonizados pelo agente apresentam nefrite túbulo-intersticial, necrose tubular e hemorragias. As bactérias são encontradas em grande número nos túbulos contorcidos proximais, glomérulos e interstício (VAN DEN INGH *et al.*, 1986; NALLY *et al.*, 2004).

### **2.1.3 Leptospira em roedores**

Os roedores sinantrópicos e roedores silvestres são os principais reservatórios da *Leptospira* spp. no ambiente, e teoriza-se que estes, quando infectados, passam por ambas as

fases da infecção, mas não demonstram sinais clínicos, o que faz com que estes se mantenham como vetores do agente, eliminando a bactéria viva através da urina durante semanas (FAINE,1999). Segundo Faine e colaboradores (1999), o conhecimento sobre a *Leptospira* nos roedores é limitado, citando como maior achado microscópico do tecido renal as nefrites intersticiais, infiltrado de leucócitos e plasmócitos e ausência de infiltrado neutrofilico, o que sugere que estes agentes não estimulam fortemente o sistema imune tecidual.

Dentre os sinantrópicos, os roedores são os reservatórios habituais das leptospiros no ambiente urbano. Acredita-se que, dentre os roedores sinantrópicos, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) tenha o papel de maior risco com relação à transmissão da leptospirose no ambiente urbano, uma vez que numerosos estudos têm identificado esta espécie como o reservatório predominante de *Leptospira spp.* nos arredores dos domicílios de pessoas com a doença (VINETZ *et al.*, 1996; PEZZELLA *et al.*, 2004; FARIA *et al.*, 2008).

#### **2.1.4. Pequenos mamíferos silvestres do cerrado**

No Brasil, os pequenos mamíferos não voadores detêm o maior número de espécies dentro da classe Mammalia. Esse grupo de animais é representado, principalmente, pelos roedores e marsupiais, que apresentam tanto espécies com ampla distribuição, quanto aquelas de ocorrência restrita a algumas áreas (EMMONS & FEER, 1999). Os pequenos mamíferos, tanto em suas espécies silvestres quanto nas sinantrópicas, já foram caracterizados como importantes reservatórios de sorovares patogênicos de *Leptospiras* (SOUZA *et al.*, 2016). Várias espécies animais atuam como portadores de leptospiros, abrigando esta espiroqueta no túbulo contorcido proximal e a eliminando, de forma intermitente, na urina. Muitos casos desta enfermidade podem ser subnotificados por serem autolimitantes e com manifestações clínicas inespecíficas, tornando difícil a sua distinção de outras doenças infecciosas (EVANGELISTA & COBURN, 2010).

O Cerrado corresponde a 22% do território brasileiro (OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002). Este bioma apresenta um mosaico de fisionomias vegetais que variam desde formações florestais até matas ciliares (EITEN,1992). Os pequenos mamíferos são um dos componentes ecológicos mais importantes dentro do cerrado, abrigando aproximadamente 36% das espécies de pequenos mamíferos brasileiros, sendo Quiroptera (101 espécies), Rodentia (78 espécies) e Didelphimorphia (26 espécies) os grupos mais representativos (PAGLIA *et al.*, 2011). Segundo Lessa e Paula (2014), o cerrado da região do parque estadual do Rio Preto, na cidade de São Gonçalo, em Minas Gerais, apresenta em sua maioria marsupiais da ordem Didelphimorphia sendo *Gracilinanus agilis*, *Gracilinanus microtarsus* e

*Marmosops incanus* as espécies mais encontradas. Dentre as espécies da ordem Rodentia, as mais encontradas foram *Oligoryzomys nigripes*, *Rhiphidomys mastacalis* e *Cerradomys subflavus*.

## **2.2 Métodos de diagnóstico de Leptospira**

Entre as formas de diagnóstico de leptospira, pode-se utilizar a associação de sinais clínicos e histórico do animal, contudo, também podem ser utilizados meios diretos e indiretos no diagnóstico (GOMES, 2011). Nos testes diretos, pode-se destacar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a microscopia com fundo escuro, culturas e colorações histológicas, que têm como princípio a detecção do agente ou seu DNA nos tecidos do animal. Nos testes indiretos, destacam-se a soroaglutinação microscópica e testes imunoenzimáticos, que fazem a investigação dos anticorpos contra o agente no soro sanguíneo ou no líquido cefalorraquidiano (FAINE *et al.*, 1999).

No exame necroscópico, observa-se principalmente icterícia e a hemorragia pulmonar, além do aumento e deformidade de tecidos renal, esplênico e hepático. Outras alterações, como petéquias em cavidade pleural e peritoneal, mucosa nasal e oral, e hipertrofia de baço e linfonodo também podem ser visualizadas. Microscopicamente na coloração de Hematoxilina-Eosina, é possível observar um grau variado de nefrose tubular e nefrite intersticial não supurativa, nos tecidos hepáticos é comum uma dissociação dos cordões de hepatócitos e necrose hepática (JONES *et al.*, 2000). Na técnica de impregnação de prata, que tem como princípio ativo o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), objetiva-se a coloração de filamentos proteicos que formam a membrana externa da *Leptospira* spp. O Azul de Alcian é geralmente preparado em um pH ácido de 2,5 e é usado para identificar mucopolissacarídeos ácidos e mucinas acéticas, sendo usado junto ao ácido periódico de Schiff (PAS), principalmente para a coloração de estruturas que contenham uma alta proporção de carboidratos, como glicogênio, glicoproteínas, proteoglicanos, geralmente encontrados em tecidos conjuntivos, muco e membranas basais de bactérias (TOLOSA *et al.*, 2003).

