

AVALIAÇÃO DA PROVA DE IMUNOPEROXIDASE COMO RECURSO DIAGNÓSTICO NA LEPTOSPIROSE ANIMAL

M.C.S. Haanwinckel*, J. Megid, L.C. Souza

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Distrito de Rubião Júnior s/nº, CEP 18600-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: crishane@ibb.unesp.br

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as técnicas de imunoperoxidase indireta comparativamente à impregnação pela prata (Warthin Starry), e isolamento bacteriano em hamsters, visando sua utilização em tecidos provenientes de animais suspeitos de leptospirose. Foram utilizados 60 hamsters adultos distribuídos em grupo A constituído por 40 hamsters inoculados com a *Leptospira pomona* grupo B composto por 20 animais não inoculados. Os animais de ambos grupos foram submetidos ao isolamento bacteriano, imunohistoquímica em cortes e impressões em lâminas, coloração através da técnica de Warthin Starry e através da coloração pela Hematoxilina-Eosina. As técnicas imunohistoquímicas apresentaram elevada sensibilidade (100%) e especificidade (100%) em detectar o agente nos tecidos renais dos hamsters infectados, entretanto em cortes histológicos a preservação da arquitetura celular favoreceu a integridade estrutural do antígeno quando comparados as impressões em lâminas. A técnica de Warthin Starry também apresentou elevada sensibilidade, embora não seja considerada técnica sorovar específica. Com cerca de 77,5% de amostras positivas, resultados de cultivo apresentaram-se inferiores às técnicas descritas acima quanto à sensibilidade em detectar leptospirosas provenientes de tecidos renais.

PALAVRAS-CHAVE: Imunoperoxidase, *Leptospira pomona*, diagnóstico, hamsters.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE AS A DIAGNOSTIC RESOURCE IN ANIMAL LEPTOSPIROSIS. The indirect immunoperoxidase technique was evaluated comparatively to the silver impregnation technique (Warthin Starry) and bacterial isolation in hamster aiming at their use on tissues of leptospirosis-suspected animals. Sixty adult hamsters were divided in group A corresponding to animals inoculated with *Leptospira pomona* and group B to 20 non-infected animals. Kidneys of all animals were submitted to bacterial isolation, immunohistochemistry in paraffin embedded kidney section and glass slide imprints, and Warthin Starry and Hematoxylin-eosin staining. The immunohistochemistry techniques demonstrated high sensitivity (100%) and specificity (100%). Compared to slide imprints, in tissue sections the preservation of the cellular architecture was maintained as well as the structural integrity of the antigen. High sensitivity and specificity were also observed in the Whartin Starry technique although it is not considered to be a serovar specific technique. Positive culture results were obtained in 77.5% of the samples demonstrating lower sensitivity compared to the other techniques.

KEY WORDS: Immunoperoxidase, *Leptospira pomona*, diagnostic, hamsters.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica que acomete animais e o homem, causada por uma espiroqueta do gênero *Leptospira* e representadas pelas espécies *Leptospira interrogans*, *L. inadai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* e *L. weilii* (patogênicas), *L. fainei*, *L. alexandri*

L. meyeri, *L. wolbachii* e *L. biflexa* (saprófita). Estas modificações ainda não foram totalmente reconhecidas pelos subcomitês de classificação taxonômica para *Leptospira* (RAMADASS apud LEE *et al.*, 2000; PLANK & DEAN, 2000).

Entre as espécies de interesse econômico os suínos e bovinos caracterizam-se como principais responsáveis pela disseminação da doença entre o homem e os

*Bolsista FAPESP.

animais. Os sorovares mais freqüentemente encontrados nesses animais são pomona, canicola, icterohaemorrhagiae e hardjo. Presentes de forma isolada ou em conjunto, determinam graus variados de lesões nos tecidos infectados (MORSE *et al.*, 1957; MICHNA & CAMPBELL, 1969; ELLIS, 1976a; ARRIAGA *et al.*, 1982; PRESCOTT *et al.*, 1988; NAGY, 1993).

As alterações celulares decorrentes da presença das leptospiros em tecidos de eleição do agente como rins e fígado, podem ser visualizadas através da prova de Hematoxilina Eosina. Nos rins, os túbulos distais e proximais podem se apresentar dilatados em presença de edema intersticial proeminente, sobretudo na junção córtex-medula. Áreas com infiltrados inflamatórios incluem linfócitos, histiócitos, e poucos eosinófilos em alguns casos em volta dos glomérulos (BRITO, 1968).

A resposta humoral é o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose. No início da infecção, imunoglobulinas do tipo IgM são sintetizadas para o controle da infecção. Após vários dias, um segundo grupo de imunoglobulinas, as IgG provocam lise das leptospiros circulantes através da opsonização resultando na remissão dos sinais clínicos, sendo verificado no entanto persistência do agente nos rins e trato reprodutivo, podendo ser eliminadas na urina por vários meses após a infecção. (COSTA *et al.*, 1981; FAINE, 1994; ALT & BOLIN, 1996).

