

ESTUDO SOROLÓGICO, PATOLÓGICO E MOLECULAR DE LEPTOSPIRA EM CÃES NO MUNICÍPIO DE TERESINA- PI

Elis Rosélia Dutra de Freitas Siqueira Silva (Bolsista PIBIC/CNPq), Kaiulany Nascimento Sousa (Colaborador, UFPI), Larissa Maria Feitosa Gonçalves (Mestre em Ciência Animal-CCA/UFPI), Francisco Assis Lima Costa (Orientador, Departamento Clínica e Cirúrgica Veterinária-CCA/UFPI).

Introdução

A leptospirose é uma zoonose na qual afeta animais domésticos, selvagens e humanos, representando, portanto, um importante problema de saúde pública (FAINE et al., 1999). O cão tem papel importante na transmissão da doença ao homem, devido aos hábitos domésticos e sua estreita relação com os mesmos. No estado do Piauí, há registros da presença de bovinos, caninos, ovinos e humanos reagentes a leptospiros, porém os dados são controversos e pouco esclarecedores.

O presente estudo objetiva detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp. e identificar os sorovares mais frequentes, assim como demonstrar a associação entre as lesões e antígenos de leptospiros no rim, fígado e pulmão de cães provenientes do município Teresina (PI).

Metodologia

Foi realizado um pré-projeto, como forma de verificar se em Teresina (PI) existia cães com infecção por *Leptospira* spp. no qual realizou-se coletas de amostras de sangue de 220 cães colhidas durante o período de julho de 2010 a maio de 2011. Já no projeto, foram colhidas 200 amostras de sangue e após a eutanásia dos animais foram colhidos fragmentos de rim, pulmão e fígado, durante o período de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012. Ambos foram realizados no Centro de Controle de Zoonoses de Teresina. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI, com parecer nº 028/11.

A determinação dos níveis de aglutininas anti-leptospiros foi realizada pela prova de SAM (Soro Aglutinação Microscópica), no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico de São Paulo. O critério adotado para o soro ser considerado como reagente foi de 50% de leptospiros aglutinadas por campo microscópico em aumento de 100 vezes.

Na realização da Técnica Histoquímica, as lâminas foram desparafinadas em xilol e em seguida os fragmentos hidratados em etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% em metanol, por 30 minutos no escuro, após isso, foi realizada lavagem em tampão PBS 0,01 pH 7,2. O desmascaramento de antígeno foi realizado em forno Microondas potencia 10, em solução de Tris Hcl pH 1,0, sucessivamente por 10 e 5 minutos, seguido de lavagem em PBS. As lamínas foram incubadas com anticorpo primário de Imuno- anti-leptospiros produzido no Setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí, diluído a 1:6400 em PBS 0,01 "over night" em câmara úmida a 4°C. A incubação com anticorpo secundário e a amplificação da reação foi realizada com o EnVision em câmara úmida, temperatura ambiente por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com 0,3mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina em PBS com 0,06% de peróxido de hidrogênio e contra-coloração com hematoxilina de Harrys por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas, desidratadas, e montadas com resina sintética.

Os órgãos coletados foram seccionados e fixados em formalina tamponada. Após 48 horas de fixação as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina: desidratação em

séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Os fragmentos tissulares foram seccionados, em micrótomo, na espessura de 5,0 µm e subsequentemente submetidos a coloração com Hematoxilina-Eosina (H_E) e examinados ao microscópio de luz.

Resultados e Discussão

Nos resultados das amostras de soro do pré-projeto, os 220 cães revelaram positividade em 34 (15,4%) amostras. Dentre os reagentes, o sorovar Butembo apresentou maior soroprevalência (4,09%), seguido do Australis (2,27%), Autumnalis (1,82%), Canicola (1,82%), Castellonis (1,82%), Copenhageni (1,36%), Grippytyphosa (0,90%), Icterohaemorrhagiae (0,45%), Shermani (0,45%) e Pomona (0,45%). Já nas amostras do projeto, os 200 cães (100%) revelaram positividade em 40 (20,0%) amostras. Dentre os reagentes, os sorovares Canicola e Australis apresentaram maior soroprevalência (5,0%), seguido do Icterohaemorrhagiae (4,0%), Castellonis (2,0%), Grippytyphosa (1,0%), Copenhageni (0,5%). Fatores topográficos, temperatura, umidade, precipitação pluviométrica e outros fatores ambientais, podem interferir nas avaliações epidemiológicas realizadas a campo (Alves et al., 2000),

Quanto à soroprevalência, o pré-experimento apresentou o sorovar Butembo, que não é adaptado à espécie canina, mas é considerado de grande importância na espécie bovina como confirma Tonin; Azevedo et al. (2010). Já os resultados do projeto revelaram como sorovares mais frequentes, o Canicola e Icterohaemorrhagiae o que confirma os estudos de Bolin (1996).

