

PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-*LEPTOSPIRA*

LEAL, L.M.¹; MINEIRO, A.L.B.B.²; SILVA, L.S.³; BEZERRA, E.E.A.⁴;
CARVALHO, S.M.²; SILVA, S.M.M.S.⁵; CARVALHO, F.A.A.⁶; COSTA, F.A.L.⁷

RESUMO: A resposta humoral é o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose. O coelho é uma espécie muito usada, devido à conveniência do tamanho, facilidade de manuseio, vida relativamente longa (5 – 8 anos) e volume de anti-soro produzido. A utilização de anticorpo policlonal ou monoclonal para detecção de *Leptospiras* pelo método de imunoperoxidase tem sido realizado em alguns estudos por ser uma técnica de alta sensibilidade e especificidade. Este trabalho teve como objetivo produzir anticorpo policlonal anti-*Leptospira* em coelhos para detecção de *Leptospira* e antígeno de *Leptospira* em tecido de rim, fígado e pulmão de hamster e de rim de ovino experimentalmente e naturalmente infectado por *Leptospira interrogans*, respectivamente. Foram imunizadas com vacina comercial e experimental, e adjuvante completo e incompleto de Freund, oito coelhas com faixa etária de três a cinco meses e o soro por elas produzido foi centrifugado a 5.000 g e estocado a -20°C. O material em parafina de tecido de rim, fígado e pulmão de hamster e ovino foram submetidos à técnica de imunoistoquímica apresentando melhor diluição de 1:400 e tempo de revelação de três minutos e meio. Nesta diluição pode-se observar a mais intensa e uniforme coloração marrom, característica da reação de imunoistoquímica, com a menor coloração inespecífica (background).

INTRODUÇÃO

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, imunoglobulinas do tipo IgG provocam lise das leptospiras circulantes e opsonizam as leptospiras para que sejam fagocitadas por macrófagos, resultando na remissão dos sinais clínicos. Contudo, o agente persiste nos rins e trato reprodutivo, podendo ser transportado na urina por vários meses após a infecção. (COSTA et al., 1981; FAINE, 1994; ALT & BOLIN, 1996).

Métodos de investigações imunoquímicas, utilizando anticorpos, podem ser usados na identificação e quantificação de microrganismos específicos ou seus antígenos. Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), camundongos (*Mus musculus*) ou grandes mamíferos são comumente empregados para produção de soro hiperimune policlonal ou monoclonal. Estas imunoglobulinas (IgGs) tem sido usadas com sucesso em vários estudos imunopatológicos e clínicos com a finalidade de investigação científica, diagnóstico e tratamento (SCHADE, et al., 1997 apud PRUDÊNCIO et al., 2003).

- 1- Aluna de graduação de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí UFPI
- 2- Aluna de Doutorado em Ciência Animal – UFPI
- 3- Aluna de Mestrado em Ciência Animal – UFPI
- 4- Médico Veterinário Autônomo
- 5- Professor Doutor em Patologia Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (CCA/DCCV)
- 6- Professor Doutor adjunto da UFPI, Departamento de Bioquímica e Farmacologia (CCS/DBF)
- 7- Professor Doutor Associado em Patologia Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (CCA/DCCV)

O coelho é uma espécie muito usada, devido a conveniência do tamanho, facilidade de manuseio, vida relativamente longa (5 – 8 anos) e volume de anti-soro produzido (HANLY, et al 1995).

A utilização de anticorpo policlonal ou monoclonal para detecção de *Leptospiras* pelo método de imunoperoxidase, em tecido de animais infectados tanto natural quanto experimentalmente, tem sido realizado em alguns estudos (YENER; KELES, 2001; ALVES, et al., 1992). Por ser uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, apresenta vantagens em relação a detecção de *Leptospiras* por cultura (HAINES; CLARK, 1991) e por impregnação pela prata, visto que estas técnicas são pouco sensíveis (MAXIE, 1993).

As técnicas que utilizam enzimas (peroxidase) como marcador geralmente têm custos menos elevados, 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).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas oito coelhas da raça Holandesa, na faixa etária de três a cinco meses, mantidas no Biotério Setorial do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI), com água e ração à vontade. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos para imunização.