Muitos pesquisadores relatam a importância da PCR para o diagnóstico desta doença, contudo, este exame direto não constitui a rotina de laboratórios, devido ao preço do exame e à falta de estrutura e profissionais capacitados na realização do mesmo.

### **2.2.1 Soroaglutinação**

Os testes sorológicos são os mais amplamente utilizados para leptospirose animal, sendo a Soroaglutinação (MAT) a técnica mais utilizada e recomendada a partir do padrão

estabelecido pela Organização Mundial de Saúde no *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal* (OIE, 2014). Sendo amplamente difundido, o teste tem a capacidade de detectar a presença de anticorpos pela aglutinação em diferentes diluições, usando antígenos de diferentes cepas de leptospira, que são mantidas em laboratório enriquecidas com meios como Stuart, Fletcher e Ellighausen (EMJH) em estufas bacteriológicas. São consideradas positivas as amostras que apresentam aglutinação em diluições iguais ou acima de 1:100. O método tem alta especificidade e sensibilidade, contudo, existe a possibilidade de reação cruzada com outro sorovar que não é aquele que está causando a infecção, devido à proximidade antigênica entre os sorovares de *Leptospira* spp. (GOMES, 2011). O MAT (Soroaglutinação Microscópica) é o exame laboratorial mais utilizado para o diagnóstico de Leptospirose. É considerado o teste diagnóstico padrão ouro para leptospirose pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Baseia-se na identificação da aglutinação do soro do paciente com antígenos vivos em microscópio de campo escuro (ADLER, 2014).

### **2.2.2 PCR**

A PCR tem a capacidade de amplificar o DNA de *Leptospira* spp. a partir de soro, urina, humor aquoso, líquido, e vários órgãos *post-mortem* (LEVETT, 2014). Foram descritos ensaios de PCR quantitativos com inúmeros genes alvos, entre eles o lip132, próprio de leptospiros patogênicas (STODDARD *et al.*, 2009). A técnica da PCR é mais sensível que o diagnóstico por isolamento, entretanto, menos sensível que o Teste de Aglutinação Microscópica (BROWN *et al.*, 1995).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido para análise junto à Comissão de Utilização de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia e à Comissão de Experimentação Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia e aprovado (APÊNDICE 1).

#### 3.1 Material de confecção das lâminas

O estudo foi realizado com 68 amostras de tecidos renais provenientes de mamíferos silvestres não voadores capturados na região do rio Paranaíba, sendo emblocados e confeccionas as lâminas e coradas no Laboratório de Histopatologia Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Os tecidos renais foram coletados de animais proveniente da região do rio Paranaíba, dividindo-se em região do alto Paranaíba, médio Paranaíba e baixo Paranaíba e incluindo espécies comumente encontradas no cerrado brasileiro (Tabela 1).

**Tabela 1** – Espécies de pequenos mamíferos não voadores capturados na região do Rio Paranaíba – agosto/2016 a abril/2017.

<b>Números de animais</b>	
<i>Akodon</i>	3
<i>Calomys</i>	4
<i>Cerradomys</i>	4
<i>Didelphis</i>	1
<i>Gracilinanus</i>	30
<i>Hylaeamys</i>	4
<i>Mus musculus</i>	1
<i>Mycoureus</i>	4
<i>Nectomys</i>	3
<i>Oecomys</i>	10
<i>Rattus</i>	3
<i>Rhipidomys</i>	1
<b>Total</b>	<b>68</b>

Fonte: MOREIRA, 2018

Os animais que participaram deste estudo foram classificados por local onde foram capturados, método de captura, época do ano, sexo e idade. Podemos identificar a separação dos animais capturados pelo sexo e pela idade, sendo possível identificar que cerca de 44,45% dos animais capturados eram fêmeas adultas. Existe a possibilidade que estes animais terem sido capturados devido ao fato de estarem em período reprodutivo, onde

estariam mais susceptíveis a ação de predadores, e por terem extrema territorialidade durante este período da vida, assim ocupando mais espaços em comparação aos machos. Segundo Lopes (2014), as fêmeas de *Gracilinanus Agilis* estudadas na região de Uberlândia, durante o seu período fértil tiveram alta territorialidade ocupando espaços aonde não ocupavam anteriormente, na tentativa de proteger maiores recursos alimentares.

**Tabela 2** - Animais capturados em cada período climático do ano - região do Rio Paranaíba - agosto/2016 a abril/2017.

	Chuvoso (%)	Seco (%)
<i>Akodon</i>	1 (33,33)	2 (66,66)
<i>Calomys</i>	-	4 (100)
<i>Cerradomys</i>	2 (50)	2 (50)
<i>Didelphis</i>		1 (100)
<i>Gracilinanus</i>	7 (23,33)	23 (76,66)
<i>Hylaeamys</i>	2 (50)	2 (50)
<i>Mus musculus</i>	-	1 (100)
<i>Mycoureus</i>	2 (50)	2 (50)
<i>Nectomys</i>	2 (66,66)	1 (33,33)
<i>Oecomys</i>	3 (30)	7 (70)
<i>Rattus</i>	1 (33,33)	2 (66,66)
<i>Rhipidomys</i>	-	1 (100)
<b>Total</b>	<b>20 (29,41)</b>	<b>48 (70,59)</b>

