



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOFILME RENAL EM RATOS NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEPTOSPIRA INTERROGANS* ATRAVÉS DE TÉCNICAS
HISTOQUÍMICAS E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

ANA AMÉLIA NUNES SANTOS

Salvador - Bahia

2015

CPqGM

ANA AMÉLIA NUNES SANTOS

IDENTIFICAÇÃO DE BIOFILME RENAL EM RATOS NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEPTOSPIRA INTERROGANS* ATRAVÉS DE TÉCNICAS
HISTOQUÍMICAS E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

2015

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOFILME RENAL EM RATOS NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEPTOSPIRA INTERROGANS* ATRAVÉS DE TÉCNICAS
HISTOQUÍMICAS E DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

ANA AMÉLIA NUNES SANTOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow
Co-orientador: Federico Costa

Salvador – Bahia

2015

Folha de Aprovação

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

AGRADECIMENTOS

A Dra. Paula Ristow, minha orientadora, por toda a colaboração com as análises, com a escrita dos textos, por todo o ensinamento e construção em cada etapa do projeto.

Ao Dr. Federico Costa, meu co-orientador, pela colaboração em todas as etapas, em especial, por todo o material disponibilizado e pela valiosa contribuição com as análises estatísticas.

Ao Dr. Eduardo Ramos por todas as análises histopatológicas realizadas com maestria e por todo conhecimento dividido, discutido, repassado.

Ao Dr. Cláudio Figueira pela ajuda na execução do trabalho, aquisição de imagens, e por toda a contribuição com a microscopia eletrônica.

A toda equipe da Plataforma de Microscopia Eletrônica do CPqGM por toda a essencial contribuição. Por compartilhar o espaço físico, o material, o conhecimento, pela contribuição com todas as análises de imagens e por ter nos recebido tão bem, desde sempre.

A toda equipe do Laboratório de Bacteriologia e Saúde – IBIO – UFBA, por todo o fundamental apoio, por todas as discussões e trocas de conhecimento. Em especial a Geórgia França pela contribuição com as análises, Priscyla Ribeiro e Larissa Vasconcelos pelas valiosas contribuições no fechamento da dissertação.

Aos colegas Bruno Bastos e Muller Ribeiro pelas contribuições com as análises estatísticas.

Ao LPBM e Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ), por possibilitar a realização deste trabalho.

A Biblioteca do CPqGM pelas correções finais e contribuições

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>LEPTOSPIRA</i> E BIOFILMES..... | 17 |
| 2.2. EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE..... | 17 |
| 2.3 ANIMAIS RESERVATÓRIOS DE <i>LEPTOSPIRA</i> E TRANSMISSÃO DA LEPTOSPIROSE..... | 18 |
| 2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEPTOSPIROSE..... | 19 |
| 2.5 IMUNOPATOGENIA DA LEPTOSPIROSE..... | 19 |
| 2.6 COLONIZAÇÃO RENAL CRÔNICA POR LEPTOSPIRAS..... | 20 |
| 2.7 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E ESTRUTURAIS NO RIM DE RATOS COM LEPTOSPIROSE..... | 22 |
| 3. OBJETIVOS | 24 |
| 4. ARTIGO | 25 |
| 5. DISCUSSÃO | 46 |
| 6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO | 49 |
| 7. CONCLUSÕES | 50 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXOS | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|---|
| AB | <i>Alcian blue</i> (azul de Alcian) |
| IHQ | imunohistoquímica |
| MCC | microscopia de campo claro |
| MM | Mucicarmim de Mayer |
| PAS | <i>Periodic acid-Schiff</i> (ácido periódico de Schiff) |
| RT-qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real |
| TCP | túbulos contornados proximais |
| VR | vermelho rutênio |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de secção de rim de *Rattus norvegicus* corada por *Warthin-Starry*.

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de tecido renal de rato (*Rattus norvegicus* modelo *Wistar*) cronicamente infectado com *Leptospira interrogans*.

SANTOS, Ana Amélia Nunes. Identificação de biofilme renal em ratos naturalmente infectados por *Leptospira interrogans* através de técnicas histoquímicas e de microscopia eletrônica de varredura, Brasil, 63 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leptospirose é um importante agravo de saúde pública e afeta ao menos um milhão de humanos por ano no mundo. Ratos de esgoto (*Rattus norvegicus*) são os principais reservatórios de leptospirosas patogênicas nas áreas urbanas e excretam, através da urina, elevadas quantidades de bactérias diariamente. As leptospirosas sobrevivem no ambiente e são transmitidas para novos hospedeiros através do contato com mucosas e pele. Leptospirosas patogênicas formam densos biofilmes *in vitro*. A patogênese da leptospirose em reservatórios crônicos é pouco conhecida. **OBJETIVO:** Estudar a formação de biofilme por *Leptospira interrogans* em *R. norvegicus* capturados em uma área hiperendêmica de Salvador, Bahia, Brasil. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Capturamos 86 ratos, dos quais 76 (88,4%) foram considerados portadores de *L. interrogans* através da avaliação por imunohistoquímica (IHQ) anti-*L. interrogans* e/ou Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) utilizando iniciadores específicos para o gene *lipL32*. **RESULTADOS:** Ao exame de IHQ anti-*L. interrogans*, 69 ratos foram positivos. Destes, 24 (35%) apresentaram co-localização dos túbulos contorcidos proximais (TCP) positivos à IHQ anti-*L. interrogans* e ao Alcian blue pH 2,5 (AB). A co-localização positiva confirmou a presença de biofilme no interior dos TCP. A coloração especial pelo Mucicarmim de Mayer (MM) resultou negativa no rim de todos os animais colonizados. A coloração positiva ao AB indicou que a matriz extracelular do biofilme pode ser composta de mucopolissacarídeos ácidos ou alginato; já a coloração negativa ao MM excluiu a composição por mucinas. A microscopia eletrônica de varredura usando vermelho rutênio (VR) revelou densa deposição de matriz extracelular amorfa entre as espiroquetas, indicando composição mucopolissacarídica ou glicoproteica da matriz do biofilme. A média de ratos apresentando túbulos colonizados (TC) com co-localização positiva foi estatisticamente maior do que a média de animais que apresentaram TC mas não apresentaram co-localização ($p=0.0059$), o que demonstra uma associação positiva entre a intensidade de túbulos colonizados e a formação de biofilme. Nenhuma associação significativa para idade, sexo ou local de captura foi identificada para ratos com presença de biofilme renal. O exame histopatológico evidenciou discretas alterações renais em ratos colonizados e com biofilme. **CONCLUSÕES:** A formação de biofilmes por *L.*

interrogans em reservatórios crônicos pode representar um novo mecanismo de virulência na leptospirose. Além disso, esse fenótipo pode interferir no modo de transmissão e sobrevivência de leptospiras no ambiente. Esperamos desta forma contribuir para o conhecimento da patogenia da leptospirose e para o desenvolvimento de novas estratégias para o seu controle.

Palavras-chave: *Rattus norvegicus*, Colonização crônica, Leptospirose, Mucopolissacarídeos, Zoonose.

SANTOS, Ana Amélia Nunes. Kidney biofilm identification in naturally infected rats with *Leptospira interrogans* through histochemical techniques and scanning electron microscopy, Brazil, 63 f. il. Dissertation (Master) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leptospirosis is an important public health problem and affects at least one million people each year worldwide. Norway rats (*Rattus norvegicus*) are the main reservoir hosts of leptospire in urban environments. They excrete large amounts of bacteria daily. Leptospire survive in the environment and are transmitted to new hosts by contact with mucous membranes and skin. Pathogenic leptospire form dense biofilms *in vitro*. The pathogenesis of chronic leptospirosis in reservoirs is largely unknown. The aim of this work was to study biofilm formation by *Leptospira interrogans* in *R. norvegicus* caught in a hyperendemic area in Salvador, Bahia, Brazil. **MATERIAL AND METHODS:** We caught 86 rats, out of which 76 (88.4%) were carriers of *L. interrogans* according to immunohistochemistry (IHC) anti-*L. interrogans* and/or quantitative real time PCR (RT-qPCR) using LipL32 primers. **RESULTS:** From the 69 rats positive for IHC anti-*L. interrogans*, 24 (35%) presented co-localization of proximal tubules concomitantly positive in IHC and Alcian blue (AB) pH 2.5. The positive co-localization confirmed the presence of biofilm in the proximal convoluted tubules. Mayer's Mucicarmine (MM) special staining was negative in all colonized kidneys. AB positive staining indicated that the biofilm extracellular matrix was composed of acid mucopolysaccharides and / or alginate. Negativity to MM excluded the presence of mucins. Scanning electron microscopy using ruthenium red (RR) revealed dense deposition of amorphous extracellular matrix between spirochetes, indicating mucopolysaccharidic and / or glycoprotein composition of the biofilm matrix. The mean of rats presenting colonized tubules (CT) with positive co-localization was statistically greater than the mean of animals presenting CT but without co-localization ($p = 0.0059$), which demonstrated a positive association between the intensity of colonized tubules and biofilm formation. No significant association for age, sex or capture site was found for rats with renal biofilm. Histopathological examination revealed discrete renal alterations in colonized rats with biofilm. **CONCLUSIONS AND STUDY CONTRIBUTIONS:** Biofilm formation by *L. interrogans* in chronic reservoirs may represent a new virulence mechanism in leptospirosis. In addition, this phenotype may interfere with the transmission mode and survival of leptospire in the environment. We hope to contribute to the knowledge of leptospiral pathogenesis and to the development of new control strategies.

Keywords: *Rattus norvegicus*, Chronic colonization, Leptospirosis, Mucopolysaccharides, Zoonosis.

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose infectocontagiosa de grande importância em saúde pública. A doença afeta uma ampla variedade de mamíferos, incluindo o homem, animais domésticos, silvestres e sinantrópicos. Estima-se que ocorram um milhão de casos/ ano de leptospirose humana no mundo atualmente (COSTA et al., 2015c). O principal reservatório urbano da leptospirose no Brasil é o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*). Os ratos são cronicamente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, tornando-se portadores assintomáticos após a colonização de túbulos renais (TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007). *L. interrogans* sorovar Copenhageni é a principal causa de leptospirose grave em indivíduos hospitalizados em Salvador, ressaltando portando a importância do rato como hospedeiro de manutenção deste sorovar (KO et al., 1999).

Pouco se conhece sobre a dinâmica da transmissão de leptospirosas em ratos, no que tange os modos de transmissão, fatores individuais (como sexo e idade) ou fatores ambientais. Estudos acerca da histopatologia renal de ratos infectados por leptospirosas são escassos na literatura. A principal alteração histopatológica encontrada em ratos é a nefrite intersticial, além de alterações mínimas, as quais em geral não são relacionadas à colonização por *Leptospira* spp. (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; FARIA et al., 2008; NALLY et al., 2005). Leptospirosas colonizam intensamente os túbulos contorcidos proximais (TCP) de *R. norvegicus*, indicando que se trata de um local que favorece a sobrevivência bacteriana. Os mecanismos que medeiam a colonização renal e a sobrevivência de *Leptospira* nos rins ainda permanecem pouco compreendidos (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007).

Biofilmes bacterianos estão envolvidos na patogênese de diversas doenças, como na placa dentária polimicrobiana, na colonização pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística, na colonização de feridas cirúrgicas, próteses, sondas e cateteres (BJARNSHOLT et al., 2009; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). Além disso, os biofilmes participam na infecção crônica e persistente de animais reservatórios, como na colonização de pulgas por *Yersinia pestis*, agente da peste, e de carrapatos por *Borrelia burgdorferi*, agente da doença de Lyme (JARRETT et al., 2004; STRICKER; JOHNSON, 2011).

Em estudo prévio identificamos que *R. norvegicus* linhagem Wistar experimentalmente infectados (modelo crônico da leptospirose) apresentaram biofilme em túbulos renais colonizados (dados não publicados). Hipotetizamos, desta forma, que ratos reservatórios naturais cronicamente infectados também apresentem biofilme renal. Acreditamos que a formação de biofilmes por *Leptospira* nos TCP pode ser um mecanismo de colonização e virulência e, quiçá, um mecanismo de evasão imune.

Ratos reservatórios naturais exibem leptospirúria intensa, chegando a eliminação de 10^{10} microrganismos / mL (COSTA et al., 2015b). Tal excreção de leptospiros é garantida pela sua capacidade de leptospiros colonizarem com sucesso os TCP de reservatórios (ATHANAZIO et al., 2008; BHARTI et al., 2003; NALLY et al., 2005). Em outras bactérias, o biofilme fornece proteção contra a desidratação e radiação ultravioleta (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; YANG et al., 2011). A eventual eliminação de fragmentos de biofilme de *Leptospira* pela urina poderia contribuir para a permanência de espiroquetas no ambiente.

Pretendemos nesse estudo demonstrar a presença de biofilme em rins de ratos reservatórios naturais de leptospiros, capturados em área de alta incidência para a leptospirose na cidade de Salvador, Bahia. Além disso, avaliamos a histopatologia renal dos animais e os fatores demográficos relacionados à colonização. Esperamos que o estudo seja relevante para um maior conhecimento sobre a interação *Leptospira*-hospedeiro e sobre a biologia do patógeno, elucidando novos aspectos acerca da patogênese renal em reservatórios naturais da leptospirose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO *LEPTOSPIRA* E BIOFILMES

Espiroquetas do gênero *Leptospira* compreendem 21 espécies genômicas, as quais apresentam graus variáveis de patogenicidade, incluindo espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas. Leptospiras possuem uma grande diversidade antigênica conferida pelo lipopolissacarídeo de membrana externa, originando os mais de 200 sorovares existentes. São microrganismos delgados e de morfologia helicoidal, têm metabolismo aeróbico e apresentam crescimento lento, com tempo de geração em cultura de até 24 horas (ADLER, 2015).