O grupo I foi inoculado vacina comercial e o grupo II foi inoculado vacina experimental, por via intramuscular e venosa, contendo culturas inativadas de *Leptospira*. Os antígenos utilizados para imunização das coelhas foram: **1)** Leptospiro-vac B da Irfa, Vacina comercial polivalente líquida, inativada, contra os seguintes sorovares: *L. hardjo*; *L. icterohaemorrhagiae*; *L. wolffi*; *L. bratislava*; *L. pomona*; e **2)** Leptovac. Vacina experimental inativada contra os seguintes sorovares: *L. hardjo bovis*, *L. hardjo (C.T.G)*, *L. hardjo OMS* (Doadada pelo Laboratório de Leptospirose – Departamento de Medicina Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG).

O dia da primeira imunização, quatro de junho de 2008, foi estabelecido como dia zero. Nesse dia, cada coelha recebeu uma injeções de 1ml de vacina com o adjuvante, sendo as duas primeiras por via intramuscular e a dose subsequente por via venosa, em intervalos de 7 dias. A primeira dose conteve adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e as doses subsequentes adjuvantes incompleto de Freund (Pierce). Os animais foram sangrados no dia 25 de junho de 2008 e o sangue centrifugado a 5.000 g. O soro obtido por centrifugação será estocado a -20°C até o uso.

Para a realização da imunoistoquímica, o material testado consistiu de rim, fígado e pulmão de hâmmsteres e de rim de ovino experimentalmente e naturalmente infectado por *Leptospira interrogans*, respectivamente. O material em parafina foi desparafinado com xilol em estufa a 60°C. Em seguida procedeu-se a desidratação em soluções crescentes de álcool etílico e ao bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,03% em metanol, por 30 minutos no escuro. O desmascaramento de antígeno foi realizado em forno de microondas (Sanyo, Brasil), em solução Tris HCl pH 1.0, sucessivamente por 10 e 5 minutos. Em seguida os tecidos foram incubados em câmara úmida "overnight" a 4°C com o anticorpo primário.

O controle negativo foi feito com a substituição do anticorpo primário por solução salina tamponada com fosfato pH = 7,2 (PBS). Realizou-se etapas de amplificação da reação com o sistema "EnVision+" Anti-Rabbit, de acordo com protocolo preconizado pelo fabricante (Dako Corporation), em incubações em câmara úmida a 37°C intercaladas por lavagens em PBS. A revelação foi feita com 30 mg de DAB (3,3-diaminobenzidina) em 100ml de PBS, filtrado em papel filtro e adicionado 200µl de peróxido de hidrogênio (Sigma Chemical, USA) a 30%. Contracoloração com hematoxilina de Harrys (Sigma Chemical, USA) por 30 segundos e em seguida os tecidos em lâmina foram desidratados em álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool absoluto. Para finalizar, as lâminas foram montadas com Entellan.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais foram adquiridos no comércio de Teresina, em idade de três a cinco meses e mantidos em gaiola apropriada, recebendo água e alimentação à vontade durante todo o experimento.

O anti-soro obtido foi separado em alíquotas de 1,0 ml e conservado em freezer a -20° C. Para testar a melhor titulação do anticorpo foram feitas diluições sucessivas de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 em tecido parafinado de hamster (rim, fígado e pulmão) infectado experimentalmente e em tecido parafinado (rim) de ovino naturalmente infectado por *Leptospira interrogans*.

O anticorpo produzido reagiu com todos os tecidos de hamster e de ovinos infectados, não tendo sido observado reação com os tecidos controles negativos. A melhor titulação do anticorpo foi observada na diluição de 1:400, com revelação de três minutos e meio. Nesta diluição pode-se observar a mais intensa e uniforme coloração marrom, característica da reação de imunoistoquímica, com a menor coloração inespecífica (background).

Antígeno de leptospira foi observado no rim, na parede dos vasos, em células epiteliais dos túbulos distais, antígenos em células glomerulares e no mesângeo. Em fígado, antígeno estava presente nos hepatócitos e em células mononucleares do infiltrado inflamatório periportal e centrolobular. No pulmão o antígeno estava presente no septo interalveolar. Não foi observado marcação nos tecidos nas reações controle.