Fonte: MOREIRA, 2018

Na tabela 2 podemos identificar o período climático que cada espécie foi capturada, podemos observar que cerca de 29,41% dos animais deste projeto, foram capturados durante o período chuvoso. Enquanto 70,59% foram capturados durante o período seco do ano, a motivação dos mamíferos silvestres não voadores serem capturados com maior facilidade durante o período seco, seria devido à escassez de alimentos, sendo obrigados a buscar em outros locais alimento. Segundo Ramos (2007), os pequenos mamíferos silvestres têm sua dieta formada partir de produtos de origem vegetal, como sementes, folhagem e fragmentos de frutos, e produtos de origem animal em sua maioria artrópodes que vivem na região. Durante períodos de escassez, estes animais têm dificuldade em encontrar alimento, assim sendo necessário andar mais espaços, podendo ser mais facilmente predados ou capturados, muitas vezes tendo que escalar árvores, quando não existe alimentos disponíveis no solo (Vieira e Camargo, 2012; Abreu et al., 2015). Podemos observar na tabela 3, onde maioria dos animais foram capturados em armadilhas montadas em árvores, devido à falta de recursos no solo, procurando outras fontes de alimentos.

**Tabela 3** – Animais capturas classificado pelo período do ano e local da armadilha – Região do rio Paranaíba – 2017.

	Período chuvoso		Período seco	
	Árvore (%)	Solo (%)	Árvore (%)	Solo(%)
<i>Akodon</i>	-	33,33 (1/3)	-	66,66 (2/3)
<i>Calomys</i>				100 (4/4)
<i>Cerradomys</i>		50 (2/4)	25 (1/4)	25 (1/4)
<i>Didelphis</i>				100 (1/1)
<i>Gracilinanus</i>	13,33 (4/30)	10 (3/30)	60 (18/30)	16,66 (5/30)
<i>Hylaeamys</i>		50 (2/4)		50 (2/4)
<i>Mus musculus</i>				100 (1/1)
<i>Mycoureus</i>	25 (1/4)	25 (1/4)	50 (1/4)	
<i>Nectomys</i>		66,66 (2/3)		33,33 (1/3)
<i>Oecomys</i>	20 (2/10)	10 (1/10)	70 (7/10)	
<i>Rattus</i>		33,33 (1/3)		66,66 (2/3)
<i>Rhipidomys</i>				100 (1/1)
Total	10,29 (7/68)	19,11 (13/68)	41,17 (28/68)	29,41 (20/68)

Fonte: MOREIRA, 2018.

**Tabela 4** – Animais positivos no teste de PCR - UFU – 2017

	PCR (Urina)	
	Positivos	Negativo
<i>Akodon</i>	25%	75%
<i>Calomys</i>	50%	50%
<i>Cerradomys</i>	-	100%
<i>Didelphis</i>	-	100%
<i>Gracilinanus</i>	41,18%	58,82%
<i>Hylaeamys</i>	50%	50%
<i>Mus musculus</i>	-	100%
<i>Mycoureus</i>	-	100%
<i>Nectomys</i>	100%	-
<i>Oecomys</i>	20%	80%
<i>Rattus</i>	-	100%
<i>Rhipidomys</i>	-	100%
Total	35,29%	64,71%

## 3.2 Estudo histológicas

### 3.2.1 Coloração Alcian Blue e Ácido Periódico de Schiff (PAS)

As leptospiros tem sua membrana composta por um mosaico LPS, formado por glicolípídios e lipoproteínas de origem polissacarídica. O Alcian Blue, juntamente com o

PAS, reage com polissacarídeos ácidos e polissacarídeos neutros, respectivamente. O objetivo desta coloração é identificar os lipopolissacarídeos que formam a membrana externa das *Leptospira spp.*, e assim possivelmente identificar a localização da leptospira no tecido renal (NUNES, 2015).

As lâminas foram desparafinizadas em xilol por 5 (cinco) minutos duas vezes, em seguida hidratadas em série de álcool 99%, álcool 96%, álcool 70%. As lâminas foram lavadas em água destilada por 2 minutos. Após secagem, foi realizada a coloração na seção de tecido cobrindo o corte com Alcian Blue pH 2,5, deixando agir por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 3 minutos. Após secar as lâminas novamente, aplica-se o PAS sobre o de tecido, deixando agir por 10 minutos. Em seguida, realiza-se novam lavagem por 3 minutos, seguida de secagem. Em seguida, cobre-se o corte da lâmina com Reagente de Schiff, deixando agir por 15 minutos e lavando por 5 minutos. Após secagem, coloca-se o reagente de Hematoxilina de Carazzi, deixando agir por 4 minutos. Lava-se as lâminas em água corrente por 3 minutos. Após secagem, realiza-se desidratação em série de álcool ascendente até o xilol e efetua-se a montagem da lâmina.

### **3.2.2 Coloração de Warthin-Starry**

A coloração de Warthin-Starry tem como princípio ativo o nitrato de prata, fazendo coloração dos filamentos axiais que constituem a membrana de bactérias espiroquetas. Durante a coloração das lâminas, elas foram desparafinizadas e hidratadas com água destilada, em seguida impregnadas com solução de nitrato de prata a 1% e colocadas na estufa a 60°C durante 1 hora. Em seguida, foram lavadas com água destilada e reveladas da solução com hidroquirona e nitrato de prata até adquirir aspecto castanho dourado, de 3 a 4 minutos; em seguida, procede-se a lavagem com água tamponada por 3 minutos. Durante a leitura, identificou-se as espiroquetas em preto e as demais estruturas em castanho amarelado (TOLOSA *et al.* 2003).