Leptospira interrogans forma biofilmes *in vitro* (RISTOW et al., 2008) e *in vivo* (dados não publicados). Biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, envoltos por matriz exopolimérica produzida pelos próprios microrganismos associados (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; FLEMMING; WINGENDER, 2010). A matriz extracelular é formada por diferentes tipos de biopolímeros, como os exopolissacarídeos, que imobilizam as células do biofilme, deixando-as mais próximas e favorecendo a comunicação célula-célula (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). A matriz funciona também como uma forma de proteção contra ação de biocidas, agentes antimicrobianos, toxinas, radiação ultravioleta, salinidade, desidratação, oxidação e mudanças ambientais, e, ainda, como um mecanismo de escape do sistema imune (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; YANG et al., 2011). Análises por microscopia ótica e microscopia eletrônica de biofilmes de *Leptospira* patogênicas e saprófitas demonstraram emaranhados de bactérias envoltas em material amorfo característico de matriz extracelular (RISTOW et al., 2008). Posteriormente, Ristow e colaboradores (dados não publicados) demonstraram a possível composição da matriz do biofilme de *Leptospira* produzido *in vitro* por sacarídeos aniônicos.

2.2. EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE

A leptospirose tem distribuição mundial e tradicionalmente é considerada uma doença de caráter ocupacional, relacionada a agricultores, tratadores de animais, militares, trabalhadores em sistema de esgoto, e médicos veterinários (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Na China, Europa, Japão e Austrália, devido a associação com o trabalho realizado, a doença foi inicialmente

denominada “icterícia dos plantadores de arroz”, “doença do cortador de cana”, “doença do rebanho suíno” e “doença dos trabalhadores de esgoto” (FAINE et al., 1999).

Em países de clima tropical úmido, como o Brasil, Nicarágua, Índia e Tailândia, a leptospirose tem caráter endêmico. Epidemias de leptospirose ocorrem nestes países em períodos chuvosos, onde as condições de transmissão da bactéria aumentam devido ao alto índice pluviométrico. Adicionalmente ao clima, a doença afeta áreas urbanas de países em desenvolvimento, com condições inadequadas de saneamento e alta infestação de roedores, afetando populações pobres (BHARTI et al., 2003; KO et al., 1999; LEVETT, 2001). Esporadicamente, em países de clima temperado, ocorrem surtos de leptospirose após a prática de atividades aquáticas esportivas ou de lazer, envolvendo exposição em água doce de lagos ou rios (MCBRIDE et al., 2005).

Estima-se que ocorram aproximadamente 1.000.000 de casos de leptospirose no mundo por ano (COSTA et al., 2015). No Brasil, entre 1999 e 2003 foram confirmados 14.334 casos de leptospirose, com uma média anual de 2.866 casos. Nesse mesmo período foram notificados 1.683 óbitos, numa média de 336 óbitos/ano, com taxa de letalidade de 12% e incidência de 1,7/100 mil habitantes (BRASIL, 2006).

2.3 ANIMAIS RESERVATÓRIOS DE *LEPTOSPIRA* E TRANSMISSÃO DA LEPTOSPIROSE

Mamíferos domésticos e selvagens são infectados por diferentes espécies de leptospiros, podendo ser sensíveis à infecção e desenvolver formas clínicas agudas, ou desenvolver formas crônicas e/ou assintomáticas, tornando-se reservatórios e portadores do agente (LEVETT, 2001; MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009). Os reservatórios são frequentemente infectados por sorovares específicos de *Leptospira*, demonstrando haver especificidade hospedeiro-sorovar. Alguns exemplos são: ratos infectados por *Leptospira interrogans* sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, bovinos infectados pelo sorovar Hardjo, suínos infectados pelo sorovar Pomona, e caninos infectados pelo sorovar Canicola.

Os mamíferos reservatórios de leptospiros são colonizados pela bactéria nos rins e a eliminam na urina, contaminando o ambiente. A transmissão para novos hospedeiros ocorre por contato direto de mucosas ou pele lesionada com urina, sangue ou tecido de um animal infectado; ou indireto através do ambiente contaminado, devido à capacidade do microrganismo em sobreviver fora do hospedeiro (LEVETT, 2001). Já o homem é um hospedeiro incidental da leptospirose, sendo susceptível à doença (LEVETT, 2001). Roedores são os principais reservatórios da leptospirose. No mundo, o *Rattus norvegicus* (rato de esgoto ou rato marrom) é o principal reservatório urbano da doença. No

Brasil, *Rattus norvegicus* está adaptado a leptospiras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, principalmente à *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (FARIA et al., 2008). *R. norvegicus* apresenta densa colonização crônica renal, sem manifestações clínicas aparentes consequentes à infecção.

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEPTOSPIROSE

Animais reservatórios desenvolvem leptospirose crônica e geralmente assintomática. Animais de produção (bovinos, ovinos, suínos) podem desenvolver distúrbios reprodutivos crônicos. Por outro lado, cães geralmente desenvolvem doença aguda caracterizada por falência renal, hepática e distúrbios hematológicos (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

As manifestações clínicas da leptospirose no homem são variáveis, envolvendo as formas: assintomática, oligossintomática (início súbito de febre, cefaleia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, artralgia, hiperemia ou hemorragia conjuntival, fotofobia, dor ocular e tosse), e graves (Síndrome de Weil e Síndrome Pulmonar Hemorrágica da Leptospirose - SPHL). A Síndrome de Weil é caracterizada por falência hepática, falência renal aguda e hemorragias, com taxas de letalidade de até 10% (MCBRIDE et al., 2005). Nos últimos anos, diversas regiões do mundo têm presenciado a emergência da SPHL, uma forma fulminante da doença, que requer hospitalização com tratamento intensivo que apresenta taxas de letalidade de até 50% (GOUVEIA et al., 2008).

2.5 IMUNOPATOGENIA DA LEPTOSPIROSE

Após a penetração de leptospiras no organismo hospedeiro, segue-se um período de bacteremia (três a sete dias). Como consequência as leptospiras se disseminam para os mais variados tecidos, como pulmão, olhos, musculatura, entre outros. Esta fase inicial da doença é denominada não-imune, por haver pobre resposta imunológica ao patógeno (ATHANAZIO et al., 2008; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Leptospiras possuem mecanismos de evasão do sistema imune, a exemplo da evasão do sistema complemento (BARBOSA et al., 2009) e da resistência à fagocitose (WANG et al., 1984). São bactérias extremamente móveis e possuem a capacidade de realizar translocação celular, o que pode auxiliar na infecção célula-célula (BAROCCHI et al., 2002). Posteriormente, ocorre a fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra as leptospiras. Em seguida, observa-se o desaparecimento das bactérias na maioria dos tecidos e a sua

presença em órgãos alvo (principalmente rins e fígado), gerando a sintomatologia característica das doenças aguda ou crônica (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001).

2.6 COLONIZAÇÃO RENAL CRÔNICA POR LEPTOSPIRAS

Uma das maiores investigações do estado de portador em ratos capturados foi realizada em Detroit, Estados Unidos, e revelou que na população estudada de 358 animais, 75% apresentaram cultura renal positiva, 92% apresentaram positividade na coloração pela prata em tecido renal e 90% tinham títulos elevados na microaglutinação sorológica (Thiermann, 1977). Andrade e Oliveira (1954) capturaram ratos em Salvador e realizaram investigação para a presença de leptospiros no tecido renal usando a técnica de impregnação pela prata de Levaditi, identificando colonização renal em 29,25% dos animais. De Faria (2008), em estudo realizado também em Salvador, demonstrou que 80,3% de *R. norvegicus* capturados tiveram cultura positiva para *Leptospira*, sendo que cerca de 65% dos ratos obtiveram títulos altos de anticorpos contra o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* no teste de microaglutinação sorológica (FARIA et al., 2008).

A patogênese renal da leptospirose ainda não é bem compreendida. Ao infectar os túbulos renais de animais reservatórios, as leptospiros aderem-se ao epitélio renal e multiplicam-se, colonizando o órgão de forma persistente (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009). A colonização crônica renal causada por *Leptospira* é dividida em duas fases: intersticial e tubular. A primeira é caracterizada pela migração das leptospiros por via hematogênica, do endotélio para o interstício renal. A segunda caracteriza-se por intensa associação das bactérias com os TCP (figuras 1 e 2) (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009).

Na colonização renal crônica em ratos observa-se densos agregados de leptospiros nos TCP (ATHANAZIO et al., 2008; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007). A cronicidade da infecção por leptospiros nos rins de reservatórios indica tratar-se de um local imunoprivilegiado. As hipóteses formuladas por Monahan e colaboradores (2009) sobre as estratégias de evasão imune das leptospiros nos rins incluem: (1) diferenças nos perfis de antígenos expressos na membrana externa de *Leptospira*, evidenciado por distribuição heterogênea de infiltrados inflamatórios nos rins; (2) o atraso no aparecimento de infiltração de linfócitos dos rins; (3) anticorpos anti-*Leptospira* nos túbulos renais podem não desencadear a morte bacteriana, por causa de possível ausência do sistema complemento. Uma outra forte hipótese para a permanência das leptospiros nos TCP e evasão do sistema imune é a formação de biofilme neste local (RISTOW et al., 2008).

Quanto à presença ou não de imunoglobulinas no TCP, moléculas de peso molecular inferior ao da albumina (isto é, 68 kDa) passam pelo filtro glomerular e chegam ao TCP. A barreira de

filtração glomerular é constituída por células endoteliais, membrana basal glomerular e células epiteliais viscerais (também conhecidos como podócitos) (KURTS et al., 2013). Imunoglobulinas G tem tamanho aproximado de 150 KDa, sendo pouco provável que passem para os TCP na ausência de lesão.

Acredita-se, ainda que haja algum tipo de receptor específico para as leptospiros nos TCP. Proteínas de *Leptospira*, como OMPs (*Outer membrane protein*) e a hemolisina LipL32, interagem com os receptores do tipo *Toll 2* (TLR-2) da célula epitelial renal, levando a uma resposta imune inicial (YANG, 2007). Ainda, uma glicoproteína interage com a bomba sódio/potássio ATPase do epitélio renal, inativando a sua função (LACROIX-LAMANDÉ et al., 2012). Tais fatores podem explicar o tropismo das leptospiros para os túbulos renais, assim como favorecer a sua sobrevivência neste local.

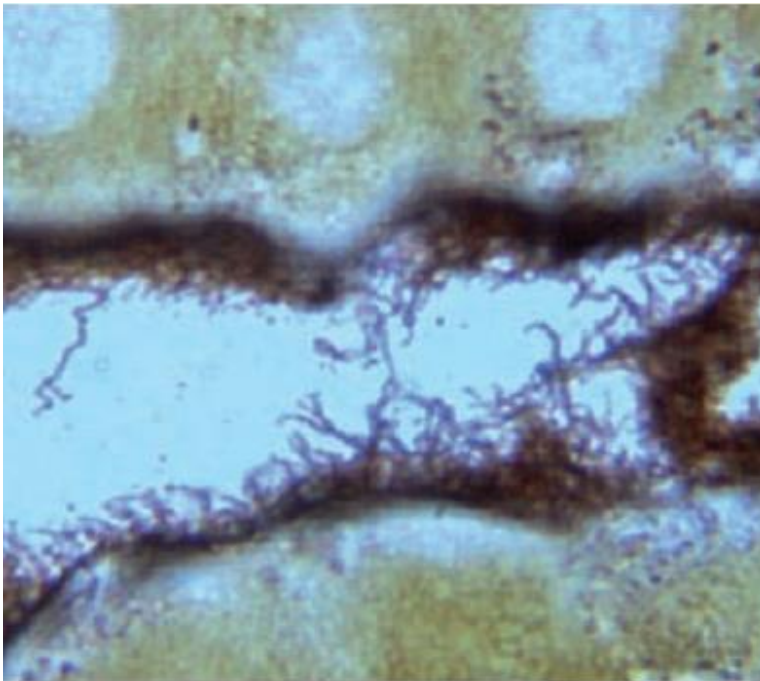


Figura 1: Fotomicrografia de secção de rim de *Rattus norvegicus* corada por *Warthin-Starry*. Leptospiros são visualizadas como estruturas filamentosas impregnadas pela prata no lúmen dos túbulos renais (magnificação, 400x). Fonte: KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009.

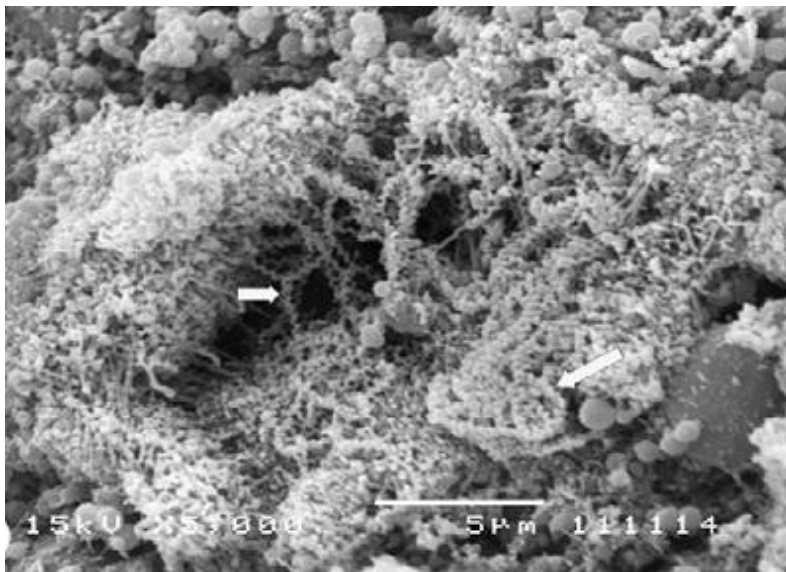


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de rim de rato (*Rattus norvegicus* modelo *Wistar*) cronicamente infectado com *Leptospira interrogans*. O túbulo renal contém elevada densidade de leptospiros formando aglomerados (seta pequena). A seta grande indica leptospiros aderidas à superfície tubular interna, expostas pela fratura do tecido (magnificação, 5000x). Fonte: ATHANAZIO et al., 2008.