No exame histológico, o tecido renal revelou infiltrado inflamatório focal peritubular, subcapsular, perivascular, periglomerular, mononuclear caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos e raros neutrófilos predominantemente de intensidade moderada na região cortical, medular e cortico-medular. Nos rins foram observadas atrofia do tufo glomerular, atrofia tubular, presença de cilindros hialinos, glomérulos com espessamento da cápsula de Bowman, proliferação de células glomerulares, aderência do tufo glomerular a cápsula de Bowman dilatação tubular (Figura 1), tumefação celular do epitélio tubular, degeneração e necrose tubular, perivasculite com hipertrofia de endotélio de capilares intersticiais. Nefrite intersticial mononuclear, degeneração e necrose são achados histológicos renais característicos da leptospirose (Ferreira Alves et al. 1987).

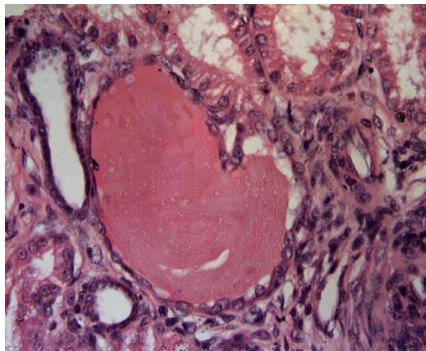
No tecido hepático, havia infiltrado inflamatório periportal e intralobular também constituído por macrófagos e linfócito, hiperplasia de células de Kupffer e desorganização das trabéculas hepáticas. Estas lesões encontradas são semelhantes aqueles encontrados por Oliveira et al. (2005).

No pulmão as lesões foram mais discretas. Poucas amostras apresentaram espessamento do septo alveolar devido ao infiltrado inflamatório mononuclear, polimorfonuclear e fibroblastos de distribuição focal intensidade moderada.

Na imuno-histoquímica, foram selecionados 100 amostras de rim, no qual foram testados os 40 cães soropositivos e 60 cães soronegativos resultantes da técnica de SAM. Dos 100 animais, 90 apresentaram marcação de antígeno para leptospirose na imuno-histoquímica, sendo 36 entre os soropositivos (36/40 – 90%) e 54 entre os soronegativos (54/60 – 90%). Antígeno foi observado em maior intensidade nas células epiteliais tubulares e glomerulares (superfície luminal das células epiteliais tubulares e no endotélio dos capilares glomerulares e intersticiais). A análise

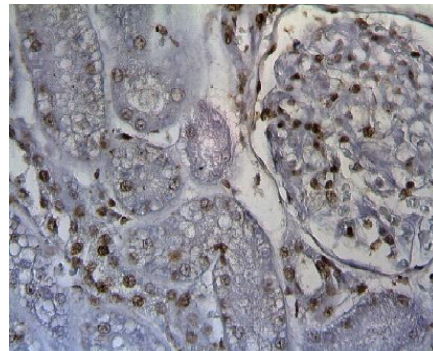
imunistoquímica possibilitou associar as lesões à presença de antígenos e demonstrou maior sensibilidade do que a técnica de SAM. Campos et al.(2011) em seu estudo em suínos, menciona a hipótese de que os animais analisados possivelmente tiveram contato prévio com um sorovar que não fazia parte da coleção de antígenos, o qual foi detectado pela avaliação imunistoquímica, que não é sorovar específica, justificando, assim, o maior número de animais positivos.

Figura 1 – Rim. Cão infectado naturalmente por *Leptospira* spp. Dilatação tubular de intensidade moderada na região cortical. Coloração: HE. Aumento: 140x.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2012

Figura 2 – Rim, Cão. Marcações em células glomerulares e células epiteliais de intensidade moderadamente severa, IHQ, Aumento: 140x.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2012

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram reações soropositivas para *Leptospira* spp. com maior soroprevalência os sorovares Butembo, Canicola, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae, infectando cães em Teresina-PI. As lesões nos órgãos estavam relacionadas à presença do antígeno de leptospiros. Estes resultados confirmam a participação do cão no ciclo infeccioso da leptospirose na cidade de Teresina-PI.

Apoio: PIBIC/CNPq; Centro de Controle de Zoonoses de Teresina (PI).

Referências

ALVES, C.J. et. al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 17-21, 2000.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal**, v. 1, n.3, p.166-171, 1996.

CAMPOS, A. P., et al.; Aglutininas antileptospiras em suínos abatidos para consumo e associação ao comprometimento hepático e pulmonar. **Revista de Patologia Tropical**. v. 40 n.2, p.137-148, 2011

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 3.ed. Melbourne: MediSei, 1999.272 p.

ALVES, V.A., et. Al. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. **Journal of Pathology**. v.15, n.2, p. 125-131, 1987.

TONIN, A. A. et. al.. Leptospirose Bovina: Aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar butembo no rebanho do Estado de Santa Catarina, Brasil.. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 4, p. 294-297, 2010.

Palavras-chave: Leptospira. Cães. Patologia.