O diagnóstico da leptospirose animal tem como base de investigação os aspectos clínicos, epidemiológicos, e provas laboratoriais. (SANTA ROSA, 1970; MICHNA & CAMPBELL, 1969).

A técnicas de impregnação pela prata como a técnica de Levadite e a Warthin Starry são utilizadas rotineiramente na identificação de alguns tipos de espiroquetas; entretanto alguns inconvenientes como problemas de estabilidade dos reagentes, custo elevado, falhas em identificar microorganismos ou seus produtos antigênicos principalmente quando em meio intracelular e coloração de estruturas não identificadas como leptospiros, podem limitar sua utilização (ALVES, 1987; SCANZIANI *et al.*, 1989). Alguns autores, entretanto, referem ótima estabilidade, menor custo e tempo no processamento da técnica de Warthin Starry quando comparada a outras provas argênticas (ABDU & SLEIGHT, 1965; TRIPATHY & HANSON, 1974; BRITO, 1996; MICHIMA & CAMPBELL, 1969).

A imunohistoquímica tornou-se em curto espaço de tempo recurso diagnóstico para a identificação de constituintes teciduais ou celulares através da interação antígeno-anticorpo. Tais anticorpos marcados através de sua conjugação com enzimas, ou substâncias fluorescentes, permitem localizar determinantes antigênicos em tecidos fixados e processados por métodos convencionais (NAKANE & PIERCE, 1966; AVRAMEAS, 1970), sendo igualmente adequados em cortes, esfregaços ou cultivo de tecidos

(WACHSTEIN & MEISEL, 1964; KURSTAK, 1971; HEYDERMAN, 1979; HSU *et al.*, 1981; GIMENO, 1995).

As técnicas que utilizam enzimas (peroxidase) como marcador geralmente tem custo menos elevado, sendo possível a visualização do agente mesmo quando este se apresenta fragmentado ou em presença de outras bactérias, desde que a fixação tenha sido feita de forma correta, sendo uma técnica alternativa à utilização da imunofluorescência que pode apresentar artefatos decorrentes de substâncias fluorescentes e qualidade inferior na conservação morfológica dos tecidos (MASON *et al.*, 1969; SCANZIANI, 1991).

A presença de antígenos leptospiricos tanto em cortes como em impressões em lâminas submetidos a imunoperoxidase (IPA), foi demonstrado em 22,2% de material proveniente de impressões e 94,4% em cortes histológicos, os menores percentuais talvez possam ser justificados pela distribuição ao acaso dos antígenos nos túbulos, o que dificulta, em alguns casos a visualização em tecidos fixados que concentram poucas leptospiros (ELLIS *et al.*, 1983). Entretanto, em outros trabalhos foram encontrados 100% de positivos em cortes renais de animais experimentalmente infectados, (ALVES *et al.*, 1986). SCANZIANI (1991), verificou que a sensibilidade e especificidade da prova imunohistoquímica foi de 78% e 100% respectivamente, sendo tais resultados superiores ao cultivo. A IPA pode ser um importante instrumento para o diagnóstico da leptospirose em biópsias ou materiais de necropsia submetidos rotineiramente à histopatologia (ELLIS *et al.*, 1983; ALVES, 1987).

O objetivo do presente trabalho foi a avaliação das técnicas de visualização e o cultivo quando a sensibilidade em detectar leptospiros em tecidos renais, observando as alterações teciduais em presença do antígeno, assim como visualizar a possibilidade da imunoperoxidase indireta como recurso diagnóstico da leptospirose em tecidos de animais com suspeita clínica da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Como modelo experimental foram utilizados 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*) divididos em 2 grupos, grupo A infectado com a *Leptospira* sorovar pomona além do grupo B (controles negativos), não inoculados.

Para produção do anticorpo primário utilizado nas provas de imunoperoxidase, 3 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foram submetidos a inoculações seriadas com o sorovar pomona, (MYERS, 1985; FAINE, 1994; PASSOS *et al.*, 1988) onde a fração globulinica utilizada como anticorpo primário foi separada dos outros componentes séricos através da utilização de sulfato de amônio.

Meios de cultivo

O meio de cultivo Fletcher (Difco laboratories) em presença da *Leptospira* sorovar *pomona* foi utilizado para provocar a infecção experimental nos hamsters, na hiperimunização dos coelhos e nas provas de cultivo. O Meio de EMJH (Difco laboratories) foi utilizado para a manutenção das leptospiros utilizadas na absorção com o anticorpo primário, cujas preparações seguiram técnica de SANTA ROSA (1970).

Técnicas utilizadas

Isolamento

Os cultivos foram realizados segundo a técnica da pipeta Pasteur, Passos *et al* (1988). Animais controle negativos não infectados também foram submetidos à técnica com o objetivo de verificar a sanidade destes animais em relação à leptospirose.

Hematoxilina-Eosina

Utilizada para a observação das alterações celulares em presença de leptospiros foi realizada segundo BEHMER *et al.* (1976).