Quanto à presença de biofilme *in vivo*, padronizamos recentemente uma metodologia para identificar biofilmes em rins de *R. norvegicus Wistar* experimentalmente infectados, a qual baseou-se na identificação concomitante de TCPs positivos à IHQ anti-*Leptospira interrogans* e a colorações para identificação de sacarídeos (AB para evidenciar mucopolissacarídeos e PAS, substâncias mucoides neutras) (dados não publicados). Usando esta mesma metodologia, realizamos um estudo piloto com 17 *R. norvegicus* selvagens capturados nos bairros de Pau da Lima e Sete de Abril, áreas hiperendêmicas para a leptospirose em Salvador. Em quatro casos foi possível observar a co-localização de leptospiros e a marcação positiva para PAS em túbulos renais, sugerindo a presença de biofilme nos TCPs de um terço dos animais estudados (dados não publicados).

2.7 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E ESTRUTURAIS NO RIM DE RATOS COM LEPTOSPIROSE

O conhecimento sobre as lesões microscópicas em rins de ratos naturalmente ou experimentalmente infectados é limitado (ATHANAZIO et al., 2008; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007). Os poucos estudos que realizaram exames histopatológicos renais em ratos urbanos capturados colonizados por leptospiros relataram que a nefrite intersticial foi a principal alteração atribuída à infecção (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; THIERMANN, 1981; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007). Nos tecidos são encontrados discretos infiltrados de leucócitos e plasmócitos e

ausência de infiltrado neutrofilico, sugerindo que leptospiras não estimulam fortemente o sistema imune tecidual, diferentemente de outras bactérias Gram negativas (FAINE et al., 1999).

Sterling e Thiermann (1981) demonstraram, através de microscopia eletrônica de transmissão, leptospiras completamente aderidas à superfície luminal dos TCP. Não foram observadas leptospiras nos túbulos distais e algumas raras espiroquetas foram identificadas no citoplasma da célula do TCP, imediatamente abaixo da borda em escova. Em ratos com respostas sorológicas mais intensas, foi observado edema intersticial, espessamento da membrana basal dos TCP, que assumia aspecto reticulado e por vezes com focos de partículas granulares (possivelmente, depósitos de imunocomplexos) e focos de infiltrado inflamatório de plasmócitos, linfócitos e histiócitos (THIERMANN, 1981).

Laurain (1955) demonstrou em onze ratos capturados a presença de nefrite intersticial leve. Porém, apenas em um deles a infecção por *Leptospira* foi comprovada através da impregnação pela prata. De Faria e colaboradores (2007) observaram em 45 ratos capturados a presença de lesões como glomerulonefrite proliferativa focal segmentar mesangial, necrose tubular e degeneração tubular hialina-goticular; entretanto, somente a nefrite intersticial foi atribuída à infecção por *Leptospira*. Flórez e colaboradores (2013) capturam 254 *Rattus norvegicus* e observaram alterações histopatológicas em 51 animais, sendo a nefrite intersticial a alteração mais comum.

Outros fatores podem induzir a lesões tissulares em ratos selvagens urbanos, como a exposição a outros agentes etiológicos (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007) não sendo possível, nesses estudos, determinar a relação dessas alterações com a colonização por leptospiras. O fato de que os animais estão constantemente expostos a diversas agressões em seu ambiente leva a uma maior dificuldade em atribuir as alterações encontradas exclusivamente à infecção por leptospiras.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral: identificar a formação de biofilme e avaliar as alterações histopatológicas na colonização renal por *Leptospira em Rattus norvegicus* capturados em área urbana de Salvador, Bahia.

Objetivos específicos:

- Identificar a formação de biofilme por *Leptospira* nos rins de *R. norvegicus* através de técnicas histoquímicas
- Descrever os achados histopatológicos renais e avaliar associações com a presença de biofilme e com diferentes padrões de colonização;
- Avaliar se a presença de biofilme, os padrões histopatológicos, ou a carga infectante estão associados às diferenças demográficas e/ou geográficas dos roedores estudados.

4. ARTIGO

O artigo a seguir aborda exclusivamente os resultados e conclusões gerados na Dissertação de Mestrado. O artigo encontra-se escrito em inglês e será submetido para publicação em periódico científico.

Leptospiral Biofilm formed by Anionic Saccharidic Moieties is a Frequent Phenotype in Kidney Colonization of Natural Reservoir Rats

Ana Amélia Nunes Santos^{1,2}, Eduardo Antônio Gonçalves Ramos², Geórgia Virgínia da França¹, Cláudio Pereira Figueira³, Mitermayer Galvão dos Reis², Federico Costa^{4,5,6}, Paula Ristow^{1α}

¹Laboratory of Bacteriology and Health, Biology Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;

²Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil;

³Electronic Microscopy Platform, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, BA, Brazil;

⁴Public Health Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

⁵Epidemiology and Biostatistics Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil.

⁶Division of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, Connecticut, USA.

*Corresponding author e-mail: paularistow3@gmail.com

αCurrent address:

Laboratory of Bacteriology and Health

Institute of Biology

Federal University of Bahia

Rua Barão de Geremoabo, 147

40170-290

Salvador, Bahia

Brazil

Abstract

Leptospirosis is an important public health problem and affects at least one million people each year worldwide. Norway rats (*Rattus norvegicus*) are the main reservoir hosts of leptospires in urban environments, excreting huge amounts of pathogenic leptospires in the environment daily. These spirochetes are able to survive in the environment and are transmitted through contact, making at least 1 million victims per year. Pathogenic *Leptospira* form densely packed biofilms *in vitro*. The pathogenesis of leptospirosis in chronic reservoirs is poorly understood. We aimed to study biofilm formation by *Leptospira interrogans* in *R. norvegicus* captured from a hyperendemic slum site in Salvador, Bahia, Brazil. We caught 86 rats, out of which 76 (88.4%) were carriers of *L. interrogans* according to immunohistochemistry (IHC) anti-*L. interrogans* and/or quantitative real time PCR (RT-qPCR) using LipL32 primers. From the 69 rats positive for IHC anti-*L. interrogans*, 24 (35%) presented co-localization of proximal convoluted tubules (TCP) concomitantly positive in IHC and Alcian blue (AB) pH 2.5. The positive co-localization confirmed the presence of biofilm within the TCP. Mayer's Mucicarmine (MM) special staining was negative in all colonized kidneys. AB positive staining indicated that the biofilm extracellular matrix was composed of acid mucopolysaccharides and / or alginate. Negativity to MM excluded the presence of mucins. Scanning electron microscopy using ruthenium red (RR) revealed dense deposition of amorphous extracellular matrix between spirochetes, indicating mucopolysaccharidic and / or glycoprotein composition of the biofilm matrix. The mean of rats presenting colonized tubules (CTs) with positive co-localization was statistically greater than the average of animals with CTs but without co-localization ($p=0.0059$), demonstrating a positive association between the intensity of colonized tubules and biofilm formation. No significant association for age, sex, or capture site was found for rats presenting renal biofilm. We noticed minimal histological alterations for rats colonized with leptospiral biofilms. Unraveling the formation of biofilms by *Leptospira* in chronic reservoirs may impact in the mode we comprehend pathogenic mechanisms in leptospirosis, transmission, and survival of leptospires in the environment.

Key words: *Rattus norvegicus*, chronic colonization, leptospirosis, mucopolysaccharides, zoonosis.

Introduction

Leptospirosis is a global public health problem (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009) with estimated annual incidence exceeding 1 million cases (COSTA et al., 2015b). The highest incidence

of leptospirosis occurs in developing countries of tropical regions during rainy seasons. There has been an emergence of leptospirosis in urban settings worldwide in the last decades, related to poor urban development and poor sanitation (COSTA et al., 2015b; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). *Rattus norvegicus* is the major carrier in urban settings and excrete spirochetes in urine, contaminating the environment (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Leptospirosis can severely affect humans, which develop Weil's Syndrome characterized by hepatic failure, renal failure and hemorrhages, with a mortality rate of 10% (MACIEL et al., 2008). Furthermore, humans can also present a more severe disease form, the Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome (SPHS), which has a mortality rate of up to 70% (MACIEL et al., 2008).

Leptospira comprehend pathogenic, intermediate and saprophytic species, with more than 200 serovars. They are aerobic nutrient-exigent bacteria found in mammal hosts and in water collections in the environment, where they can survive. Only pathogenic species can colonize the kidneys of mammals. Leptospire form dense aggregates in the renal tubules of rat reservoirs, in water and in *in vitro* liquid cultures (FARIA et al., 2008; TRUEBA et al., 2004; ZUERNER; ALT; PALMER, 2012). We have previously demonstrated that pathogenic and saprophytic leptospire form densely packed biofilms *in vitro* (RISTOW et al., 2008). Recently, Brihuega and collaborators (2012) demonstrated that low passage pathogenic *L. interrogans* serovar Pomona isolated from swine abortion was able to form biofilms *in vitro* in abiotic supports. So far, there is no evidence of leptospiral biofilm formation in natural reservoirs.

Biofilms are the most common mode of growth of prokaryotes. They are formed by a community of microorganisms attached to a surface and involved by an exopolimeric matrix produced by themselves (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Bacterial biofilms are associated with many medical chronic conditions such as cystic fibrosis pneumonia, dental plaque and catheter contamination (BJARNSHOLT et al., 2009). They also play an important role in colonization of chronic reservoirs, contributing to disease transmission, like biofilms formed by *Yersinia pestis* in the midgut of fleas (HINNEBUSCH; ERICKSON, 2008).

Rats captured in hyperendemic areas are highly colonized by leptospire in their kidneys. It is estimated that they may excrete more than 10^{10} bacteria in the environment per day (COSTA et al., 2015a). It remains unknown, however, why leptospire find the kidneys a safe place for colonization. It may be an immune privileged site (MONAHAN et al. 2009). Nevertheless, it is important to consider the hypothesis of biofilm formation inside the rat renal tubules. We aimed to identify *Leptospira interrogans* biofilms in the kidneys of *Rattus norvegicus* natural reservoirs captured from

a hyperendemic slum site in Salvador, Bahia, Brazil. We also aimed to characterize the renal histopathology and the demography of studied animals.

Methods

Study sites and animals

The methodology used has been previously described (COSTA et al., 2015b). Briefly, from May 2013 to August 2014, we captured 86 Norway rats (*Rattus norvegicus*) in Pau da Lima, Salvador, Bahia, Brazil, an urban setting with high incidence of severe leptospirosis. The study site comprised an area of 0,17 Km² with four valleys (FELZEMBURGH et al., 2014). It was systematically sampled by setting two Tomahawk live traps at each of 108 sampling points (COSTA et al., 2014).

Rats were euthanized, sex and weight were recorded, and we used mass/weight as a proxy for estimating rat's age (COSTA et al., 2014). We recorded the capture site and entered/validated demographic data in *Redcap* database. Rats were divided into six groups (table 1) according to mass and sex: juvenile males (≤ 200 g), juvenile females (≤ 200 g), sub-adult males (201–399 g), sub-adult females (201–399 g), adult males (≥ 400 g), and adult females (≥ 400 g). During necropsies we collected rat kidneys, the right kidney was preserved in 10% buffered formalin and further processed for histotechnology; the left kidney was divided, half was preserved in -80°C (COSTA et al., 2015a) and the other half was processed for electronic microscopy as described below.

This work was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Oswaldo Cruz Foundation (Salvador, Brazil; protocol number 003/2012).

Histopathological processing

Kidneys were embedded in paraffin wax, blocks were cut in 2- μ m serial sections, and processed, in the following order: (1) hematoxylin-eosin (HE); (2) immunohistochemistry (IHC) anti-*Leptospira interrogans*; (3) periodic acid-Schiff stain (PAS); (4) PAS Silver Methenamine (PAS-M); (5) Alcian Blue pH 2.5 (AB); (6) Mayer's Mucicarmine (MM); (7) AZAN; and (8) Picrosirius Red (PIFIG). HE, PAS, PAS-M, AZAN and PIFIG were used to analyze pathologic alterations and performed according to routine protocols. A histopathology questionnaire was applied including the

following parameters: injury degree, tissue degeneration, and characteristic of inflammatory cells. AB and MM were used to identify polysaccharidic extracellular matrix and are described below.

All light microscopic observations in this work were performed using an Olympus BX51 optical microscope with objectives of 20x and 40x. Image acquisition was performed using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, USA).

*Immunohistochemistry (IHC) anti-*Leptospira interrogans**

Leptospira colonization was screened by both specific IHC anti-*L. interrogans* and quantitative real-time PCR (RT-qPCR, described below). IHC was performed according to CRODA et al. (2008), with the following modifications: slides were blocked with 10% skimmed milk in 1× Phosphate Buffered Saline and incubated with rabbit primary antibodies anti-*Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA diluted 1:1,000 at room temperature for 1 h. Rats negative for IHC anti-*L. interrogans* were used as negative controls.