### **3.2.3 Coloração Hematoxilina-Eosina**

Durante a coloração das lâminas, elas foram desparafinizadas com xilol por 10 minutos e desidratação com álcool 99.9% durante 3 minutos, lavadas com água destilada corrente por 4 minutos, imersão das lâminas na Hematoxilina (Harris) durante 10 minutos em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada corrente durante 4 minutos, limpeza das lâminas com álcool 1% por 5 segundos e em seguida a imersão em Eosina durante 20 segundos a 1 minuto e lavagem em água corrente durante 5 segundos. Durante a leitura, identificou-se os núcleos em azul, citoplasma em tons de rosa, fibras musculares em

vermelho, eritrócitos em laranja e fibrina em rosa intenso (CARSON, 1997; LOTOSA, et. al. 2003).

### **3.3 Análise estatística**

Utilizou-se estatística básica como percentual simples para expressar os resultados. Os resultados da PCR e MAT realizados em projeto anterior, foram confrontados com os resultados das colorações histológicas, sendo considerado positivos no Alcian Blue e Warthin-Starry os tecidos que apresentavam a presença da bactéria, enquanto na Hematoxilina-Eosina os tecidos que apresentavam Nefrite Intersticial Focal com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a sintomatologia clínica e inexistência de lesões de caráter patognomônico, que mostra um resultado conclusivo de um quadro de infecção por *Leptospira* spp., sendo essenciais a utilização dos exames laboratoriais durante o diagnóstico da leptospirose. Podendo fazer o uso de exames diretos e indiretos, ou seja, exames que procuram a presença do agente ou exames que procurem anticorpos contra o agente, respectivamente (GROOMS & BOLIN, 2005). Entre os testes mais usados, como citado no corpo deste projeto, o MAT, teste de soroprecipitação microscópica é a técnica de escolha mais comum e uma das melhores quando pensamos em teste indireto para a leptospirose (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

O diagnóstico por métodos diretos pode ser realizado por imunofluorescência, cultura bacteriana, histopatologia e reação de cadeia em polimerase (PCR). O exame histopatológico com pigmentos especiais é o único que pode utilizar tecidos formolizados (renais, placentários, pulmonares, hepáticos em casos de aborto), tendo como desvantagem uma baixa sensibilidade e incapacidade de detectar a sorovariedade infectante (GROOMS e BOLIN, 2005).

**Tabela 5** – Relação de animais positivos em ao menos um teste realizado – UFU – janeiro de 2017 a novembro 2019.

	Positivos (%)	Negativos (%)
<i>Akodon</i>	1 (33,33)	2 (66,66)
<i>Calomys</i>	1 (50)	1 (50)
<i>Cerradomys</i>	1(25)	1 (75)
<i>Didelphis</i>	-	4 (100)
<i>Gracilinanus</i>	21 (70)	9 (30)
<i>Hylaeamys</i>	3 (75)	1 (25)
<i>Mus musculus</i>	1 (100)	-
<i>Mycoureus</i>	3 (75)	1 (25)
<i>Nectomys</i>	1 (100)	-
<i>Oecomys</i>	3 (30)	7 (70)
<i>Rattus</i>	-	1 (100)
<b>Total</b>	<b>36 (56,94)</b>	<b>32 (47,05)</b>

Dentre os 68 animais avaliados 56,94% eram positivos e 47,05 negativos (Tabela 5). Os animais que apresentaram positividade durante estes exames foram considerados como portadores do agente, de anticorpos contra a espiroqueta ou lesões característica que as *Leptospira* spp. causam no tecido renal de mamíferos. Contudo, não afirmar que animais

negativos nos testes realizados, são realmente negativos em relação ao agente, isso a diversos fatores como a não evidência da bactéria nos cortes histológicos do fragmento renal coletado, a infecção aguda ainda não ocorrendo a s do sistema imune do animal ou ação de outras bactérias que causariam o desenvolvimento de infiltrado inflamatório no tecido renal (ADLER, 2014).

**Tabela 6** - Animais positivos em cada teste realizado – UFU – maio/2017 a novembro/2019.

	PCR (%)	MAT (%)	HE (%)	AB (%)	WS (%)
<i>Akodon</i>	33,33 (1/3)	-	33,33 (1/3)	33,33 (1/3)	-
<i>Calomys</i>	50 (2/4)	-	25 (1/4)	25 (1/4)	25 (1/4)
<i>Cerradomys</i>	-	-	25 (1/4)	-	-
<i>Didelphis</i>	-	-	-	-	-
<i>Gracilinanus</i>	41,17 (13/30)	3,33(1/30)	41,17 (13/30)	3,33 (1/30)	6,66 (2/30)
<i>Hylaeamys</i>	50 (2/4)	-	50 (2/4)	-	-
<i>Mus musculus</i>	-	-	100 (1/1)	-	-
<i>Mycoureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Nectomys</i>	100 (3/3)	-	100 (3/3)	-	33,33 (1/3)
<i>Oecomys</i>	20 (2/10)	-	40 (4/10)	-	20 (2/10)
<b>Total</b>	<b>33,28 (23/68)</b>	<b>1,4 (1/68)</b>	<b>36,76 (25/68)</b>	<b>4,41 (3/68)</b>	<b>8,82 (6/68)</b>

Fonte: O autor.

Também observa-se os índices de animais positivos em teste de PCR em sua maioria não foram positivos em sorologia realizada através do MAT, isso pode ser indicado devido ao fator do animal ter sido contaminado pelo agente, passarem pela sintomatologia clínica da doença e após a recuperação se tornarem portadores assintomáticos (ADLER, 2014).