Técnica argêntica de Warthin Starry

Realizada conforme YOUNG (1969), foi utilizada para a visualização direta das leptospiros em cortes de tecidos renais de hamsters infectados e controles negativos.

Imunoperoxidase indireta

Foi efetuada conforme ELLIS *et al*, (1983), na pesquisa de antígenos de leptospiros em impressões e cortes de tecidos renais de hamsters infectados e em controles negativos (Quadro 1). Em presença de substrato a ocorrência ou ausência de coloração foi identificada como positiva (+) ou negativa (-) conforme visualização qualitativa observada nas amostras analisadas.

Quadro 1 - Reação imunohistoquímica (imunoperoxidase) (para utilização em impressões ou cortes).

1. Remoção da parafina imergindo as lâminas durante cinco minutos em xilol I e xilol II, álcool I, álcool 95%, álcool 50% e água destilada.
 2. Destruir a peroxidase tecidual imergindo as lâminas em H_2O_2 (água oxigenada) à 10% em metanol absoluto por 30min em temperatura ambiente.
 3. Lavar as lâminas em solução de lavagem por 2 x 10min.
 4. Bloquear receptores não específicos cobrindo as impressões ou cortes histológicos com soro de suíno normal (SSN) diluído a 1:20 em Tris-PBS (TRIS em solução tamponada de fosfatos) por 15min.
 5. Aplicar o anti-soro de coelho anti-leptospira diluído a 1:80 em suspensão renal de hamsters não infectados com pH 7.6, incubando a seguir em câmara úmida a 37° C por 30min.
 6. Lavar com solução de lavagem por 2 x 10min.
 7. Bloquear receptores não específicos com SSN por 5 min.
 8. Aplicar a imunoglobulina suína anticoelho marcada com peroxidase (DAKO-Sigma Diagnostics) a 1:200 em Tris-PBS 0,01 M em pH 7.6, incubando em câmara úmida a 37° C por 20 min.
 9. Lavar 2 x 10 min com tampão lavagem.
 10. Revelar com solução-substrato de tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) por 3 a 5 min preparada no momento do uso.
 11. Interromper a reação lavando cuidadosamente as lâminas em água corrente durante 5 min.
 12. Contracoloração com hematoxilina de Mayer (Sigma Diagnostics) por 2 min, deixando a seguir em água corrente durante 10 min.
 13. Desidratação em álcool 50%, 95%, álcool absoluto I e II e Xilol I e II.
 14. Montagem em resina PERMOUNT (Fisher Chemical-Fisher Scientific)
- Obs: Nas impressões de lâminas, são eliminadas as etapas 1 e 13

ReagentesS:

- Preparar a solução de H_2O_2 a 10% em metanol absoluto, 30 min antes da utilização.
- Solução lavagem: Tris-PBS 1:8 em salina normal
- Soro de suíno normal (não reagente a antígenos leptospiricos), preparado a 1:20 em Tris-PBS
- Suspensão renal de hamsters não infectados preparado a 1:5 em Tris-PBS

• Preparação do substrato DAB:

Solução A: Adicionar 6 miligramas (mg) de DAB em 10 mL de Tris-PBS

Solução B: Utilizar 10 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 10 mL de Tris-PBS.

Adicionar 1 mL da solução B em 9 mL da solução A e utilizar imediatamente na reação.

Em todas as técnicas de visualização os campos foram observados através de microscópio de Campo Claro (Carl Ziess) com objetiva de 40X e 100X (imersão).

Controle da Especificidade

Objetivando a redução de reações inespecíficas que podem ocorrer devido a inespecificidade do anticorpo ou do método imunohistoquímico, o anticorpo primário foi diluído em solução contendo suspensão renal de hamsters normais e pré-incubado com leptospiros formalizadas antes de ser exposto aos tecidos e impressões renais de animais infectados e controles negativos (ELLIS *et al.*, 1983; ALVES, 1986; SCHALM *et al.*, 1975). Da mesma forma procedeu-se a omissão do anticorpo primário, sendo o mesmo substituído por solução tamponada de fosfatos (Tris-PBS) em determinada etapa do método imunohistoquímico (TAYLOR, 1978; ELLIS *et al.*, 1983).

Controles negativos

Hamsters do grupo B, não inoculados com leptospiros e que apresentaram resultados negativos em testes prévios de soroaglutinação microscópica.

Análise estatística

A análise estatística foi baseada no estudo da concordância dos resultados obtidos na reação de imunoperoxidase frente ao cultivo bacteriano através do coeficiente Kappa, com base em MACKINNON (2000).

RESULTADOS

A hiperimunização dos coelhos resultou em títulos entre 25.600 a 51.200 referentes ao sorovar *pomona*, considerados significativos em relação à produção de anticorpo primário que foi utilizado no experimento para detecção tecidual de leptospiros.

As alterações macroscópicas foram similares na maioria dos animais e consistiam basicamente de hemorragias nasais, genitais; em membranas mucosas e tecido subcutâneo; icterícia principalmente em rins, fígado, baço e pulmões; hipertrofia e congestão de fígado e baço; os rins apresentavam-se hipertróficos, congestos e particularmente friáveis. Os animais controle negativos não apresentaram quaisquer manifestações clínicas ou alterações macroscópicas.