Quantitative real-time PCR of kidneys (RT-qPCR)

Quantitative real-time PCR was performed strictly as described by COSTA et al. (2015a). DNA was extracted from 25 mg of frozen kidney. DNA extraction was performed using automated Maxwell 16 System DNA Purification Kits (Promega Corp., USA). RT-qPCR specific for pathogenic leptospires was performed using 5' nuclease (Taq-Man) and primers that amplified a sequence of *lipL32* (STODDARD et al., 2009). RT-qPCR was performed using an ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Histological special stains for carbohydrates used for biofilm detection

Biofilm presence was assessed through special staining for carbohydrates, according to the previous literature (HOFFMANN et al., 2005; BJARNSHOLT et al., 2009). AB pH 2.5 stains acidic mucopolysaccharides, sulfated and carboxylated sialomucins, and alginate. MM stains neutral and acidic mucins. Both stainings were performed according to routine protocols. Once we identified positive renal tubules in IHC anti-*L. interrogans*, we then performed the co-localization of the same tubules concomitantly positive for carbohydrate specific stainings, in serial renal sections. Besides the co-localization, renal tubules with positivity in AB but without co-localization were also considered to

have biofilms, since negative controls did not stain positive with AB. A total of ten negative controls were analyzed.

Leptospiral colonization and IHC marking patterns in rat kidneys

We analyzed different patterns of kidney leptospiral colonization and IHC marking by determining: (1) the intensity of colonization, (2) the distribution of colonized tubules (CTs), and (3) intraluminal marking (SANTOS et al., 2015). Each renal section was divided longitudinally in two halves. The intensity of colonization was evaluated by counting the number of CTs marked in IHC anti-*L. interrogans* of the convex half of the kidney (opposed to the renal pelvis). This information generated the variable “number of colonized tubules” (denominated *CT count*), considered to be a quantitative measurement of infection.

To evaluate the distribution of CTs in the kidney, we performed a qualitative evaluation registering if CTs were observed in the cortex isolated (one CT), agglomerated (two or more CTs), with focal or multifocal distribution.

Tubular intraluminal IHC marking was evaluated by qualitative analysis considering two patterns: kidney tubules that presented IHC marking restricted to the renal epithelial membrane (partial occlusion of the CT) or tubules that presented IHC marking both restricted to the renal epithelial membrane and completely occluding the lumen of CT (partial/complete occlusion of the CT).

Electronic microscopy using ruthenium red probe

Fresh half kidneys were cut in 1-2 mm cubes using a sterile scalpel, added to 1.5 mL fixation buffer (2% glutaraldehyde/0.1 M sodium cacodylate) and kept at 4°C until processing. Then, samples were transferred to new tubes containing 1.5 mL fixation buffer and added with 0.2% ruthenium red (RR), a probe used to augment the retention of anionic exopolysaccharides in samples. The kidney from one negative control rat was added to fixation buffer without RR. Samples were washed in 0.1 M cacodylate and re-fixed in 1% osmium tetroxide/0.2 M sodium cacodylate for one hour. Then, samples were washed and gradually dehydrated in acetone, followed by critical point dry, gold metallization, and subsequent observation in a JEOL 6390LV microscope (Japan).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Epi Info™ 7. Analyses comprised 2-tailed Student's t-tests for comparing group means of patterns of kidney leptospiral colonization, intensity of colonization, the distribution of colonized tubules, and the patterns of intraluminal marking. Chi-square tests were used for evaluating associations between categorical variables within positive animals (by IHC and/or qRT-PCR) and demography characteristics (sex, age or capture site); the proportions of animals presenting renal biofilm within sex, age or capture site; the proportions of rats presenting renal biofilm with pathological alterations; the associations between the presence of biofilm and the different renal colonization patterns. When group sizes were 5 or less, Fischer's exact tests were used.

Results

Natural reservoir rats present anionic polysaccharidic biofilm in the kidneys

From the 86 *R. norvegicus* studied, 76 (88.4%) were colonized with pathogenic *Leptospira* according to positivity to IHC anti-*L. interrogans* and/ or qRT-PCR. Ten rats (11.6%) were negative for both techniques, and were used as controls (table 1). There were no statistically significant differences for leptospiral infection related to capture site, sex or age of the animals.

Rats with kidneys positive for IHC anti-*L. interrogans* (n=69) were evaluated for the presence of biofilm, using the staining methods AB and MM. From those, 28 (41%) were positive for AB and none was positive for MM staining. Using the co-localization technique, 24 (35%) animals presented proximal tubules concomitantly positive for IHC anti-*Leptospira* and AB, confirming the presence of polysaccharidic matrix and biofilms inside the renal tubules (Figure 1). Additionally, four (4) kidneys presented tubules positive for AB, but with no co-localization. Negative controls were negative for both AB and MM. We used as positive controls standard sections of dog intestine, which were positive for both AB and MM (data not shown). AB pH 2.5 stains acidic mucopolysaccharides, alginates, and mucins, suggesting the participation of one of these components in the matrix of the biofilm. However, the lack of staining for MM indicates that there were no mucins in the samples.

Biofilm matrix is labeled by ruthenium red in scanning electron microscopy

Scanning Electron Microscopy (SEM) of kidneys from chronically infected rats demonstrated dense colonization by leptospires, forming aggregates inside the tubules (Figure 2). When we added

ruthenium red (RR), we observed heavy deposition of amorphous extracellular matrix between spirochetes, often covering the entire surface of bacteria, compatible with biofilm morphology (Figure 2).

Demography of rats presenting kidney colonization with biofilms

Rats captured in the valley 4 of the study site showed an increased probability (47.3%) to present biofilm in colonized tubules (based on positive co-localization), when compared to animals captured in the valleys 1 (18.1%) or 2 (16.7%), although it was not statistically significant. Sub-adult animals showed an increased tendency to develop renal biofilm (62.5%) when compared to juvenile (20.8%) or adult rats (16.7%) (not statistically significant). We observed a homogeneous distribution between males and females for the presence of renal biofilms. Animals with kidneys positive for AB pH 2.5 but with no co-localization (n=4) have not shown statistical differences related to age, sex or capture site.

Renal biofilm is related to colonization intensity and to the distribution pattern of colonized tubules

We analyzed three patterns of leptospiral colonization in rat kidneys, according to intensity, distribution and intraluminal marking of CTs (SANTOS et al., 2015). As for the intensity of colonized tubules, there was wide variation between individuals, with minimum of 1 CT and maximum of 612 CTs, and median of 88 (interval interquartile range, 18 to 255 CTs) (Figure 3, A and B). The average of animals presenting CTs with positive co-localization was statistically greater than the average of animals presenting CTs without co-localization (p value=0.006), demonstrating that there was a positive association between the intensity of colonized tubules and biofilm formation. There were no significant results for the relationships between intensity of colonization and demographic data.

The majority (n=59, 85.6%) of colonized animals presented a distribution pattern of multifocal CTs in the renal cortex, isolated or agglomerated (Figure 3, E and F). 87.5% of rats presenting biofilm (n=21) had agglomerated CTs in a multifocal distribution (p=0.0002, Chi-square corrected Yates). There were no association between the different patterns of distribution and demographic data.

Most of the colonized rats (n=41, 59.4%) presented IHC *anti-L. interrogans* marking restricted to the membrane of renal epithelial cells, characterizing partial occlusion of CTs. 28 rats (40.6%) presented a pattern of partial to complete occlusion of CTs (Figure 3, C and D). From the 24 rats presenting renal biofilm, the majority (n=15, 62.5%) presented IHC *anti-L. interrogans* marking

pattern of partial/complete occlusion of CTs. There were no correlations between the patterns of IHC marking and demographic data.

Biofilm production does not account for histopathological lesions in the kidney tissue

Histopathological analysis revealed minimal pathological alterations (Table 2). Discrete interstitial nephritis was the most frequent finding, present in 28.9% of positive animals (Table 3). There was no positive association between biofilm formation and histopathological alterations.

Discussion

In this study we aimed to identify leptospiral biofilm in the kidneys of *Rattus norvegicus*. From the 69 *R. norvegicus* positive for IHC anti-*L. interrogans*, 41% were positive for AB staining and 35% presented positive co-localization, indicating the presence of renal biofilm in these rats. Bacterial biofilms are considered a colonization and virulence factor (PARSEK; SINGH, 2003) and this represents a new finding on the pathogenesis of leptospiral colonization in natural reservoirs. Our results are in accordance with a preliminary study we conducted in 2012, with a reduced number of *R. norvegicus* (n=17) captured from the same study site, when we observed that one third of animals presented positive co-localization and renal biofilm (non published data). The spirochete *Borrelia burgdorferi* form organized biofilm-like aggregates in the thick midgut (DUNHAM-EMS et al., 2009). Biofilms also participate in the chronic infection of fleas' vectors of *Yersinia pestis*, the agent of pestis, with a possible role in transmission (HINNEBUSCH; ERICKSON, 2008; JARRETT et al., 2004). When biofilm was present in the kidney, not all the colonized tubules presented biofilms. Other studies of biofilm formation in animal reservoirs were also qualitative and there was no measure of the frequency of this phenotype in the infected organ (JARRET et al., 2004).

The biofilm inside the proximal tubules stained by AB and did not stain by MM, indicating that the matrix exopolysaccharides is not composed by mucins, but most probably by acidic mucopolysaccharides or alginate. AB is a macrocyclic compound, mainly used to detect the presence of acidic mucopolysaccharides, turning blue when positive stained. In pH 2.5, it mainly stains sulfated and carboxylated acidic mucopolysaccharides (CARSON e HLADIK, 1997), although it may stain other saccharides. It is regularly used to identify biofilms in tissues, as it was previously shown in lungs colonized by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms (BJARNSHOLT et al., 2009; HOFFMANN et al., 2005). SEM using ruthenium red (RR) revealed the ultrastructure of the tubular biofilms with

agglomerates of *Leptospira* evolved in an anionic exopolysaccharidic matrix (confirming the results obtained with AB). RR was previously used to identify numerous bacterial biofilms (BORUCKI et al., 2003; MOE et al., 2010; LOURENÇO et al., 2013).

Mucopolysaccharides or glycosaminoglycans are evolved in biofilm formation. Mack and collaborators (1996) showed that *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin (PIA) is formed by a linear b-1,6-linked glucosaminoglycan. Additionally, hyaluronic acid supported biofilm growth of *Streptococci in vitro* (YADAV et al., 2013). Alginate is composed of mannuronic and guluronic acids. Previous studies have showed that alginate is the exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms (BJARNSHOLT et al., 2009; HOFFMANN et al., 2005; MAY et al., 1991) Recently, Sapi and collaborators (2012) have shown *in vitro* that the biofilm exopolysaccharidic matrix of *B. burgdorferi* contains alginate. *Leptospira* spp. possesses genes related to alginate biosynthesis (RISTOW et al., 2008) and it is possible that this polysaccharide participate on biofilm composition and metabolism.

From the 86 captured animals, 88.4% were colonized with *Leptospira interrogans*, in agreement with the positivity rate previously described for this population (COSTA et al., 2015). Most of the *Leptospira*-colonized animals in this study were young sub-adult females. We found that sub-adults (with no distinction of males or females) had an increased chance to develop biofilm. Rats are colonized very early in life (COSTA et al., 2015) and it is hypothesized that leptospirosis may be transmitted vertically. Then, it is expected that sub-adult animals have leptospiral colonization, and, as a consequence, biofilm formation. We also observed a trend towards rats presenting renal biofilm and the capture site (valley 4).

The intensity of colonization varied greatly among individuals, independently of age, sex or capture site, as previously described by our group (SANTOS et al., 2015). However, we noticed an important positive correlation between the intensity of colonized tubules and biofilm formation. If we consider the number of CT as a measure of the population of *Leptospira* in the organ, this finding may indicate that biofilm formation by *Leptospira in vivo* is dependent on leptospiral numbers, suggesting the presence of some kind of quorum sensing mechanism (LI; TIAN, 2012). However, the bacterial load evaluated by qRT-PCR did not show relation with biofilm formation.

The most common presentation of *Leptospira*-colonized kidneys in IHC anti-*L. interrogans* was marking restricted to the membrane of renal epithelial cells (partial occlusion of CT). In a previous study, we found that half of the colonized rats presented this type of marking (SANTOS et al., 2015). The other half presented IHC-marking occluding the tubular lumen, in accordance with the previous literature (ATHANAZIO et al., 2008). Nonetheless, the majority of animals presenting biofilm had a marking pattern of IHC anti-*L. interrogans* of partial/complete occlusion of CTs. This

data may indicate that the more one CT is colonized, there it develop biofilm. Such differences might also be related to local differences in leptospiral loads inside the organ.

We described here that rats with renal biofilm presented agglomerated CTs in a multifocal distribution. This was also a trend for *Leptospira*-colonized animals. It is possible to infer, then, that leptospire infect the kidney diffusely, coming from the circulatory system, migrate through tissue and manage to colonize focal regions of the cortex, where agglomerates of colonized tubules are further visible.

Histopathological analysis revealed the presence of minimal pathological alterations in *Leptospira*-positive animals. The most frequent alteration was discrete interstitial nephritis, in chronically infected rats with or without biofilm, in agreement with previous studies (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; CHAGAS-JUNIOR et al., 2009; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007). Since sinanthropic rats are exposed to many environmental factors, including other pathogens, it is not possible to determine that the alterations were due to the presence of leptospire in the kidneys.

We had some limitations in our study. We found no correlation of infection status or biofilm production with demographic data, what can be related to the number of analysed animals, i.e. 86 and 24, respectively. The difference observed for the results of positivity to co-localization (35%) and positivity to AB (41%) may be due to the convoluted anatomy of proximal renal tubules or the difficulty of performing manual co-localization. The differences found for the correlation of intensity of colonization with biofilm formation when we analysed IHC anti-*L. interrogans* (significant) or qRT-PCR (non significant) may have to do with difference sensitivities of the techniques. Another hypothesis is that the number of colonized tubules found in IHC anti-*L. interrogans* is not related with the bacterial load measured by qRT-PCR in the kidneys.