Um dos fatores que podem influenciar na ação do agente, poderia ser a resistência do hospedeiro. Neste estudo foram coletadas amostras de 68 animais com 12 espécies diferentes de mamíferos silvestres não voadores, sendo um fator que pode influenciar no diagnóstico da *Leptospira* spp., devido ao fato que cada espécie mesmo sendo de uma ordem única ainda tem diferenças imunológicas que podem agir de forma diferente em frente a uma infecção.

As *Leptospira* spp. não tem tropismo por nenhum tecido do organismo sendo mais encontrado no tecido renal, contudo podendo ser encontrado no fígado, pulmão, útero, anexos fetais e testículo (ADLER et al. 2014). A *Leptospira* spp. possui em sua membrana diversos componentes antigênicos como lipoproteínas, lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e endotoxinas que podem acarretar doenças renais, como uma disfunção tubular e inflamação. Várias proteínas de membrana externa da espécie patogênica, já foram isoladas e estudadas

como causadoras da antigenicidade da bactéria dentro do organismo, entre as mais comuns podemos citar a LipL32, uma proteína de membrana de grande importância, que afeta diretamente as células tubulares proximais e aumenta a expressão de genes e proteínas pró-inflamatórias, como óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a proteína quimiotática de monócitos-1 (CCL2/MCP-1) e células T (RANTES). Algumas alterações como a nefrite intersticial ocorre devida a infiltração estimulada pela quimiocina CCL2/MCP-1, enquanto a TNF- $\alpha$ , uma citocina inflamatória, é uma mediadora de endotoxemia (YANG *et al.*, 2006).

A presença dos receptores “Toll-like”, são fundamentais nas células dos túbulos proximais para que ocorra a estimulação de CCL2/MCP-1 e iNOS, pela LipL32, sendo estes receptores um gatilho para reconhecer os padrões moleculares de patógenos atuando na primeira linha de defesa da imunidade inata e gerando uma resposta inflamatória (YANG *et al.* 2006). Assim as proteínas de membranas ligam-se ao TLR2 nas células localizadas no túbulo proximal que leva a ativação do fator nuclear NF- $\kappa$ B, que estimula a produção de CCL2/MCP-1 e CXCL2/MIP-2 para a seleção de células inflamatórias (BLASI, *et al.* 2007).

Neste trabalho foi utilizada a técnica de Hematoxilina-Eosina evidenciando possíveis lesões causadas por *Leptospira* spp.

**Tabela 7** – Animais com alterações histopatológicas durante a coloração Hematoxilina-Eosina, realizada no Laboratório de histopatologia veterinária – UFU, no ano de 2019.

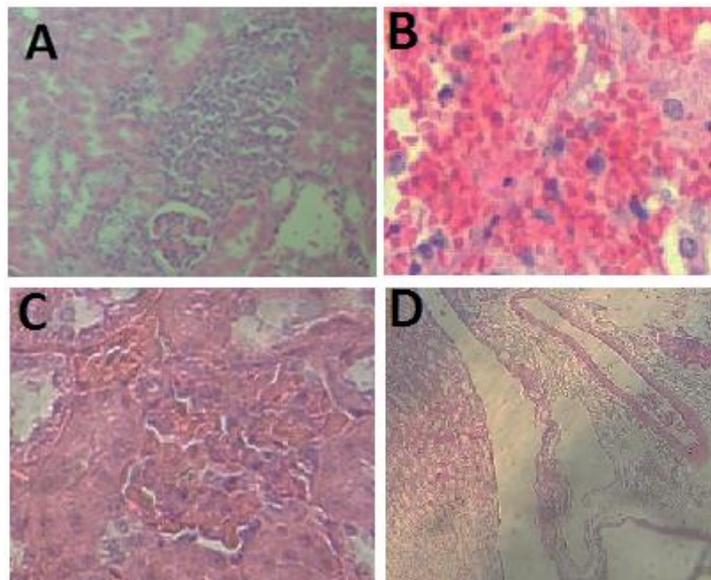
	<b>NIFL (%)</b>	<b>Congestão (%)</b>	<b>Hemorragia (%)</b>	<b>Cisto (%)</b>
<i>Akodon</i>	33,33 (1/3)	33,33 (1/3)	-	33,33 (1/3)
<i>Calomys</i>	25 (1/4)	2 (1/4)	-	-
<i>Cerradomys</i>	25 (1/4)	-	25 (1/4)	-
<i>Didelphis</i>	-	100 (1/1)	-	-
<i>Gracilinanus</i>	50 (25/30)	40 (12/30)	6,66 (2/30)	-
<i>Hylaeamys</i>	50 (2/4)	50 (2/4)	-	-
<i>Mus musculus</i>	100 (1/1)	-	-	-
<i>Mycoureus</i>	-	75 (3/4)	-	-
<i>Nectomys</i>	100 (3/4)	33,33 (1)	-	-
<i>Oecomys</i>	4 (40)	5 (50)	-	-
<i>Rattus</i>	-	1 (33,33)	-	-
<i>Rhipidomys</i>	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>41,17(28/68)</b>	<b>27(39,70) (27/68)</b>	<b>4,42 (3/68)</b>	<b>1,4 (1/68)</b>

\*NIFL – Nefrite Intersticial Focal com infiltrado inflamatório Linfoplasmocitário

FONTE – O Autor

A leptospirose é causadora de uma vasculite infecciosa. Na forma grave, os organismos podem desenvolver alterações hemodinâmicas secundárias à hipovolemia devido à desidratação e aos efeitos diretos das toxinas que lesam o endotélio vascular e aumentam a permeabilidade (DAHER, et al. 1999), onde muitas lesões são possíveis de serem identificados na coloração de Hematoxilina-Eosina. A nefrite intersticial focal com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (Figura 1A) foi a alteração microscópica mais encontrada durante a análise das lâminas. Segundo Searcy (1998), após a lesão hepática aguda, a localização desses microrganismos nos rins pode causar nefrite intersticial focal ou difusa. Através das proteínas antigênicas como a Lip132, proteína de membrana externa de *leptospira* spp. da espécie *Interrogans*, que causa a estimulação das quimiocina CCL2/MCP-1 onde os receptores “Toll-like” são estimulados e ocorre o recrutamento de citocina para a defesa através da imunidade inata do animal (YANG, et al. 2006).