As técnicas de visualização demonstraram 100% de positivos para as 40 amostras renais dos hamsters infectados na fase aguda da infecção, sendo observados, no entanto, diferenças na intensidade de coloração nas impressões e cortes histológicos dos animais 22 e 37, bem como nas impressões dos hamsters 25, 27 e 39. Através da técnica de isolamento foram encontrados 77,5% de amostras positivas nos rins dos hamsters infectados (Tabela 1). Os cultivos foram considerados positivos em média 7 dias após a semeadura, não sendo observado em nenhuma amostra analisada a presença de microorganismos oportunistas.

A antígeno se apresentava através da técnica de Warthin Starry como massas de aglomerados de cor negra ou isoladamente em forma de filamentos principalmente no lúmen e em volta da maioria dos túbulos contorcidos proximais, apresentando em média dois túbulos infectados por campo (Fig. 1).

Tabela 2. Resultados das provas da imunoperoxidase indireta (IPI) em impressões e cortes renais, Warthin Starry (WS) em tecidos renais e cultivo em meio semi-sólido de Fletcher. Hamsters infectados com *Leptospira* sorovar *pomona*, Botucatu, 2003.

Hamsters	Provas			
	Imunoperoxidase Indireta (Ipi)		Warthin Starry (W.S.)	Cultivo
	Impressões	Cortes		
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	-
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	-
9	+	+	+	+
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+

14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22 ¹	+ ²	+ ²	+	-
23	+	+	+	+
24	+	+	+	+
25	+ ²	+	+	+
26	+	+	+	-
27	+ ²	+	+	+
28	+	+	+	+
29	+	+	+	-
30	+	+	+	+
31	+	+	+	-
32	+	+	+	+
33	+	+	+	-
34	+	+	+	-
35	+	+	+	-
36	+	+	+	+
37	+ ²	+ ²	+	+
38	+	+	+	+
39	+ ²	+	+	+
40	+	+	+	+
Total	40 / 40	40 / 40	40 / 40	31 / 40
% / Positivos	100	100	100	77,5

positivo (+), negativo (-), percentagem (%), hamster com lesões macroscópicas pouco características (1), presença de coloração imunohistoquímica moderada (2).

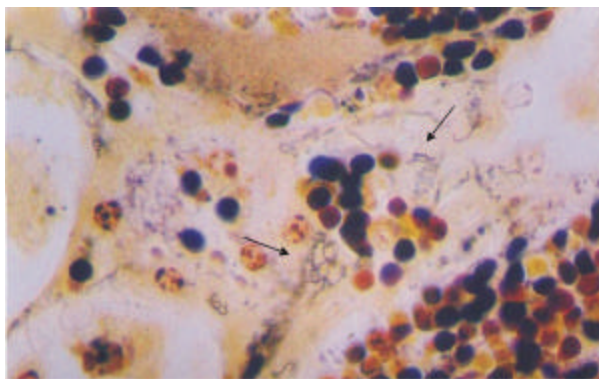


Fig. 1 - Fotomicrografia apresentando leptospiros (setas) em cortes de tecidos renais de hamster infectado com o sorovar *pomona*. Coloração de Warthin Starry, aumento (400X). Microscópio de Carl Zeiss.

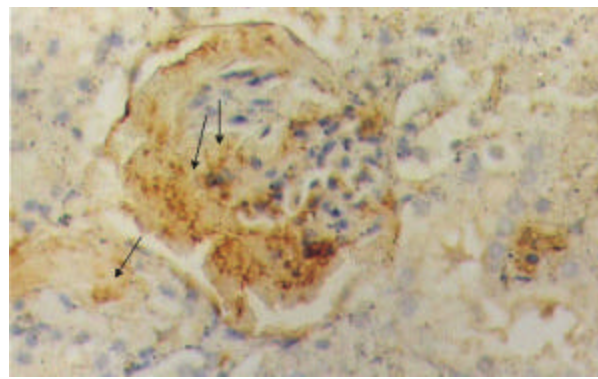


Fig. 2 - Fotomicrografia de impressões renais em presença do antígeno formando aglomerados corados em marrom em volta dos tecidos (setas). Técnica de imunoperoxidase indireta, aumento (400X). Microscópio Carl Zeiss.

O anticorpo primário utilizado para a prova de imunoperoxidase apresentou melhor desempenho quando diluído a 1:80, resultando em boa visualização do agente através de adequada coloração em lâminas, em conjunto com a ausência de colorações inespecíficas.

Nas impressões foi possível a observação do agente, sobretudo na periferia das lâminas de forma dispersa, principalmente, em locais onde ocorreram maiores danos celulares, como também formando agrupamentos de coloração marrom próximo às células epiteliais,

formando massas filiformes ou helicoidais muitas vezes de forma fragmentada contra um fundo levemente amarronzado contra as células epiteliais coradas em azul devido a hematoxilina. A apresentação das leptospiros de forma isolada era pouco freqüente (Fig. 2).