We concluded that sinanthropic *Rattus norvegicus* produce biofilm during renal colonization by *Leptospira interrogans*. Biofilm exopolysaccharidic matrix was composed by anionic saccharides, but not by mucins. Rats presenting renal biofilms had multifocal infection by *Leptospira* and biofilm was correlated to the intensity of colonized tubules. Biofilm was not related to age, sex or capture site of the rats. Biofilm formation did not account for any specific histopathological lesion. These are important findings on the biology of this host-adapted pathogen. We believe our findings will contribute to leptospiral pathogenesis in animal reservoirs. Additionally, it may impact in the mode we comprehend leptospiral transmission and the maintenance of disease cycle.

Acknowledgements

Ana Amélia Nunes Santos was a fellow of CNPq. We thank Dr. James Childs, Prof. Albert Ko

and Fleur Porter for study design; the staff of the Zoonosis Control Center of Salvador and the Service of Histotechnology of CPqGM/FIOCRUZ for technical assistance; Larissa Vasconcelos and Priscyla Ribeiro for critical reading of the manuscript. This work was supported by Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Federal University of Bahia, the Secretariat of Health Surveillance of the State of Bahia, the National Institutes of Health (grants: R01 AI052473, R01 TW009504, R25 TW009338), and the Wellcome Trust (102330/Z/13/Z).

Tables

Table 1: *Rattus norvegicus* distribution in groups according to sex and age.

| Groups | No. of animals (n = 86) | IHC positive (n = 68) | qRT-PCR positive (n = 47) | IHC negative (n = 15) | qRT-PCR negative (n = 6) | IHC and/or qRT-PCR positive (n = 76) |
|-------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|---|
| Juvenile males | 13 (15) | 6 (8.8) | 7 (14.8) | 6 (40) | 3 (50) | 10 (13.2) |
| Sub-adult males | 17 (19) | 16 (23.5) | 12 (25.5) | 1 (6.6) | 1 (16.6) | 17 (22.3) |
| Adult males | 9 (10) | 9 (13.2) | 8 (17) | - | - | 9 (11.8) |
| Juvenile females | 14 (16) | 6 (8.8) | 2 (4.2) | 5 (33.3) | 1 (16.6) | 7 (9.2) |
| Sub-adult females | 27 (31) | 25 (36.7) | 12 (25.5) | 3 (20) | 1 (16.6) | 27 (35.5) |
| Adult females | 6 (6.9) | 6 (8.8) | 6 (12.7) | - | 0 | 6 (7.8) |
| Total evaluated | 86 | | 84 | | 53 | 86 |

Table 2: Histopathological alterations observed in *Rattus norvegicus*, regarding *Leptospira* infection and the presence of biofilm.

| Alteration | IHC and/or qRT-PCR positive n = 76 (%) | IHC and/or qRT-PCR negative n = 10 (%) | Biofilm positive n = 24 (%) | Biofilm negative n = 45 (%) |
|--------------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Mesangial hypercellularity | 12 (15.8) | 3 (30) | 2 (8,3) | 10 (22,2) |
| Mesangial matrix hyperplasia | 18 (23,7) | 3 (30) | 5 (20,8) | 13 (28,8) |
| Hyaline-goticular Degeneration | 41 (53,9) | 4 (40) | 12 (50) | 25 (55,5) |
| Cylinders | 16 (21,05) | 0 (0) | 3 (12,5) | 12 (26,6) |
| Fibrosis | 7 (9,2) | 2 (20) | 4 (16,6) | 3 (6,6) |
| Chronic inflammation | 33 (43,4) | 2 (20) | 12 (50) | 21 (46,6) |
| Calcification | 8 (10,5) | 0 (0) | 5 (20,8) | 2 (4,4) |
| Epithelial regeneration | 4 | 1 | 1 (4,1) | 5 (11,1) |

Table 3. Histopathological evaluation observed in *Rattus norvegicus*, regarding *Leptospira* infection and the presence of biofilm.

| Pathology | IHC and/or qRT-PCR positive n = 76 (%) | IHC and/or qRT-PCR negative n = 10 (%) | Biofilm positive n = 24 (%) | Biofilm negative n = 45 (%) |
|--|---|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Minimal glomerular alterations | 3 (3,9) | 0 | 3 (12,5) | 2 (4,4) |
| Focal proliferative glomerulonephritis with increasing | 1 (1,3) | 0 | 0 | 1 (2,2) |
| Focal mesangial proliferative glomerulonephritis | 1 (1,3) | 0 | 0 | 1 (2,2) |
| Focal mesangial segmental proliferative glomerulonephritis | 4 (5,2) | 1 (10) | 1 (4,1) | 4 (8,8) |
| Acute tubular necrosis | 1 (1,3) | 0 | 0 | 1 (2,2) |
| Moderate chronic interstitial nephritis | 6 (7,8) | 0 | 4 (16,6) | 2 (4,4) |
| Discrete chronic interstitial nephritis | 22 (28,9) | 1 (10) | 7 (29,2) | 17 (37,7) |
| Kidney within normal parameters | 16 (21) | 8 (80) | 4 (16,6) | 22 (48,8) |

Figures

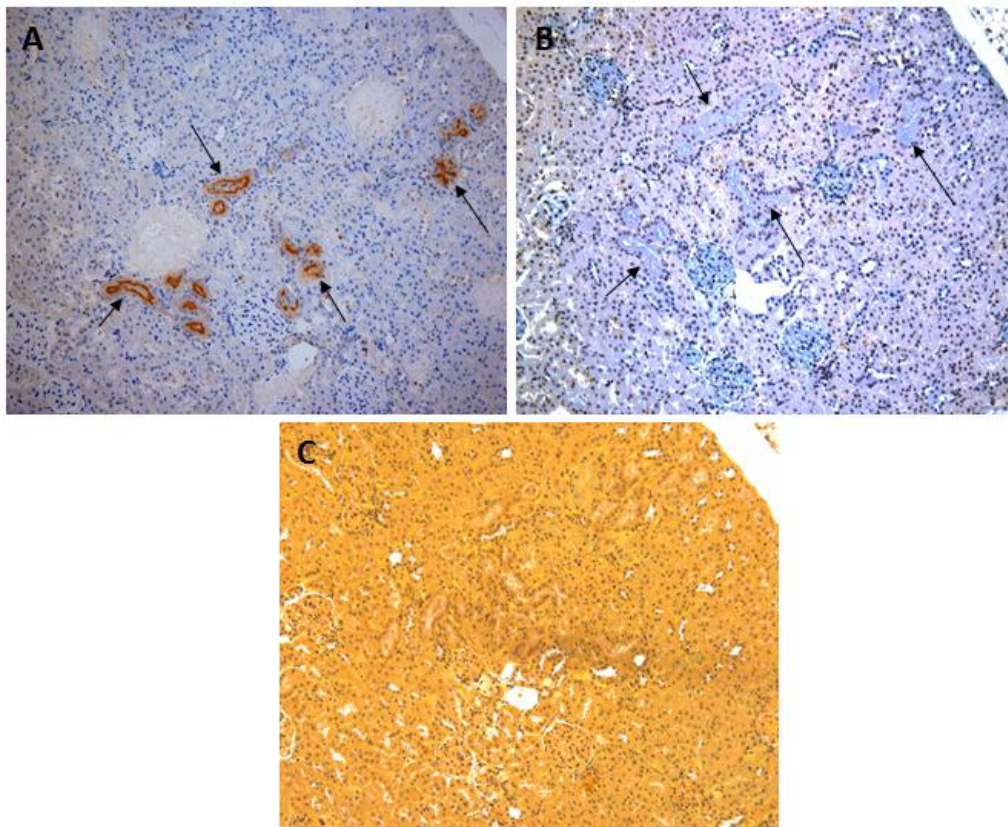


Figure 1. Histopathological investigation of biofilm formation in kidney sections of *Rattus norvegicus* naturally infected with *Leptospira interrogans*. (A) Renal tubules positive for IHC anti-*L. interrogans*, demonstrating leptospiral colonization of proximal tubules (black arrows); (B) AB positively stained tubules, as observed in light turquoise blue marking (black arrows); (C) section negative for MM staining. Note that the serial sections showed in A, B and C are from the same region of the kidney, evidencing the co-localization of tubules concomitantly positive in IHC and AB (Magnification, x 200).

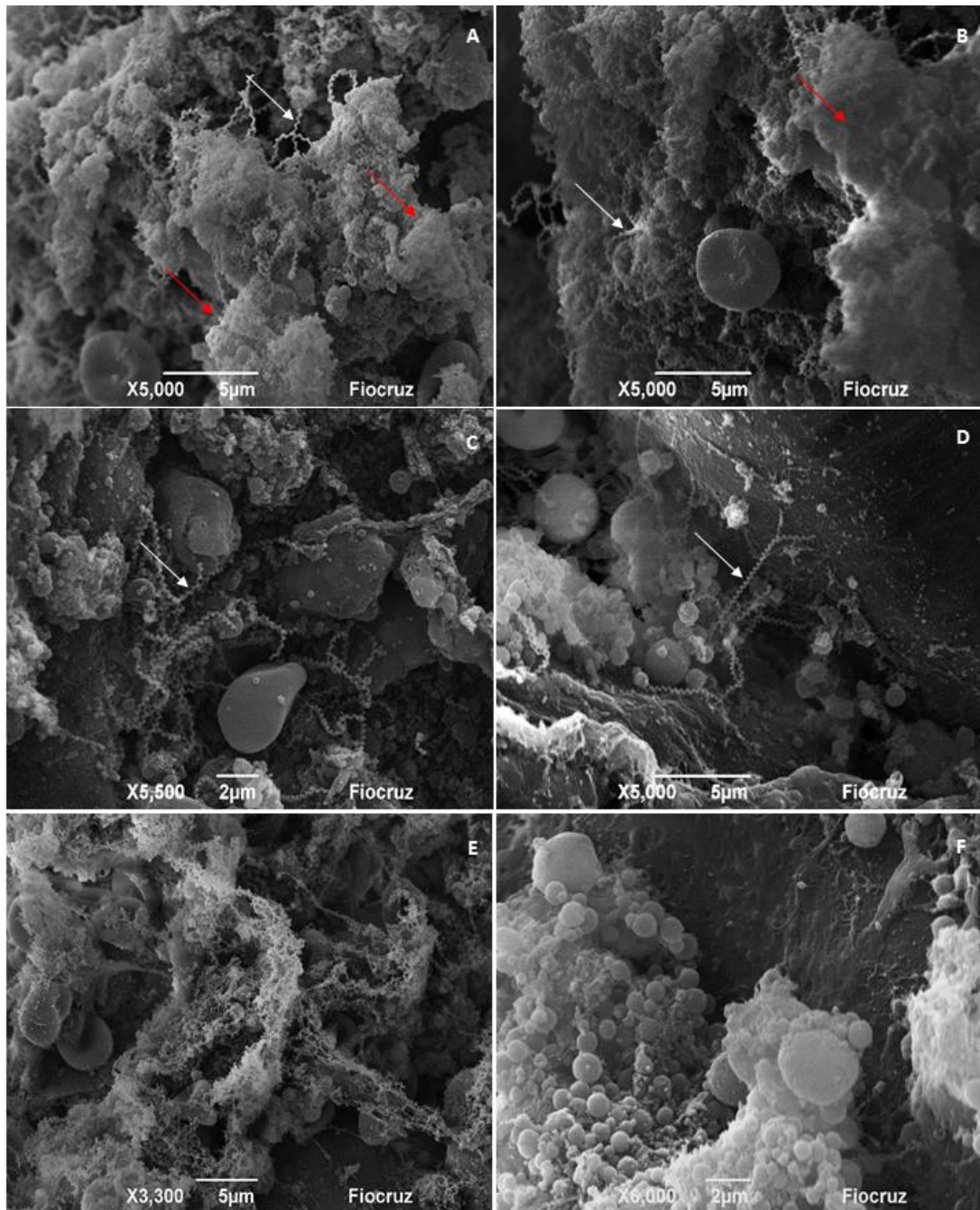


Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) of leptospiral biofilm and its matrix in the kidneys of naturally colonized *R. norvegicus*. (A and B) SEM of colonized kidney with ruthenium red (RR) showed *Leptospira* agglomerates (white arrows) surrounded by an anionic exopolysaccharidic matrix (red arrows) inside the renal tubules. (C and D) SEM of colonized kidney without RR, where bacteria are evidenced agglomerated (C) or isolated (D), without the presence of the matrix. (E) SEM using RR of *R. norvegicus* negative control. (F) SEM without RR of *R. norvegicus* negative control.