**Figura 1** – (A) Fotomicrografia de tecido renal de *Gracilinanus Agillis* com nefrite intersticial focal com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na coloração de Hematoxilina-Eosina(HE), objetiva 40X. (B) Hemorragia renal em tecido de *Cerradomys*, com hemácia fora dos vasos sanguíneos, na coloração de Hematoxilina-Eosina(HE), objetiva de 40X. (C) Hiperemia de vasos renais em tecido de *Mycoureus*, repletos de hemácias, na coloração de Hematoxilina-Eosina(HE), objetiva de 40X. (D) Cisto renal em rim de *Akodon*, na coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), objetiva de 40X

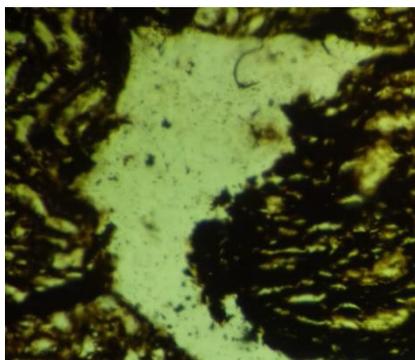


No estudo das lâminas coradas com Hematoxilina- Eosina também foi observado cerca de 26,47% com hiperemia vasos renais, estando repletos de hemácias e em cerca de 4,41% com hemorragia. Chandrasekaran et al. (2011), durante avaliação microscópica de rins

de cães portadores de *Leptospira* spp., observaram como dois principais achados a nefrite intersticial focal com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e hiperemia dos vasos renais. Durante o exame microscópico também foi observado,

Na coloração de Alcian Blue foram cerca de 4,41% das amostras foram positivas (Tabela 3) sendo possível a visualização das proteínas mucinas ácidas que formam as bactérias. Acredita-se que o método de conservação dos fragmentos não foi ideal para a investigação de espiroqueta, a utilização do formol 10% para a conservação dos tecidos renais pode ter degradado estas proteínas que formam a bactéria, não sendo possível que a encontrasse. Na técnica de Warthin-Starry, que utiliza nitrato de prata como um revelador na busca de espiroqueta, 12,5% de amostras foram positivas, onde foi possível visualizar a bactéria no tecido renal, contudo houve a oxidação da prata causando artefatos na coloração, onde 36 amostras não conseguiram ser coradas. Ao todo, foram 32 lâminas lidas, com 12,5% de amostras positivas, onde foi possível visualizar a bactéria no tecido renal.

**Figura 2** – Fotomicrografia de rim de *Gracilinanus Agillis* impregnado com nitrato de prata 2% na técnica de Warthin-Starry com presença de *Leptospira* spp. no túbulo renal, objetiva de 40X.



#### 4.1. Análises comparativas de técnicas

Através de um teste de contingência, foi avaliada a sensibilidade e especificidade de técnicas que foram realizadas neste projeto. Realizou-se a comparação da coloração de Hematoxilina e Eosina com o PCR, onde a foi levado em consideração o PCR como teste de padrão ouro para a identificação de *Leptospira* spp. no tecido renal.

**Tabela 8** – Teste de contingência entre PCR e HE – novembro 2019

		PCR		
		Positivo	Negativa	Total
HE	Positivos	17	8	25
	Negativa	4	39	43
	Total	21	47	68

Na tabela 8, levou-se em consideração que todo animal portador de nefrite intersticial focal ou multifocal linfoplasmocitária e hiperemia de vasos renais foram positivos a presença do agente. Obtendo índices que demonstram que os testes teriam o total de 80% de sensibilidade, onde animais positivos esta porcentagem de serem verdadeiramente positivos, e 82% de especificidade, que seria a capacidade do teste de detectar animais que verdadeiramente são negativos.

29,41% dos animais apresentaram exame de PCR positivo e negativa no MAT e tiveram lesões com infiltrado inflamatório, que as *Leptospira* spp. estimula uma reação imunológica do sistema com suas proteínas antigênicas de caráter celular do animal, contudo não sendo capaz de estimular uma imunidade humoral, a imunidade adquirida que são formados anticorpos, tornando-se animais que tem a bactéria em seu tecido renal, mas são portadores assintomáticos. Os animais que estão se recuperando da infecção podem se tornar portadores assintomáticos no exame de soroaglutinação microscópica, abrigando as leptospiros nos túbulos renais por extensos períodos e disseminando-as no meio ambiente (LEVETT, 2001). Os animais podem ser positivos em exames de PCR de urina, onde são portadores assintomáticos que ter leptospiúria e não despertando o sistema imune dos animais.