Nos cortes histológicos corados pela imunoperoxidase as leptospiros formavam massas de aglomerados filiformes de coloração marrom perfeitamente destacados do fundo azul corado pela hematoxilina, visíveis principalmente no lúmen e periferia dos túbulos, como também próximos a vasos sanguíneos e interstícios sendo raramente encontrados dispersos nos tecidos (Fig. 3). Em muitas áreas o agente se encontrava fragmentado.

Em cortes histológicos e impressões em lâminas pré-absorvidos com o antígeno, na ausência de anticorpo primário e em lâminas dos animais não inoculados não houve a presença de nenhuma coloração atribuída ao cromógeno DAB, sendo visualizadas apenas as células de fundo coradas em azul (Figs. 4 e 5).

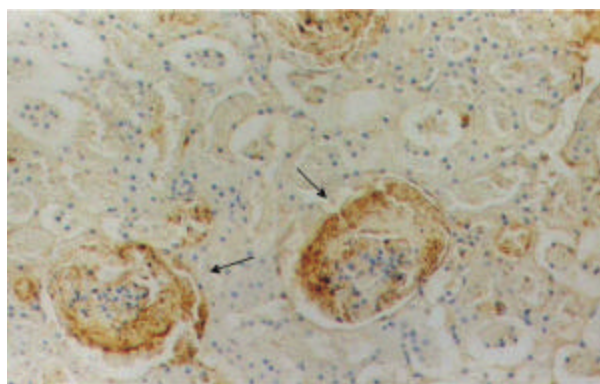


Fig. 3 - Fotomicrografia de corte renal de hamster infectado com o sorovar *pomona*. Presença de leptospiros principalmente em volta dos túbulos e glomérulos renais. Técnica de Imunoperoxidase Indireta, aumento (400X). Microscópio Carl Zeiss.

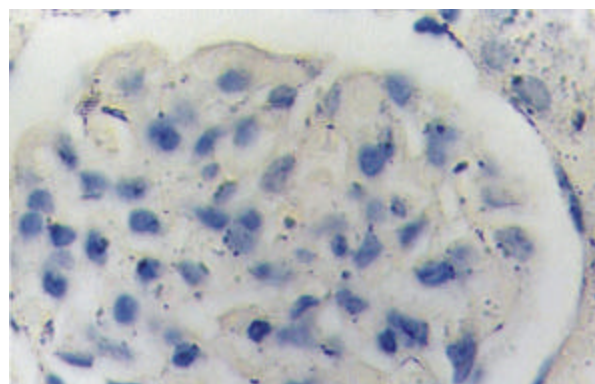


Fig. 4 - Fotomicrografia de impressão em lâmina de tecido renal de hamster inoculado com o sorovar *pomona*, e submetido à absorção com leptospiros formalizadas. Observa-se a ausência de coloração do cromógeno diaminobenzidina (DAB). Imunoperoxidase indireta, aumento (400X).

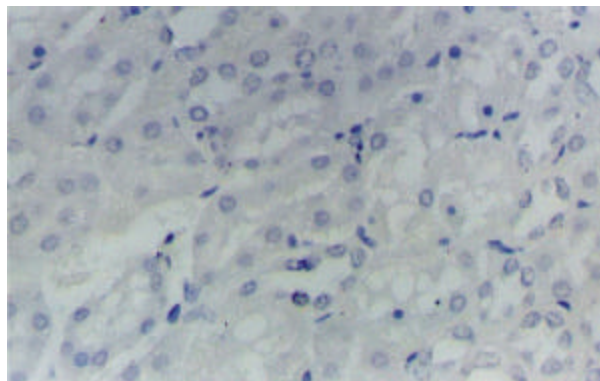


Fig. 5 - Fotomicrografia de corte renal em rim de hamster sadio onde não foi observada presença de coloração específica do cromógeno DAB. Imunoperoxidase indireta, aumento (1000X). Microscópio Carl Zeiss.

A intensidade e o grau das alterações macroscópicas e celulares observadas nos tecidos dos hamsters infectados com o sorovar *pomona*, através da hematoxilina e eosina caracterizaram-se por edema, hemorragia e congestão presentes em todas as 40 amostras, mesmo em presença de resultados negativos no isolamento em meio de cultivo. Em 24 animais, ocorreu a formação de cilindros hialinos indicativo de lesão tubular grave, em 18 amostras foi observada a presença de alguns infiltrados inflamatórios principalmente próximos a vasos sanguíneos. O animal 22 apresentou poucas alterações celulares embora tenha sido observada presença de congestão nos campos observados.

Nenhum hamster referente ao grupo de animais controles negativos apresentaram quaisquer alterações histopatológicas sendo também negativos nas técnicas de Warthin Starry, imunoperoxidase em cortes de tecidos, impressões em lâminas e cultivo.

Tabela 2 - Concordância dos resultados das técnicas de visualização bacteriana (Imunoperoxidase Indireta em cortes e impressões e Warthin Starry) frente ao cultivo bacteriano. Botucatu, 2003.