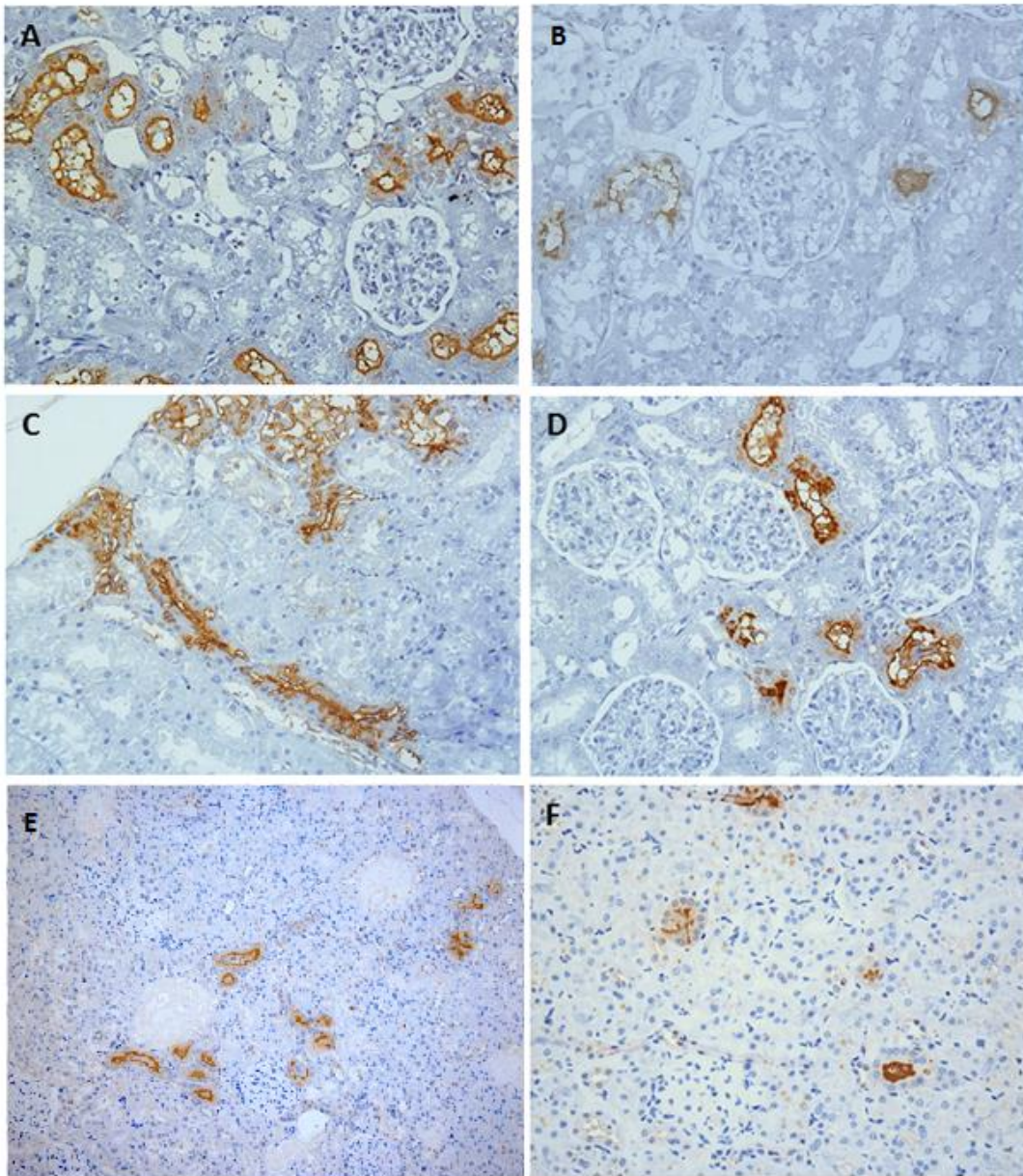


Figure 3. Patterns of colonization and immunohistochemistry anti-*L. interrogans* marking in rats that presented renal biofilms. (A) High intensity of colonized tubules (CTs), (B) low intensity of CTs. (C) IHC anti-*L. interrogans* pattern of partial/ complete occlusion of the CT lumen, (D) IHC anti-*L. interrogans* marking restricted to the membrane of renal epithelium (partial occlusion). (E) Agglomerated CTs distributed in the renal cortex, (F) isolated CTs distributed in the cortex. A, B, C and D: magnification, x 400; E and F: magnification, x 200.

Bibliographic references

ADLER, B. *Leptospira* and Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v1, p 65-97, 2015

AGUDELO-FLÓREZ, P. et al. Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with *Leptospira*. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 33, p. 82–88, 2013.

ATHANAZIO, D. A. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, p. 176–180, 2008.

BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, 2009.

BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6926–6932, 2002.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.

BJARNSHOLT, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**, v. 44, n. 6, p. 547–558, 2009.

BORUCKI, M. K. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7336–7342, 2003.

CARSON, F.L.; HLADIK, C. Histotechnology: a self-instructional text. **American Society for Clinical Pathology**, 1997.

CHAGAS-JUNIOR, A. D. et al. An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1632–1637, 2009.

COSTA, F. et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014.

COSTA, F. et al. 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. e0003819, 2015a.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, set. 2015b.

CRODA, J. et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: Disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 5826–5833, 2008.

DIERICHS, R. Ruthenium red as a stain for electron microscopy. Some new aspects of its application

and mode of action. **Histochemistry**, v. 64, n. 2, p. 171–187, 1979.

DUNHAM-EMS, S. M. et al. Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 12, p. 3652–65, dez. 2009.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Austrália, 1999.

FARIA, M. T. DE et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008

FELZEMBURGH, R. D. M. et al. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an Urban Slum Community: Role of Poor Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004

HINNEBUSCH, B. J.; ERICKSON, D. L. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 229–48, jan. 2008.

HOFFMANN, N. et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2504–2514, 2005.

JARRETT, C. O. et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 783–792, 2004.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, p. 820–825, 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, p. 736–747, 2009.

KURTS, C. et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 10, p. 738–53, 2013.

LACROIX-LAMANDÉ, S. et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 6, p. 2805–14, 15 mar. 2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

LI, Y.-H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 2519–38, jan. 2012.

LOURENÇO, A. et al. Comparison of *Listeria monocytogenes* Exoproteomes from Biofilm and Planktonic State: Lmo2504, a Protein Associated with Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6075–6082, 2013.

MACIEL, E. A P. et al. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, 2008.

MACK, D. et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 175–83, jan. 1996.

MAY, T. B. et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 191–206, abr. 1991.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376–386, 2005.

MOE, K. K. et al. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 72, n. 4, p. 411–416, 2010.

MONAHAN, A M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary pathology**, v. 46, p. 792–799, 2009.

NALLY, J. E. et al. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3251–3260, 2005.

NARANG, H. K. Ruthenium red and lanthanum nitrate a possible tracer and negative stain for scrapie “particles”? **Acta Neuropathologica**, v. 29, n. 1, p. 37–43, jan. 1974.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 677–701, jan. 2003

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, p. 1309–1317, 2008.

SANTOS, A. A. N. et al. Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–4, 2015.

SAPI, E. et al. Characterization of Biofilm Formation by *Borrelia burgdorferi* In Vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

STRICKER, R. B.; JOHNSON, L. Lyme disease: The next decade. **Infection and Drug Resistance**, v. 4, p. 1–9, 2011.

THIERMANN, A. B. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Journal of wildlife diseases**, v. 17, n. 1, p. 39–43, jan. 1981a.

- TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, p. 35–40, 2004.
- TUCUNDUVA DE FARIA, M. et al. Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental *Leptospira* Infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 231–238, 2007.
- WALLER, L. N. et al. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 1, p. 23–30, 2004.
- WANG, B. et al. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 809–813, 1984.
- YADAV, M. K. et al. Hyaluronic acid derived from other streptococci supports *Streptococcus pneumoniae* in vitro biofilm formation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 690217, jan. 2013.
- YANG, C.-W. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. **Kidney International**, v. 72, n. 8, p. 918–25, out. 2007.
- YANG, L. et al. Current understanding of multi-species biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 74–81, 2011
- ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V. Development of Chronic and Acute Golden Syrian Hamster Infection Models With *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 403–411, 2012.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos a presença de biofilme em rins de ratos selvagens colonizados por *Leptospira interrogans* e capturados em Salvador, Bahia. Dentre os 69 *R. norvegicus* positivos para IHC anti-*L. interrogans*, 41% foram positivos para a coloração AB e 35% apresentaram co-localização positiva, indicando a presença de biofilme renal nestes ratos. Biofilmes bacterianos são considerados um fator de colonização e virulência (PARSEK; SINGH, 2003) e isto representa uma nova descoberta sobre a patogênese da colonização da leptospirose em reservatórios naturais. Nossos resultados estão de acordo com um estudo preliminar anterior, realizado em 2012, com um número reduzido de *R. norvegicus* (n = 17) capturados no mesmo local de estudo, quando observamos que um terço dos animais apresentaram co-localização e renal positivo biofilme (dados não publicados). A

espiroqueta *Borrelia burgdorferi* forma agregados semelhantes a biofilme no intestino grosso de carrapatos, vetores da doença de Lyme (DUNHAM-EMS et al., 2009). Biofilmes também participam da infecção crônica de pulgas vetores de *Yersinia pestis*, o agente da Peste, e têm um possível papel na transmissão (HINNEBUSCH; ERICKSON, 2008; JARRETT et al., 2004). Quando o biofilme estava presente no rim, nem todos os túbulos colonizados apresentaram biofilmes. Outros estudos de formação de biofilme em reservatórios animais também foram qualitativos e sem nenhuma medida da frequência deste fenótipo no órgão infectado (JARRETT et al., 2004).

O biofilme no interior dos túbulos proximais foram corados por AB de pH 2,5 e não por MM, indicando que os exopolissacarídeos de matriz não são constituído por mucinas, mas muito provavelmente por mucopolissacáridos ácidos ou alginato. AB é um composto macrocíclico, utilizado principalmente para detectar a presença de mucopolissacarídeos ácidos. Em pH 2,5, com ácido acético a 3%, ele adquire uma coloração azul quando positivo e marca principalmente mucopolissacáridos ácidos sulfatados e carboxilados (CARSON e HLADIK, 1997), embora possa corar outros sacarídeos. Ele é regularmente utilizado para identificar biofilmes em tecidos, como foi previamente mostrado nos pulmões colonizados por biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (BJARNSHOLT et al., 2009; HOFFMANN et al., 2005).

A MEV utilizando o corante vermelho rutênio revelou intensa deposição de matriz eletrondensa amorfa que cobriu os agregados de leptospiros. Sem o corante VR, observamos aglomerados de bactérias e densa colonização por leptospiros nos túbulos renais proximais, porém sem indicação da presença de matriz extracelular, conforme anteriormente evidenciado (ATHANAZIO et al., 2008; MAFFEI et al., manuscrito em preparação). Maffei e colaboradores (manuscrito em preparação) demonstraram a formação de biofilmes por leptospiros em ratos experimentalmente infectados, observando um padrão granular no material amorfo entre as leptospiros nos túbulos renais, utilizando o VR, compatível com algumas das imagens observadas no nosso estudo. O uso do VR confirmou, portanto, a natureza bioquímica da matriz, como polissacarídeos aniônicos. VR é um cátion hexavalente baseado em Rutênio usado para detectar mucopolissacarídeos ácidos e glicoproteínas (DIERICHS, 1979; NARANG, 1974; WALLER et al., 2004). Já foi usado em microscopia eletrônica para identificar biofilmes de *Listeria monocytogenes* (BORUCKI et al., 2003; LOURENÇO et al., 2013), *Campylobacter jejuni* (MOE et al., 2010), entre outros.

Cabe ainda ressaltar que durante o desenvolvimento do projeto foram realizadas outras colorações a fim de identificar a presença de biofilme e caracterizar de forma mais completa a composição da matriz extracelular. Utilizamos as colorações de Alcian Blue em pH 1,0, PAS e PAS-

diastase. No entanto, tais preparações apresentarem muitas marcações inespecíficas, não sendo consideradas neste estudo.

Mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanos estão envolvidos na formação de biofilmes bacterianos. Mack e colaboradores (1996) mostraram que o polissacarídeo da adesina intercelular (PIA) de *Staphylococcus epidermidis* é formado por um glicosaminoglicano linear. Além disso, o ácido hialurônico dá suporte ao crescimento *in vitro* de biofilme de *Streptococcus* (YADAV et al., 2013). O alginato é composto por ácidos manurônico e gulurônico. Estudos anteriores demonstraram que o alginato é exopolissacarídeo de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (BJARNSHOLT et al., 2009a; HOFFMANN et al., 2005; MAY et al., 1991). Recentemente, Sapi e colaboradores (2012) mostraram *in vitro* que o alginato está presente na matriz do biofilme de *B. burgdorferi*. *Leptospira* spp. possuem genes relacionados com a biossíntese de alginato (RISTOW et al., 2008) e é possível que este polissacarídeo participe na composição e no metabolismo do biofilme.

Dos 86 animais capturados, 88,4% estavam colonizados por *Leptospira interrogans*. Em um estudo semelhante realizado em uma população de ratos capturados em Pau da Lima, Salvador, Costa et al. (2015), encontrou a mesma taxa de positividade (88%), utilizando qPCR de amostras de rim como método de triagem. A maioria dos animais positivos neste estudo foram fêmeas sub-adultas, o que também está de acordo com Costa et al. (2015). Em nosso estudo, não encontramos diferença estatística para a proporção de positividade de acordo com a idade ou o sexo dos animais, ou vales onde os animais foram capturados. Os autores supracitados observaram que a carga de leptospiras oscilou entre os locais de captura, mas não variou com sexo ou idade.

Não encontramos diferenças estatísticas relacionadas com a demografia de ratos que apresentavam biofilme renal, no entanto, observamos tendências quanto ao local de captura (vale 4) e a idade dos animais, uma vez que sub-adultos tiveram uma chance maior de desenvolver biofilme. Os ratos são colonizados muito cedo (COSTA et al., 2015a; SANTOS et al., 2015) e existe a hipótese de que a leptospirose seja transmitida verticalmente. Portanto, é esperado que animais sub-adultos apresentem colonização e, como consequência, a formação de biofilme.

A intensidade de colonização variou entre os indivíduos analisados, independentemente da idade, sexo ou local de captura. No entanto, notamos uma correlação positiva importante entre a intensidade dos túbulos colonizados e formação de biofilme. Isto indica que quanto maior for o número de túbulos colonizados no córtex, provavelmente maior é a dispersão de *Leptospira* no tecido e a formação de biofilme. Se considerarmos o número de CT como uma medida da população de *Leptospira* no tecido, poderíamos possível inferir que a intensidade de colonização possibilitaria um *quorum sensing* para a formação de biofilmes. No entanto, a carga bacteriana avaliada por qPCR mostrou relação com a formação de biofilme. Temos de avaliar esses dados com cuidado, uma vez

que há uma diferença entre os resultados de análise histológica e PCR, que é uma técnica mais sensível. Ele pode sugerir que o número de túbulos colonizadas podem não ter relação com a carga bacteriana. Ou, ainda, a análise de co-localização por quantidade de túbulos marcados é, de alguma forma, enviesada devido ao número de secções renais avaliadas.