A produção de anticorpos vem se constituindo uma importante ferramenta de diagnóstico quando aplicada para a identificação e caracterização de populações celulares e moléculas marcadoras de distúrbios orgânicos e para a identificação de agentes infecciosos em tecidos (HANLY et al., 1995). Convencionalmente, a identificação de patógenos em doenças infecciosas tem sido feita, primariamente, pelo uso de ensaios sorológicos e técnicas de cultivo. Contudo, resultados sorológicos podem ser de difícil interpretação em casos de imunossupressão ou quando somente uma amostra é disponível para avaliação. Por outro lado, tecido fresco nem sempre é disponível para realização de cultura e muitos microorganismos são difíceis de crescerem em cultura e podem levar semanas ou meses para obtenção de resultados. Alguns microrganismos apresentam características morfológicas distintas que permitem a sua identificação em tecido fixado em formalina, mas muitas vezes são difíceis ou mesmo impossível de serem identificados por métodos de coloração convencional (DABBS, 2002). Nas duas últimas décadas o uso de anticorpos associado à técnica de imunoistoquímica tem alcançado

um crescimento explosivo, especialmente devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Tais anticorpos marcados com enzimas, ou substâncias fluorescentes, permitem localizar determinantes antigênicos em tecidos fixados e processados por métodos convencionais (NAKANE & PIERCE, 1966), sendo igualmente adequados em cortes, esfregaços ou cultivo de tecidos (KURSTAK, 1971; HEYDERMAN, 1979; GIMENO, 1995).

Entre as doenças infecciosas, alguns estudos têm avaliado o uso da imunistoquímica em tecidos infectados por espiroquetas (TRAVEJO et al., 1998). Usando técnica de recuperação de antígeno, antígenos de leptospiras podem ser detectados em tecido fixado em formalina. Quando corada por imunoperoxidase, leptospiras e seus antígenos podem ser facilmente visualizadas (FAINE, 1999), como foi observado no presente trabalho.

A técnica 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 leptospiras, podem limitar sua utilização (ALVES, 1987; SCANZIANI *et al.*, 1989), o que faz da produção de anticorpos para uso em técnicas de imunistoquímica, uma ferramenta de diagnóstico de doenças infecciosas de grande importância pelo seu baixo custo e fácil execução.

CONCLUSÃO

O anticorpo produzido apresentou ótima reação com tecidos de vários órgãos de hamsters e de ovinos infectados por *Leptospira sp.*, com detecção de antígeno e de leptospiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p 580.
- ALT, D.P. & BOLIN. C. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar *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. et al. Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage. **Exp.Toxic.Pathol.**, v. 44, p.425-34, 1992.
- COSTA, A.V.; SILVIO, I.C.; M IRANDA-FILHO, G.; SILVA, V.V.; C ALDAS, E.M.; BRITO, E.; SAMPAIO, M.B. Estado imunológico na leptospirose. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v.41, p.93-100, 1981.

- EYZAGUIRRE E, WALKER DH. Immunohistochemistry of infectious disease. In: dabbs dj. Diagnostic immunohistochemistry. **Churchill Livingstone**. Philadelphia. p.640-650, 2002
- FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. **WHO**, Gêneva, 1999
- FAINE, S. *Leptospira and leptospirosis*. **Boca Raton**: CRC Press, 1994. 353p.
- GIMENO, E.J. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada à 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.
- HAINES, D.M.; CLARK, E.G. Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. **Can. Vet.J.**, v.32, p. 295-02, 1991.
- HANLY, W.C.; ARTWOHL, J.E.; BENNETT, B.T. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. **ILAR journal**, v. 37, n.3, p.93- 132, 1995.
- HEYDERMAN , E. Immunoperoxidase technique in histopathology applications methods, and controls. **J. Clin. Pathol.**, v.32, p. 971-978, 1979.
- KURSTAK, E. The immunoperoxidase technique localization of visual antigens in cells. **Methods Virol**, v.5, p.423-444, 1971
- 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.
- MAXIE, M.G. The urinary system. IN: JUBB; K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. Londres: Academic Press, 1993. Cap.5, v. 2, p.447-538, 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.
- PRUDÊNCIO, C.R. et al. Produção de soros policlonais em galinhas para a detecção de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, suplemento 3, 2003.
- 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.

- SCANZIANI, E.; SIRONI, G.; MANDELI, G. Immunoperoxidase studies on leptospiral nephritis of swine. **Vet. Pathol.**, v.26, p.442-444, 1989.
- TRAVEJO RT, RIGAU-PEREZ G, ASHFORD DA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage. **J Infect Dis**, v.178, p1457-1463, 1998.
- YENER, Z.; KELES, H. Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. **J. Vet. Med. A**, v. 48, p. 441-47, 2001.