Visualização	Cultivo bacteriano		
	positivo	negativo	Total
positivo	31	9	40
negativo	0	20	20
Total	31	29	60

Análise estatística

Observou-se total concordância dos resultados da Imunoperoxidase Indireta em cortes e tecidos frente à

coloração de Warthin Starry, não tendo sido necessário realizar análise estatística dos resultados obtidos entre estes métodos. Entretanto, resultados negativos em animais infectados, foram observados em cultivo caracterizando falsos negativos na técnica. A análise estatística dos resultados de cultivo frente às técnicas de visualização caracterizou um valor de Kappa de 0,656 demonstrando elevada concordância entre as técnicas (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A indução experimental da Leptospirose em hamsters caracteriza esta espécie animal, como modelo experimental para a forma aguda dessa enfermidade, aspecto também observado por FERGUSON *et al.* (1957), ABDU & SLEIGHT (1965), ALVES *et al.* (1992) e CAMARGO *et al.* (1993).

Nos cortes histológicos, a forma de apresentação das leptospirosas, a coloração e sua disposição nos tecidos, foram semelhantes às encontradas por ALVES *et al.* (1986) e SCANZIANI (1991). A menor coloração observada nas lâminas dos animais 27 e 37 pode estar relacionada à distribuição ao acaso das leptospirosas nos tecidos fixados, que as torna ausentes em alguns campos observados, conforme também relatado por TAYLOR (1978) e ELLIS *et al.* (1983). As mesmas diferenças de intensidade de coloração foram observadas em algumas impressões, e pode ser justificado, além da distribuição ao acaso das leptospirosas por características próprias da técnica, que impossibilitam a visualização de detalhes teciduais onde houve formação do complexo imune, aspecto menos freqüente em cortes de tecidos, fato esse também relatado por ZAMORA *et al.* (1995a) e ELLIS *et al.* (1983).

Os altos níveis de positividade observados através da imunohistoquímica nas impressões em lâminas, foram também relatados por TRIPATHY & HANSON (1974), bem como a forma e disposição do agente nessas impressões também relatado por TAYLOR (1978), ELLIS *et al.* (1983), ALVES *et al.* (1986) e SCANZIANI (1991), que consideram amostras positivas mesmo quando o agente se encontrava fragmentado e (ou) apresentando-se de forma dispersa nas amostras analisadas. Entretanto, estes resultados são discordantes dos apresentados por STERNBERGER *et al.* (1970), SCANZIANI *et al.* (1989) e ZAMORA *et al.* (1995 a,b) que referem a visualização do antígeno claramente nos tecidos apresentando-se de forma isolada preservando sua morfologia na ausência de alterações ou quaisquer sinais de distorções, mesmo em virtude de dificuldades de visualização de detalhes morfológicos apresentadas geralmente em técnicas que utilizam impressões em lâminas.

A visualização e disposição das leptospirosas observadas nas impressões de lâminas, mesmo quando

não foi possível caracterizar o antígeno na sua forma íntegra, denota positividade em virtude da presença de coloração dada pelo cromógeno diaminobenzidina. Os resultados positivos foram fundamentados nos testes de especificidade a que foram submetidas às amostras analisadas, conforme também relatado por TAYLOR (1978), ELLIS *et al.* (1983) e SCANZIANI (1991).

A sensibilidade e especificidade da técnica imunohistoquímica utilizando a peroxidase foi confirmada através da não coloração dos cortes e impressões através do tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) em consequência da omissão do anticorpo primário, absorção do mesmo com leptospirosas formalizadas e ausência de reação nos controles negativos. Resultados também verificados por STERNBERGER *et al.* (1970), TAYLOR (1978), ALVES *et al.* (1986) e ELLIS *et al.* (1983) utilizando pelo menos um dos métodos presentes nesse trabalho.

O diagnóstico da leptospirose através da imunoperoxidase em impressões de lâminas possui vantagens adicionais em relação aos cortes devido a não necessidade de técnicas especiais para o preparo e conservação dos tecidos, rapidez na execução, praticidade dos reagentes empregados, e execução imediata da técnica quando do envio de material suspeito, conforme também constatado por TRIPATHY & HANSON (1974), BEHMER *et al.* (1976), TAYLOR (1978), ELLIS (1983) e ROBINSON *et al.* (1990).

Os altos níveis de amostras positivas na prova de Warthin Starry foram também relatados por HAMDY & FERGUSON (1957), ABDU & SLEIGHT (1965), DOZSA & SAHU (1970), TRIPATHY & HANSON (1974), POONACHA *et al.* (1993) e BRITO (1996). Tais observações, entretanto, não coincidem com os trabalhos de ALVES (1987) e SCANZIANI *et al.* (1989) que referem falhas quanto à eficácia da técnica em definir morfológicamente o agente, relacionando tal fato à fase crônica da enfermidade ou interferência dos reagentes empregados.