A apresentação mais comum de marcação por IHQ anti-*L. interrogans* em ratos colonizados foi restrita à membrana de células do epitélio renal, o que denominados oclusão parcial de túbulos colonizados (TC). Em estudo prévio o mesmo padrão de marcação foi encontrado em metade dos animais avaliados (SANTOS et al., 2015). O outro padrão de marcação observado nesse estudo, ocluindo a luz tubular, já foi previamente observado (ATHANAZIO et al., 2008; SANTOS et al., 2015). No entanto, a maioria dos animais que apresentaram biofilme apresentaram um padrão de marcação por IHQ anti-*L. interrogans* com oclusão total / parcial de TCs. Tais diferenças podem estar relacionadas a diferentes cargas de leptospiras. Estes dados podem também indicar que quanto mais TCs são colonizados, mais existe biofilme.

Até o momento não conhecemos o padrão de distribuição dos túbulos colonizados na região cortical de ratos ou outros reservatórios animais de leptospiras. Descrevemos aqui que ratos colonizados e ratos com biofilme apresentaram TCs aglomerados em uma distribuição multifocal. É possível inferir, então, que as leptospiras possuem a capacidade de infectar o rim difusamente e, em seguida, migrar através de tecidos e colonizar regiões focais do córtex, onde grupos de túbulos colonizados são visíveis.

A análise histopatológica revelou a presença de alterações patológicas mínimas na maioria dos animais positivos, e a alteração patológica mais frequente foi nefrite intersticial crônica, concordando com estudos anteriores de ratos cronicamente infectados (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; TUCUNDUVA DE FARIA et al., 2007). Tal alteração foi mais frequente nos rins de ratos colonizados, com ou sem biofilme, o que indica que a presença de biofilme não interfere em qualquer lesão histopatológica específico. Não foram observadas diferenças significativas relativas a locais de captura, idade, sexo. Uma vez que os ratos capturados foram expostos a diversos fatores ambientais, incluindo outros agentes patogênicos, não é possível determinar se as alterações encontradas ocorrem devido exclusivamente à presença de leptospiras dentro dos túbulos. No entanto, o número amostral pode ter sido uma limitação para tal análise.

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A diferença entre os resultados de positividade para o AB e co-localização pode ser justificada, em parte, pela dificuldade de realizar a técnica de co-localização manualmente através da microscopia ótica. Além disso, a distância entre as secções coradas por IHQ anti- *L. interrogans* e AB foi de cerca de 12 micrômetros, que pode ser uma longa distância entre as seções para este tipo de análise. Também é importante lembrar a anatomia dos túbulos contornados, o que pode dificultar ainda mais o processo de co-localização. Por fim, analisamos apenas uma seção IHQ por animal, o que pode ter subestimado a proporção de ratos com co-localização positiva.

A carga bacteriana avaliada por qRT-PCR não mostrou qualquer relação com a formação de biofilme, ao contrário do que foi demonstrado pela avaliação da intensidade de colonização através da técnica histológica. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças existentes entre as técnicas histológica e molecular utilizadas, a última sendo mais sensível. Este resultado pode indicar que o número de túbulos colonizados no IHC pode não ter relação com a carga bacteriana no rim.

7. CONCLUSÕES

Através deste estudo concluímos que *Rattus norvegicus* sinantrópicos produzem biofilme durante a colonização renal por *Leptospira interrogans*. A matriz exopolissacarídica da matriz é composta por sacáridos aniônicos, mas não por mucinas. Os ratos que apresentam biofilmes renais apresentaram padrão de infecção multifocal por *Leptospira* e a presença de biofilme foi correlacionada com a intensidade dos túbulos colonizados. Biofilme não foi relacionada com a idade, sexo ou local de captura dos ratos ou com qualquer lesão histopatológica específica. Nossos resultados contribuirão para melhor compreender a biologia deste patógeno e a patogênese da leptospirose em reservatórios animais. Além disso, podem gerar um impacto na compreensão sobre a transmissão da leptospirose e a manutenção do ciclo da doença.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. *Leptospira* and Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v1, p 65-97, 2015.
- AGUDELO-FLÓREZ, P. et al. Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with *Leptospira*. **Revista Argentina de Microbiologia**. v. 33, p. 82–88, 2013.
- ANDRADE, Z.A.; OLIVEIRA, J.C. Estudo sobre a leptospirose na Bahia. **Boletim da Fundação Gonçalo Muniz**, v. 3, p. 1 –28, 1954.
- ATHANAZIO, D. A. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v. 105, p. 176–180, 2008.
- BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, 2009.
- BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6926–6932, 2002.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. December, p. 757–771, 2003.
- BJARNSHOLT, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**, v. 44, n. 6, p. 547–558, 2009.
- BORUCKI, M. K. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7336–7342, 2003.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de Vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 816 p. – (Série A: Normas e Manuais Técnicos)
- CARSON, F.L.; HLADIK, C. Histotechnology: a self-instructional text. **American Society for Clinical Pathology**, 1997.
- CHAGAS-JUNIOR, A. D. et al. An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1632–1637, 2009.
- COSTA, F. et al. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2014.

COSTA, F. et al. 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. e0003819, 2015a.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, set. 2015b.

CRODA, J. et al. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: Disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 5826–5833, 2008.

DIERICHS, R. Ruthenium red as a stain for electron microscopy. Some new aspects of its application and mode of action. **Histochemistry**, v. 64, n. 2, p. 171–187, 1979.

DUNHAM-EMS, S. M. et al. Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 12, p. 3652–65, dez. 2009.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. ed. Austrália: MedSci Melbourne, 1999.

FARIA, M. T. DE et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1–5, 2008.

FELZEMBURGH, R. D. M. et al. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an Urban Slum Community: Role of Poor Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004.

HINNEBUSCH, B. J.; ERICKSON, D. L. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 229–48, jan. 2008.

HOFFMANN, N. et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2504–2514, 2005.

JARRETT, C. O. et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector.

- The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 783–792, 2004.
- KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**, v. 354, p. 820–825, 1999.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, p. 736–747, 2009.
- KURTS, C. et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 10, p. 738–53, 2013.
- LACROIX-LAMANDÉ, S. et al. Downregulation of the Na/K-ATPase pump by leptospiral glycolipoprotein activates the NLRP3 inflammasome. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 6, p. 2805–14, 15 mar. 2012.
- LAURAIN, A. R., Lesions of skeletal muscle in leptospirosis; review of reports and an experimental study. **American Journal of Pathology**, v. 31, n. 3, p. 501-519, 1955.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.
- LI, Y.-H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 2519–38, jan. 2012.
- LOURENÇO, A. et al. Comparison of *Listeria monocytogenes* Exoproteomes from Biofilm and Planktonic State: Lmo2504, a Protein Associated with Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6075–6082, 2013.
- MACIEL, E. A P. et al. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, 2008.
- MACK, D. et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 175–83, jan. 1996.
- MAY, T. B. et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 191–206, abr. 1991.
- MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376–386, 2005.
- MOE, K. K. et al. The mode of biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 72, n. 4, p. 411–416, 2010.

MONAHAN, A M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 792–799, 2009.

NALLY, J. E. et al. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3251–3260, 2005.

NARANG, H. K. Ruthenium red and lanthanum nitrate a possible tracer and negative stain for scrapie “particles”? **Acta Neuropathologica**, v. 29, n. 1, p. 37–43, jan. 1974.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 677–701, jan. 2003.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, p. 1309–1317, 2008.

SANTOS, A. A. N. et al. Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–4, 2015.

SAPI, E. et al. Characterization of Biofilm Formation by *Borrelia burgdorferi* In Vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

STERLING, C. R., THIERMANN, A. B. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. **Veterinary Pathology**, v. 18, 628-637, 1981.

STRICKER, R. B.; JOHNSON, L. Lyme disease: The next decade. **Infection and Drug Resistance**, v. 4, p. 1–9, 2011.

THIERMANN, A. B. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 1, p. 39–43, jan. 1981a.

TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, p. 35–40, 2004.

TUCUNDUVA DE FARIA, M. et al. Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental *Leptospira* Infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 231–238, 2007.

WALLER, L. N. et al. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 1, p. 23–30, 2004.

WANG, B. et al. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 809–813, 1984.

YADAV, M. K. et al. Hyaluronic acid derived from other streptococci supports *Streptococcus pneumoniae* in vitro biofilm formation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 690217, jan.

2013.

YANG, C.-W. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. **Kidney International**, v. 72, n. 8, p. 918–25, out. 2007.

YANG, L. et al. Current understanding of multi-species biofilms. **International Journal of Oral Science**, v. 3, n. 2, p. 74–81, 2011a.

ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V. Development of Chronic and Acute Golden Syrian Hamster Infection Models With *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 403–411, 2012.

ANEXO 1. FOLHA DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA RENAL

| | | | | |
|---|--|--|-------------------------------|--|
| Idf SH | | | | |
| Data análise | | | | |
| Análise semi-quantitativa (0 a 3+): 0 ausente; 1+ discreto; 2+ moderado; 3+ intenso. | | | | |
| GLOMÉRULOS: | | | Descrição microscópica | |
| Hipercelularidade: | | | | |
| Mesangial | | | | |
| Epitelial | | | | |
| Endotelial | | | | |
| Neutrófilo | | | | |
| Células espumosas | | | | |
| Matriz mesangial: | | | | |
| Lobulação | | | | |
| Espessamento. memb. Basal | | | | |
| Desdobramento LBG | | | | |
| Crescente (N) | | | | |

| | | | | | |
|---------------------------------|--|--|--|--|--|
| Congestão | | | | | |
| Depósitos | | | | | |
| Trombose | | | | | |
| Necrose | | | | | |
| Aderências (N) | | | | | |
| Esclerose Segmentar (N) | | | | | |
| Proteínas no espaço subcapsular | | | | | |
| TÚBULOS: | | | | | |
| Degeneração hialinogoticular | | | | | |
| Degeneração epitelial | | | | | |
| Necrose epitelial | | | | | |
| Regeneração epitelial | | | | | |
| Dilatação | | | | | |
| Atrofia | | | | | |
| Cilindros | | | | | |
| Espessam. mem. Basal | | | | | |
| INTERSTÍCIO: | | | | | |
| Edema | | | | | |
| Fibrose | | | | | |
| Inflamação aguda | | | | | |
| Inflamação crônica | | | | | |
| Calcificação | | | | | |
| Células espumosas | | | | | |
| Hemorragia | | | | | |
| VASOS SANGÜÍNEOS: | | | | | |
| Alt. Fibrótica | | | | | |
| Alt. Hialina | | | | | |
| Espess. da muscular | | | | | |
| Necrose fibrinóide | | | | | |
| Lesão em <i>casca de cebola</i> | | | | | |
| Vasculite | | | | | |

| |
|---------------------|
| CONCLUSÃO: |
| COMENTÁRIOS: |

ANEXO 2. Artigos desenvolvidos no período.

2.1 Artigo 2

O manuscrito anexado a seguir refere-se ao Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Médica Veterinária, em julho de 2012.

A redação do manuscrito foi finalizada em junho de 2013, durante a vigência do Mestrado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. O manuscrito foi publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology* em 2015.

2.2 Artigo 3

A redação do artigo a seguir foi realizada em 2013-2014, durante a vigência do Mestrado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. O manuscrito será submetido para a revista PLoS ONE.

Brazilian Journal of Microbiology 46, 4, 1161-1164 (2015)
ISSN 1678-4405
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420140873>

Copyright © 2015, Sociedade Brasileira de Microbiologia
www.sbmicrobiologia.org.br

Short Communication

Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums

Ana Amélia Nunes Santos¹, Cláudio Pereira Figueira², Mitermayer Galvão dos Reis¹,
Federico Costa^{3,4,5}, Paula Ristow^{1,6}

¹Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil.

²Plataforma de Microscopia Eletrônica, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil.

³Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil.

⁴Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil.

⁵Division of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, Connecticut, USA.

⁶Laboratório de Bacteriologia e Saúde, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil.

Submitted: October 17, 2014; Approved: February 2, 2015.

Abstract

We evaluated the renal colonization by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* (rats), as it is the major natural reservoir of urban leptospirosis. We caught 72 *R. norvegicus*, out of which 32 were found to be positive for *L. interrogans* by immunofluorescence assay. From these rats, we selected 17

and divided them into six groups based on the mass-age/sex. We performed the immunohistochemistry test against *L. interrogans* in the kidney sections of the rats and systematically counted the colonized tubules (CTs) in 20 fields. The proportion of positive fields varied from 5% to 95%. The number of CTs in 20 fields varied from 0.5 to 85.5. These differences were not related to age or sex of the animals. The characterization of leptospiral colonization patterns in the natural reservoirs is important to better understand the host-pathogen interactions in leptospirosis.

Key words: *Leptospira interrogans*, renal colonization, natural reservoirs, *Rattus norvegicus*.

In Brazil, every year around 5,000 patients are reported to have leptospirosis (Brasil Ministério da Saúde, 2012). Weil's syndrome, the severe form of leptospirosis, is caused by pathogenic *Leptospira* spp., which is characterized by acute renal failure, hepatic failure, and hemorrhages. The mortality rate of this syndrome has reached 15% (Ko *et al.*, 1999). However, the severe pulmonary hemorrhage syndrome has a mortality rate up to 70% (Gouveia *et al.*, 2008). The highest prevalence of leptospirosis is reported during heavy rainy seasons in urban settings. In those areas *R. norvegicus* is the major carrier of pathogenic leptospires. They are chronically colonized by these spirochetes in the renal tubules, excreting them in urine, and contaminating the environment (Levett, 2001).