## 5. CONCLUSÃO

A técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina, Alcian Blue e Warthin-Starry pode ser utilizada como complementar ao diagnóstico de leptospirose mesmo tendo uma baixa sensibilidade, pois foi capaz de identificar lesões renais características de infecção por *Leptospira* spp., em animais PCR positivos na urina, mesmo estando sorologicamente negativos. As técnicas de coloração, por outro lado não tem especificidade, não sendo capaz de identificar os sorovares envolvido na infecção, enquanto técnicas como o MAT, além de diagnosticar a doença consegue especificar o sorovar envolvido. As espécies de mamíferos silvestres não voadores envolvidas neste trabalho, parecem ser portadoras assintomáticas de leptospirose e precisam ser investigadas quanto a sua importância epidemiológica, onde podem ser reservatórios importantes da doença.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.S.L.; SHMITZ, G.W.; OLIVEIRA, L.R. 2015. Recursos alimentares nos estratos verticais e sua relação com pequenos mamíferos em uma floresta de araucária do Sul do Brasil. *Revista de Ciências Ambientais*, 9(2): 131-144.

ADLER, B. *Leptospira and leptospirosis*. Berlim: Ed. Springer, 2014.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis*. *Veterinary Microbiology*, v. 149, n 3-4, p. 287-296.

ANZAI, E. K. UTILIZAÇÃO DA PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leptospira* spp. Londrina. Universidade Estadual de Londrina. 2006.

AZEVEDO, L. Interrelação entre frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e exames histopatológico (Hematoxilina-Eosina e Warthin-Starry) em suínos abatidos no semiárido paraibano. *Arquivo Instituto Biológico, São Paulo*, v.80, n.1, p.27-34, 2013.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. *Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance*. *Lancet Infectious Diseases*, vol.24, n. p. 15-25, 2003.

BLASI, E.; ARDIZZONI, A.; COLOMBARI, B. NF-kB activation and p38 phosphorylation in microglial cells infected with *Leptospira* or exposed to partially purified leptospiral lipoproteins. *Microb Pathog* 2007; 42:80-7.

BROWN, P. D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G.; KEMP, H. VAN DE; HARTSKEERL, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O. R.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 110–114, 1995.

CARSON, F.L. *Histotechnology: a self-instructional text*. Hardcover: Ed. ASCP Press, 2<sup>a</sup> ed., 1997.

BAROCCHI, M.A.; KO, A.I.; FERRER, S.R.; FARIA, M.T.; REIS, M. G.; RILEY, L. W. Identification of New Repetitive Element in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni and Its Application to PCR-Based Differentiation of *Leptospira* Serogroups. *Clinical Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 191–195, 2001.

CHANDRASEKARAN, D.; PRATHABAN, S. DHANABALAN, P.; BALACHANDRAN, C.; MURALI, M.B.; VENKATARAMAN, K.S.; Pathological Changes in Canine Leptospirosis. *Tamil Nadu J Veterinary & Animal Sciences* 7: 180-183, 2011.

CORDEIRO, F.; SULZER, C.R.; RAMOS, A.A. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in Southeast Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, vol.1, n.1, p. 19 - 29, 1981.

COSTA, F.; WUNDER, E. A.; OLIVEIRA, D.; BISHT, V.; RODRIGUES, G.; MITERMAYER G. R.; KO, A. I.; BEGON, M.; CHILDS, J. E. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2015.

DAHER, E.F.; ZANETTA, D.M.T.; CAVALCANTE, M, et al. Risk factors for death and changing patterns in acute renal failure of leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:630-4..

EMMONNS, L. H.; FEER, F. Neotropical Rainforest Mammals: A field guide. Chicago: The University of Chicago Press, 2<sup>a</sup> ed., 1999.

ETINGER, S. J. FELDMAN E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> ed., v.1, 2004.

EITEN, G. Natural Brazilian vegetation types and their causes. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, vol.64, p.35–65, 1992.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.*, v.5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Clinical laboratory diagnosis of leptospirosis. [s.l: s.n.].

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A.mG.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, p.3303–3310, 2001.

GOMES, MARCOS J.P. Gênero *Leptospira* spp. Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: . Acesso em:<[www.ufrgs.br/labacvet](http://www.ufrgs.br/labacvet)>. 01 jun. 2019.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N, W.; *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 6ed. 2000

KO, A. I.; MITERMAYER, G. R.; DOURADO, C. M. R., JOHNSON, W. D., Lee W.; Riley Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis 438 Study Group. *Lancet*, v. 354, p. 820–825, 1999.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; LUVIZOTTO, M. C.; PAES. A. C, LUCHEIS S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, n.3-4, p.271-275, 2008.

LAU, C., L.; SMYTHE, L. D.; CRAIG, S. B.; WEINSTEIN, P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Transactions of the Royal Society of Tropical*

Medicine and Hygiene, v. 104, p. 631-638, 2010.

LESSA, L.G.; PAULA, S. C.; Estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em uma área de mata ciliar savânica no Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais, Brasil. Neotropical Biology and Conservation, vol.2, p.108-104, 2014.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews, v. 14, p. 296–326, 2014.

LOPES, G.P; Estratégia reprodutiva e organização espacial de uma população de *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphi:Didelphidae) na estação ecológica do Panga, em Uberlândia/MG. Universidade Federal de Uberlândia. 2007.

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, J. R.; BEZERRA, E. E. A.; LEAL, L. M.; SOUSA, F. A. L.; CAMPOS, A. P.; MOREIRA, E. C.; COSTA, F. A. L. Evaluation of leptospirosis control through vaccination in a cattle dairy farm in the state of Piauí. Universidade Federal do Piauí. 2014

NALLY, J. E. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a Guinea Pig model of severe pulmonary leptospirosis. The American Journal of Pathology, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.