O isolamento das leptospirosas utilizando a técnica da pipeta Pasteur em meio semi-sólido de Fletcher isento de microorganismos oportunistas, foi menos eficiente que as técnicas de visualização. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por MAESTRONE (1963) e SCANZIANI (1991) que observaram que além de não ser sorovar específica, esta técnica pode acarretar presença de microorganismos contaminantes que inibem o crescimento adequado das leptospirosas.

As alterações celulares observadas através da técnica de hematoxilina-eosina são conseqüentes à lesão tubular grave por efeito direto das toxinas bacterianas ou mesmo pelo complexo imune formado nesses locais, conforme relatado por MICHNA & CAMPBELL (1969) que atribuem tais alterações aos mecanismos de patogenicidade referentes à adaptabilidade do sorovar infectante às células do hospedeiro e capacidade do mesmo em escapar aos mecanis-

mos imunes específicos e não específicos produzidos pelo hospedeiro em relação ao sorovar infectante.

A imunohistoquímica tanto em cortes como em impressões demonstrou praticidade no processamento como também elevada estabilidade dos reagentes utilizados desde que respeitados parâmetros de temperatura, pH e concentração adequados. Portanto, por se tratar de um método de fácil execução e que demanda pouco tempo de preparação, possui amplas possibilidades de utilização na rotina diagnóstica em conjunto a outras técnicas, principalmente na investigação quanto à presença de leptospiros em amostras de tecidos provenientes de fetos abortados ou animais suspeitos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro. Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos e a Bióloga Zenaide Maria de Moraes do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. Ao Prof. Dr. Hélio Langoni do Laboratório de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDU, M.T.F. & SLEIGHT, S.D. Pathology of experimental *Leptospira pomona* infection in hamsters. *Cornell Vet.*, v.55, p.74-86, 1965.
- ALT, D.P. & BOLIN, C. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* sorovar *pomona* infection in hamsters and swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, p. 59-62, 1996.
- ALVES, V.A.F.; VIANNA, M.R.; YASUDA, P.H.; DE BRITO, T. Detection of Leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J. Pathol.*, v.159, p.123-131, 1987.
- ALVES, V.A.F.; YASUDA, P.H.; YAMASHIRO, E.H.; SANTOS, R.T.M.; YAMAMOTO, L.U.; DE BRITO, T. An immunohistochemic assay to localize Leptospire in tissue specimens. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, p.170-173, 1986.
- ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; CAMARGO, C.R.A.; MACEDO, N.A.; MORAIS, Z.M.; NÜRMBERGER JUNIOR, R.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA NETO, J.S. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.29, p.193-199, 1992.
- ARRIAGA, A.J.D.; ROCHA, A.S.; YASUDA, P.H.; DE BRITO, T. Morpho-funcional patterns of kidneys injury in the experimental leptospirosis of the guinea-pig (*L. icterohaemorrhagiae*). *J. Pathol.*, v.138, p.145-161, 1982.
- AVRAMEAS, S. Immunoenzyme techniques: Enzymes markers for the localization of antigens and antibodies. *Int. Vet. Cytol.*, v.2, p.349-385, 1970.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDART/EDUSP, 1976. .1. 259p.
- BRITO, T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. *Rev. Int. Med. Trop.* v.10, p.1001-1003, 1968.
- BRITO, M.P.T. Intestinal spirochetosis first cases reporter in Brazil and the use of immunohistochemistry as an aid in histopathological diagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, p.45-53, 1996.
- CAMARGO, C.R.A.; VASCONCELLOS, S.A.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; PASSOS, E.C.; MORAIS, Z.M.; VISINTIM, J.A. Investigação sobre a presença de leptospiros nos ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar *pomona*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.2, p.129-135, 1993.
- COSTA, A.V.; SILVEIRA, I.C.; MIRANDA-FILHO, G.; SILVA, V.V.; CALDAS, E.M.; BRITO, E.; SAMPAIO, M.B. Estado imunológico na leptospirose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, v.41, p.93-100, 1981.
- DOZSA, L. & SAHU, S. Endometrial changes in nonpregnant ewes infected with *Leptospira pomona*. *Cornell Vet.*, v.60, p.254-264, 1970.
- ELLIS, W.A. The isolation of a leptospire from an aborted bovine fetus. *Vet. Rec.*, v.99, p.458-459, 1976a.
- ELLIS, T.M.; ROBERTSON, G.M.; HUSTAS, L.; KIRBY, M. Detection of leptospire tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.*, v.68, p.364-367, 1983.
- FAINE, S. *Leptospira and leptospirosis*. Boca Raton: CRC-Press, 1994. 353p.
- FERGUSON, K.L.C.; RAMGE, J.C.; SANGER, V.L. Experimental bovine leptospirosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.18, p.43-49, 1957.
- GIMENO, E.J. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada   patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7. & ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 1., 1995, Belo Horizonte, MG. *Anais*. Belo Horizonte: 1995. p.85.
- HAMDY, A.H. & FERGUSON, L.C. Virulence of *Leptospira pomona* in hamsters and cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.18, p.35-42, 1957.
- HEYDERMAN, E. Immunoperoxidase technique in histopathology applications methods, and controls. *J. Clin. Pathol.*, v.32, p. 971-978, 1979.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP). *Proc. J. Histochem. Cytochem.*, v.29, p.577-580, 1981.
- KURSTAK, E. The immunoperoxidase technique localization of visual antigens in cells. *Methods Virol.*, v.5, p.423-444, 1971.
- LEE, S.H.; KIM, K.A.; PARK, Y.G.; SEONG, I.W.; KIM, M.J.; LEE, Y.J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* sorovar *lai*. *Gene*, v.254, p.19-28, 2000.

- MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic test and inter-rater agreement. *Computer Biol. Med.*, v.30, p.127-134, 2000.
- MAESTRONE, G. The use in improved fluorescent antibody procedure in the demonstration of *Leptospira* in animal tissues. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, v.27, p.109-112, 1963.
- MASON, T.E.; PHIFER, R.F.; SPICER, S.S.; SWALLOW, R.A.; DRESKIN, R.B. An immunoglobulin enzyme bridge method for localizing tissue antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, v.17, p.563-569, 1969.
- MICHNA, S.W. & CAMPBELL, R.S.F. Leptospirosis in pigs: epidemiology, microbiology and pathology. *Vet. Rec.*, v.84, p.135-138, 1969.
- MORSE, E.V.; MORTER, R.L.; LANGHAM, R.F.; LUNDBERG, A.M.; VIREY, D.E. Experimental ovine leptospirosis, *Leptospira pomona* infection. *J. Infect. Dis.*, v.101, p.129-136, 1957.
- MYERS, D.M. *Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis*. OPS: Centro Panamericano de Zoonoses, 1985. (Nota Técnica, n 30.)
- NAGY, G. Comparative pathogenicity study of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* strains. *Acta. Vet. Hung.*, v.41, p. 315-324, 1993.
- NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B. Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, v.14, p.929-931, 1966.
- PASSOS, E.C.; VASCONCELOS, S.A.; ITO, F.O.; YASUDA, P.H.; NÜRMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de *Leptospiras* a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo *pomona*: Emprego das técnicas de Pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meio de cultura de Fletcher tratado com 5-fluor-uracil ou sulfato de neomicina. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, v.25, p.221-235, 1988.
- PLANK, R. & DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microb. Infect.*, v.2, p. 1265-1276, 2000.
- POONACHA, K.B.; DONAHUE, J.M.; GILES, R.C.; HONG, C.B.; PETRITES-MURPHY, M.B.; SMITH, B.J.; SVERCZEK, T.W.; TRAMONTIN, R.R.; TUTTLE, P.A. Leptospirosis in equine fetuses stillborn foals and placentas. *Vet. Pathol.*, v.30, p.362-369, 1993.
- PRESCOTT, J.F.; MILLER, R.B.; NICHOLSON, V.M.; MARTIN, S.W.; LESNICK, T. Seroprevalence and Association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Can. J. Vet. Res.*, v.52, p.210-215, 1988.
- ROBINSON, G.; ELLIS, I.O.; MACLENNAN, K.A. Immunocytochemistry. In: BENGOF, D.Y. & SLOVENS, A. (Eds.). *The theory and practice of histological techniques*. 3.ed. Edimburg: Churchill Livingstone, 1990. p.413-435.
- SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, v.1, p.97-109, 1970.
- SCANZIANI, E.; SIRONI, G.; MANDELI, G. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. *Vet. Pathol.*, v.26, p.442-444, 1989.
- SCANZIANI, E. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.50, p.229-232, 1991.
- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. *Veterinary hematology*. 3. ed. Philadelphia: Lea Febiger, 1975. 807p.
- STERNBERGER, L.A.; HARDY, P.H.; CUCULIS, J.J.; MEYER, H.G. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, v.18, p.315-333, 1970.
- TAYLOR, C.R. Immunoperoxidase techniques: Practical and theoretical aspects. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.102, p.113-121, 1978.
- TRIPATHY, D.N. & HANSON, L.E. Immunoperoxidase staining of leptospires. *Appl. Microbiol.*, v.27, p.268-269, 1974.
- WACHSTEIN, M. & MEISEL, E. Demonstration of peroxidase activity in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, v.12, p.538-544, 1964.
- YOUNG, B.J. A reliable method for demonstrating spirochaetes in tissue sections. *J. Med. Lab. Technol.*, v. 26, p.248-252, 1969.
- ZAMORA, J.; REDENMANN, S.; CABEZAS, X.; VEGA, S. Comparación de cuatro técnicas microscópicas para el diagnóstico de leptospirosis en roedores silvestres en el área rural de Valdivia, Chile. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v.37, p.267-272, 1995a.
- ZAMORA, J.; REDERMAN, S.; CABEZAS, X.; LOVERA, P. Leptospirosis de roedores silvestres en el área rural de Valdivia. Pesquisa de *Leptospira interrogans* mediante imunofluorescencia e imunoperoxidase. *Arch. Med. Vet.*, v.24, p.115-118, 1995b.

Recebido em 14/7/04

Aceito em 30/8/04