Leptospire colonize the proximal convoluted tubules of *R. norvegicus*, forming dense aggregates of bacteria

(Athanzio *et al.*, 2008; De Faria *et al.*, 2007). Despite cortical bacterial colonization, renal tissue maintains its architecture, presenting slight interstitial nephritis and a small degree of cell degeneration (De Faria *et al.*, 2007). Persistent colonization indicates that kidney is an immune-privileged site that promotes the survival of bacteria (Monahan *et al.*, 2009). Characterization of colonization patterns in chronic reservoirs is important to understand the pathogenic mechanism of *Leptospira* spp. and its maintenance in the host. However, pathological studies on kidneys of urban rats are scarce. The relationship between the carrier state and demographic factors, such as gender and sex, or environmental predisposing factors, has not yet been studied in synanthropic rats. We aimed to characterize renal colonization by *L. interrogans* in *R. norvegicus* of different age and sex caught in slum areas with high incidence of severe leptospirosis in Salvador, Bahia, Brazil.

Send correspondence to P. Ristow. Laboratório de Bacteriologia e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil. E-mail:

paularistow3@gmail.com.

This study was performed in Pau da Lima and Sete de Abril, two neighborhoods in Salvador, Bahia, Brazil, with high incidence of severe leptospirosis (Reis *et al.*, 2008). The rats were systematically caught from June to September 2010. The sampling methodology involved setting of

20-25 Tomahawk traps in peridomiliary areas of five continuous households at each site (seven sites were located in Pau da Lima and two sites in Sete de Abril), for 5 days (Porter *et al.*, 2015). The households had a previous history of severe human leptospirosis, and they were geo-referenced and selected randomly (Reis *et al.*, 2008). The caught rats were then transported to the Zoonosis Control Center, where they were euthanized, and the kidneys were collected during necropsies that followed biosafety protocol levels 2 and 3 (Mills *et al.*, 1995).

As a qualitative method, the immunofluorescence (IF) imprint technique was carried out to screen the kidneys for *L. interrogans* infection, following the exact protocol described by Chagas-Junior *et al.* (2012). Kidneys were collected and preserved in 10% buffered formalin. Data were collected on standardized questionnaires, entered, and validated in a unique database (*Epi Info* system). Rats positive for IF were classified into six groups according to age and sex: juvenile males (< 200 g), juvenile females (< 200 g), young adult males (201-399 g), young adult females (201-399 g), adult males (> 400 g), and adult females (> 400 g). For each group, three rats were randomly selected: two IF positive and one IF negative as a negative control.

Formalized kidneys were embedded in paraffin wax, and then 2- μ m sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and submitted to immunohistochemistry (IH) anti-*L. interrogans* for histopathology and leptospiral colo-

nization studies, respectively. For the IH test, we followed the protocol described by Croda *et al.* (2008), with some modifications, which are as follows: tissues were deparaffinized, sections were treated with 0.3% hydrogen peroxide for 15 min at room temperature (RT), blocked by incubation with 10% skimmed milk in 1x Phosphate Buffered Saline (PBS), and incubated with primary antibodies (1,000-fold dilution of polyclonal rabbit antibody anti-*L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA) at RT for 1 h. Samples were washed with 1% PBS and then incubated at RT for 20 min with secondary antibodies from the Histostain-Plus kit (Invitrogen), adding 5% of nonimmune rat serum to avoid unspecific reactions. Enzyme reactions were tested using 3,3'-diaminobenzidine (Sigma). Microscopic observations were performed using an Olympus BX51 optical microscope. Two independent and blinded observers performed screening observations of IH sections. Rats positive for the IF test, but negative for the IH test, were excluded from this study.

To evaluate the distribution and intensity of renal colonization by IH, each renal section was divided into quadrants. For each quadrant, we randomly selected five fields in the cortex, totaling 20 fields. Observations were performed using 40x objective with two readings per slide. The number of colonized tubules (CTs), positively marked by IH anti-*L. interrogans*, was registered for all fields (*CT20 count*). The *CT 20 count* was considered a quantitative measurement of infection. The arithmetic mean between the two readings for the number of *CT 20 count* and the number of CTs per field was obtained. Descriptive analysis was performed to compare the quadrants and field positivity, as well as the number of positive CTs between sex and mass-age groups. The Mann-Whitney test (Epi Info) was performed to compare the differences in *CT 20 count* related to sex and age.

This work was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Oswaldo Cruz Foundation (Salvador, Brazil; protocol number 003/2012).

We caught 72 rats (*R. norvegicus*), out of which 32 were found to be positive for *L. interrogans* by IF assay (44%), and the kidneys were preserved in formalin for posterior IH analysis. We randomly selected 11 positive rats and 6 negative rats and divided them into six groups based on the mass-age/sex. In one group (juvenile males), it was not possible to come across two positive rats ($n = 1$). The six IF-negative control rats were confirmed to have a negative IH result.

In the kidney IH analysis using anti-*L. interrogans* antibodies, it was found that the proportion of positive cortical quadrants varied from 25% to 100%, with high variation between the groups (Table 1). The proportion of fields containing positive CTs was also heterogenic and varied from 5% to 95%, with the maximum percentage obtained in one juvenile female and one adult male. Also, there was a wide variation in the total *CT 20 count*, with a minimum

value of 0.5 and a maximum of 85.5, demonstrating large heterogeneity in the infection patterns in the carrier rats (Table 1). The highest values of *CT 20 count* (83.5 in an adult male and 85.5 in a juvenile female) were observed in two rats, corresponding to 18.2% of the sample number. Other animals presented much lower *CT 20 count* values, from 0.5 to 26.5 (Table 1).

The proportion of positive rats (44%) was smallest compared with those previously reported in the literature. Recently, Costa *et al.* (2014) studied 84 rats and found the prevalence of infection by *L. interrogans* to be 63.1%. In a previous study, De Faria *et al.* (2007) studied 60 rats and found 82% of prevalence. For all criteria examined regarding the colonization patterns in the IH test, we observed differences in colonization between individuals, regardless of the group to which they belonged. However, no significant differences were observed in kidney colonization (*CT 20 count*) of rats between sex ($p = 0.33$) or mass-age groups ($p = 0.67$). These findings may be related to other individual characteristics or to environmental factors, such as the bacterial inoculum in the environment. Although we did not assess the environmental bacterial contamination, the

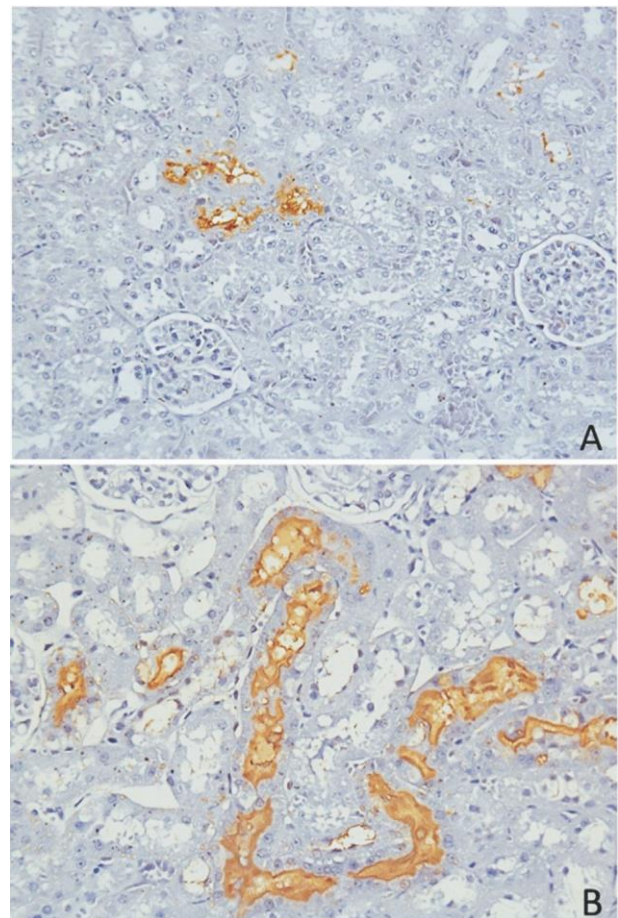


Figure 1 - Kidney sections of *R. norvegicus* stained positively for immunohistochemistry (IH) anti-*L. interrogans*. In **A**, we observed a low CT count and the tubules presented with IH staining restricted to the membrane of epithelial renal cells. In **B**, massive colonization is shown, with a high CT count, and the tubules also presented a pattern of IH staining including the lumen. Magnification: 400x

Table 1 - Proportions of *R. norvegicus* kidneys colonized by *L. interrogans* and number of colonized tubules (CT) by immunohistochemistry.

| | CT 20 count ^{*1} | % of quadrants with CT ^{*2} | % of fields with CT ^{*3} | Mean no. of CT per field |
|---------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Females | | | | |
| Juvenile 1 | 85.5 | 100 | 95 | 4.275 |
| Juvenile 2 | 7 | 100 | 40 | 0.35 |
| Young adult 1 | 19 | 75 | 40 | 0.95 |
| Young adult 2 | 26.5 | 100 | 55 | 0.875 |
| Adult 1 | 25 | 100 | 55 | 1.25 |
| Adult 2 | 0.5 | 25 | 5 | 0.025 |
| Males | | | | |
| Juvenile | 2.5 | 50 | 10 | 0.125 |
| Young adult 1 | 17 | 100 | 45 | 0.85 |
| Young adult 2 | 10 | 50 | 15 | 0.5 |
| Adult 1 | 5.5 | 25 | 5 | 0.275 |
| Adult 2 | 83.5 | 100 | 95 | 4.175 |

^{*1}Obtained by the mean of two counts of CT number in 20 randomly selected fields. ^{*2}% of quadrants containing CT. ^{*3}% of fields containing CT in 20 randomly selected fields.

study site is endemic to leptospirosis, based on wide active surveillance for severe cases (Reis *et al.*, 2008). It was already shown that the presence of open sewers or garbage accumulation in peridomestic areas influences the risk of human infection with *Leptospira* spp. (Reis *et al.*, 2008). These factors could also be important for the risk of leptospiral infection in rats, and at the end, determine the individual differences in colonization. Another justification for the differences found in our study could be individual responses to the presence of the parasite and/or specific immune response. The lack of significant differences in this study regarding sex and mass-age may also be related to the small sample number, which is a limitation in this study.

The patterns of colonization, according to the distribution of positive CTs in the cortex, varied among the 11

IH-positive rats: three exhibited widespread colonization throughout the cortex, while eight showed agglomeration of CTs in different cortical regions (Figure 1). Slight differences could be observed according to the intensity of IH staining of the tubules. Half of the rats had a pattern of staining restricted to the membrane of renal epithelium. The other half also had a pattern of staining in the whole lumen of the tubule (complete occlusion of the CT; Figure 1), in agreement with what was previously shown by Athanzio *et al.* (2008). However, there is no classification in the literature about the different patterns of renal colonization in rats or in other reservoirs of leptospirosis. These findings may be related to particularities of each individual regarding the transmission route, bacterial load, immune response, or environmental factors that influence the infection.

HE revealed preservation of renal tissue architecture. A small degree of cell degeneration was evidenced by the presence of tubular amorphous pink material. Other find-

ings were the presence of a small degree of hyaline droplet degeneration and a minimal amount of inflammatory infiltrate, agreeing with renal pathology previously described by De Faria *et al.* (2007).

We have characterized the colonization aspects in the kidneys of rat reservoirs of leptospirosis. The heterogeneity of colonization patterns, regardless of age or sex, suggests the possible influence of other host or environmental

factors affecting animal maintenance of leptospirosis. This study will contribute to the better understanding of the pathology and pathogenesis of *L. interrogans* in host reservoirs.

Aknologments

We thank Prof. Albert Ko, Dr. James Childs and Fleur Porter for study design; Dr. Daniel Athanzio and Dr. Eduardo Ramos for assistance with histopathology; the staff of the Zoonosis Control Center of Salvador and the Service of Histotechnology of CPqGM/FIOCRUZ for technical assistance. This work was supported by Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), the Secretariat of Health Surveillance of the State of Bahia, the National Institutes of Health (grants: R01 AI052473, R01 TW009504, R25 TW009338), and the Wellcome Trust (102330/Z/13/Z).

References

- Athanzio DA, Silva EF, Santos CS *et al.* (2008) *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop* 105:176-180.
- Brasil Ministério da Saúde (2012) Indicadores e Dados Básicos para a Saúde - Brasil. Ministério da Saúde, Brasília.
- Chagas-Junior AD, da Silva CLR, Soares LM *et al.* (2012) Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints vs. Real-time PCR. *PLoS One* 7:e32712.
- Costa F, Porter F, Rodrigues G *et al.* (2014) Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus and *Bartonella* spp. among Norway Rats (*Rattus norvegicus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 14:33-40.
- Croda J, Figueira CP, Wunder EAJr *et al.* (2008) Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the *LigB* gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect Immun* 76:5826-5833.
- De Faria MT, Athanzio DA, Ramos EAG *et al.* (2007) Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J Comp Pathol* 137:231-238.

Gouveia E, Metcalfe J, de Carvalho AL *et al.* (2008) Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14:505-508.

Ko AI, Reis MG, Dourado CMR *et al.* (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 354:820-824.

Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14:296-326. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG *et al.* (1995) Methods for

Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic

Sesting. Services USDoHaH Ed. Atlanta.

Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE (2009) Review Paper: Host- Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Vet Pathol* 46:792-799.

Porter FH, Costa F, Rodrigue G *et al.* (2015) Morphometric and demographic differences between tropical and temperate Norway rats (*Rattus norvegicus*). *J Mammal* 96:317-323.

Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM *et al.* (2008) Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e228.

Associate Editor: Marina Baquerizo

All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a

Creative Commons License CC BY-NC.