NUNES, A. A. Identificação de biofilme renal em ratos naturalmente infectados por leptospira interrogans através de técnicas histoquímicas e de microscopia eletrônica de varredura. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Diniz. Salvador, 2015.

PEZZELA, M.; LILLINI, E.; STURCHIO, E.; IERARDI, L. A.; GRASSI, M.; TRADITI, F.; CRISTALDI, M. Leptospirosis survey in wild rodents living in urban areas of Rome. Annali di higiene., vol.16, p.721–726, 2004.

OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). Leptospirosis, Capítulo 3.1.12.2006. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.12\\_LEPTO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf)> Acesso em 17 maio 2019.

OLIVEIRA, S.J. Leptospira. In: GUERREIRO, M.G., OLIVEIRA, S.J., SARAIVA, D.Bacteriologia Especial. Porto Alegre: Ed., Cap 39, p. 463-483, 1984.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; A.T. RATTER, J.A. Vegetation physiognomines and wood flora of the cerrado biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. The Cerrado of Brazil. Nova York: Columbia University Press, p. 91-119, 2002.

PAGLIA, A.P.; FONSECA, G.A.B. DA; RYLANDS, A.B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L.M.S.; CHIARELLO, A.G.; LEITE, Y.L.R.; COSTA, L.P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; TAVARES, V. DA C.; MITTERMAYER, R.A.; PATTON, J.L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology, Arlington, Conservation International, nº 6. 2ª ed., p 76.

PASSAMANI, M. 1995. Vertical stratification of small mammals in Atlantic hill forest. Mammalia, vol.59, n.2, p.276-279, 2011.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. Doenças de

Ruminantes e Equinos. São Paulo: Varela, v.2, 2001.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 4, p. 373–378, 2006.

ROSE, G. W. Mechanism of tissue cell penetration by *Leptospira pomona*: active, penetration studies in vitro. *American Journal of Veterinary Research*, v.27, p.1461-1471, 1996.

SANTOS, N.; COSTA, F.; REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D. M.; SANTANA, C.; BATISTA, A. C.; MITERMAYER, G. R.; KO, A. I. Infestação por roedores no ambiente urbano: O papel das deficiências ambientais na transmissão da leptospirose. *Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia*. 2009.

SIEGEL S, CASTELLAN N. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1988. p 284-285.

SOUZA, V. M. M.; SIMÕES, M. L. N.; CASTROL, A. P. B.; ARAÚJO, W. N. Anos potenciais de vida perdido e custos hospitalares da leptospirose no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, n. 6, p. 1001-1008, 2011.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Barueri: Ed. Manole, 2003.

TUCUNDUVA DE FARIA. M.; ATHANAZIO D. A.; GONÇALVES, R. E.; SILVA, E.F.; REIS, M.G.; KO A. I. Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental *Leptospira* Infection. *Journal of Comparative Pathology*, v. 137, p. 231–238, 2007.

SEARCY, G.P. Sistema hemopoético. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. (Eds). *Patologia veterinária especial de Thomson*. 2.ed. São Paulo: Artmed, 1998. p.312

STODDARD, R. A. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases, Centers for Disease Control and Prevention*. 2009.

VAN-DEN-INGH, T. S. G. A. M.; HARTMAN, E. G. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae infection in the Syrian hamster. *Veterinary Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 367-376, 1986.

VIEIRA, E.M.; CAMARGO, N.F. 2012. Uso do espaço vertical por marsupiais brasileiros. In CÁCERES, N.C. (Ed.) *Os marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação*. Editora UFMS, 2ª Edição, p. 345-362

VINETZ, J. M. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.14, p. 527- 538, 2001.

WIMBERLY, M. C.; YABSLEY, M. J.; BAER, A. D.; DUGAN, V. G.; DAVIDSON, W. R. Spatial heterogeneity of climate and land-cover constraints on distributions of tick-borne pathogens. *Global Ecology and Biogeography*, v. 17, n. 2, p. 189–202, 2008.

GROOMS, D.L.; BOLIN, C.A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus

and *Leptospira* spp. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.21, n.2, p.463-72, 2005.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. 2003.

YANG, C,W; HUNG C.C., WU, M.S. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cels. *Kidney Int* 2006, v. 69, p. 815-820, 2006.

APÊNDICE A – Certificado de aprovação na Comissão de Ética na Utilização Animais do projeto que foi coletado o tecido renal dos animais.



Universidade Federal de Uberlândia  
- Comissão de Ética na Utilização de Animais -



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO E ISOLAMENTO DE *Leptospira* Spp. PATOGENICA DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, SINANTRÓPICOS E SILVESTRES; E OCORRÊNCIA DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS COHABITANTES EM MUNICÍPIOS DO VALE DO RIO PARANAÍBA", protocolo nº 151/16, sob a responsabilidade de Anna Monteiro Correia Lima – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 24 de março de 2017.

(We certify that the project entitled " EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO E ISOLAMENTO DE *Leptospira* Spp. PATOGENICA DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, SINANTRÓPICOS E SILVESTRES; E OCORRÊNCIA DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS COHABITANTES EM MUNICÍPIOS DO VALE DO RIO PARANAÍBA", protocol 151/16, under the responsibility of Anna Monteiro Correia Lima - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 24th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 24/04/2017. Término: 30/12/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Bovino, Marsupial e Roedor
Número de animais	770
Peso / Idade	80 a 450kg
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Propriedades rurais particulares de municípios do vale do Rio Paranaíba.
Número da Autorização SIBBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 27 de março de 2017.



Prof. Dr. Lúcio Vilala Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFU