

Uso da imuno-histoquímica no diagnóstico de leptospirose em primatas neotropicais

Role of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Leptospirosis in Neotropical Primates

Marta Regina Grumann¹, Zigomar da Silva², Flávia Serena da Luz², José Roberto Silva Filho¹, Tanise Policarpo Machado², Marcio Machado Costa³, Maria Isabel Botelho Vieira^{1,4} & Adriana Costa da Motta^{1,2}

ABSTRACT

Background: Leptospirosis is considered the most widespread zoonosis worldwide, occurring more frequently in tropical and developing regions. The aim of the present study was to detect the presence of *Leptospira* spp. in different primate tissues, using immunohistochemical (IHC) assays, taking advantage of the considerable number of necropsies compatible with a diagnosis of leptospirosis in neotropical primates at the Animal Pathology Laboratory (APL) of the University of Passo Fundo (UPF) in the northern region of Rio Grande do Sul.

Materials, Methods & Results: Paraffin-embedded primate tissue samples were selected from necropsy examinations and subjected to IHC. The streptavidin-biotin-peroxidase method was used with diaminobenzidine chromogen (DAB) to verify immunostaining. Of the 101 primates tested for *Leptospira* spp., 51.48% were positive; staining was distributed between lung (76.92%), liver (44.23%), and kidney (32.69%) tissue. Analysis of the combined anatomopathological verification data of the studied organs revealed a high frequency of lesions commonly observed in the tissues of animals exposed to the pathogen. For complementary diagnosis, an anti-*Leptospira* spp. antibody test was performed in primates at the UPF-Zoo, from which a population of the necropsied animals originated. The microscopic agglutination test (MAT) was utilized, which demonstrated 90.47% positivity in 21 individuals; sejiro and panama were the most frequent serovars.

Discussion: Different intensities of tissue immunostaining were observed. Areas of fragmented or diffuse staining were considered to indicate equal positivity to that indicated by areas of staining with preserved morphology. Of 52 *Leptospira*-positive primates, most presented some degree of staining in lung samples, which shows a high level of involvement for this organ in primate leptospirosis. Conventional pathological diagnostic methods do not allow for issue antigen recognition, thus making the IHC technique important to facilitate conclusive antigen sample verification. In the liver, leptospires were detected mostly between the sinusoids, hepatocytes, and Kupffer cells. In kidney tissues, staining indicated small agglomerates in the tubular lumen, interstitium, and glomeruli. All these forms of presentation have been previously reported. Considering that we detected the highest number of positive samples in lung tissue, followed by those from liver and kidney tissue, we argue that the IHC technique, when applied to samples of these three tissues, decreases the chance of false negatives. Anatomopathological studies of primate leptospirosis are scarce. In dogs, renal lesions are characterized by the necrosis and degeneration of tubular epithelium, cellular debris, and hyaline cylinders. In the liver, hepatocyte cord dissociation and biliary pigment accumulation within the canaliculi and hepatocellular necrosis are observed. These findings are similar to those from our study. In the lung, diffuse alveolar lesions are reported, with hemorrhage and edema, in addition to capillaritis. The high frequency of *Leptospira*-positive animals determined by serological examination was consistent with the IHC findings, thus confirming the pathogen's high prevalence in neotropical primate populations in the studied region. Serological surveys on primate populations have already been carried out and have revealed frequency and serovar variations between regions. Immunohistochemical examination allows the detection of leptospires in various tissues and should be used based on the characteristics of the investigated case.

Keywords: diagnosis, infectious disease, leptospirosis, primate, pathology, zoonosis.

Descritores: diagnóstico, doença infecciosa, leptospirose, primata, patologia, zoonose.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade de vasta distribuição que acomete, além dos animais silvestres, animais domésticos e o homem, assumindo um caráter zoonótico e epidêmico, com maior frequência em regiões de clima tropical e em desenvolvimento [4]. A ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp., bem como um amplo número de sorovares, já foram identificados em populações de primatas neotropicais, *in situ* e *ex situ*, os quais podem atuar como portadores assintomáticos [7,16]. Os danos às células endoteliais de capilares estão ligados à causa básica das manifestações clínicas e lesões, envolvendo danos renais, hepáticos, miocárdicos e pulmonares [15].

O diagnóstico postmortem de leptospirose é um desafio para os patologistas, visto que o método convencional para o diagnóstico, a impregnação pela prata utilizando a técnica de Warthin-Starry (WS) é passível de resultados duvidosos [1]. Para casos em que durante a necropsia não há suspeita da doença, porém, observam-se lesões sugestivas através do exame histopatológico, a imuno-histoquímica (IHQ) é indicada e apresenta uma boa especificidade [13].

Foi descrito, no presente trabalho, o diagnóstico de leptospirose em 52 primatas através da IHQ, assim como a caracterização da distribuição da *Leptospira* spp., nos tecidos de primatas neotropicais. Além disso, foi apresentado o perfil sorológico em uma população de 21 primatas, fonte de uma boa parte dos animais necropsiados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Imuno-histoquímica

Devido a um número significativo de casos sugestivos de leptospirose observados em primatas neotropicais, necropsiados no Laboratório de Patologia Animal da Universidade de Passo Fundo (LPA-UPF), foram estudados, a partir do arquivo de blocos, os primatas encaminhados para necropsia, entre os anos 2000 e 2014. A seleção dos casos foi baseada nos seguintes critérios: sintomatologia e/ou lesões macro/micro compatíveis com leptospirose, disponibilidade dos blocos de parafina e grau de autólise dos tecidos.

Para realização da IHQ foram selecionados blocos de fígado, rins e pulmão para pesquisa de *Leptospira* spp. [9,18]. Sequencialmente, os blocos de parafina foram submetidos ao método da

streptavidina-biotina-peroxidase, acrescentando o cromógeno diaminobenzidina (DAB) para verificar as imunomarcações. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-*Leptospira* HRP conjugado ViroStat1 (código 401) na diluição de 1:100. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina e analisados em microscópio óptico por dois observadores. O controle positivo foi inserido a partir de tecido renal de um cão previamente testado, sorologicamente, e confirmado através da técnica de IHQ.

Verificação anatomopatológica

Os dados obtidos na necropsia e no exame histopatológico, com a coloração de rotina hematoxilina e eosina (HE), foram revisados e compilados a fim de estabelecer uma frequência absoluta e relativa para estas informações.

Inquérito sorológico

Com o intuito de determinar o perfil sorológico de uma das populações acometidas, da qual foi obtido acesso, buscou-se complementar as informações obtidas pela IHQ.

Foram coletadas amostras de sangue de 21 primatas, 17 da espécie *Sapajus nigritus*, três *Alouatta guariba* e um *Sapajus apella*, cativos do Zôo da Universidade de Passo Fundo (UPF). Para a colheita das amostras, foi realizado o procedimento padrão de contenção física, utilizando-se puçá e luvas de couro. A venopunção foi realizada através da femoral, obtendo-se 3 mL de sangue de cada animal. As amostras foram centrifugadas e os soros separados em alíquotas.

Para a análise de anticorpos anti-*Leptospira* spp., as amostras foram acondicionadas e submetidas à técnica de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) [6], com antígenos vivos, a qual permitiu testar os seguintes sorovares: *andamana*, *australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *balun*, *canicola*, *castellonis*, *celledoni*, *cynopteri*, *copenhageni*, *djasiman*, *gripphotyphosa*, *hardjo*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *panama*, *patoc*, *pomona*, *pyrogenes*, *sejroe*, *shermani*, *tarassovi* e *wolffi*.

Análise estatística

A partir dos dados obtidos, através da IHQ, anatomopatologia e sorologia, a estatística descritiva foi utilizada para verificar a frequência absoluta (total) e a frequência relativa (percentual) dos resultados.

RESULTADOS

Imuno-histoquímica

Dos 101 primatas que foram testados para *Leptospira* spp., 52 apresentaram marcação, totalizando 51,48% positivos.

Entre os 52 que apresentaram positividade, 40 apresentaram imunomarcagem no pulmão (76,92%), 23 no fígado (44,23%) e 17 nos rins (32,69%). Em 24 casos, a marcação era, simultaneamente, em dois ou mais órgãos (46,15%). Além destes, 18 apresentaram imuno-reatividade somente no pulmão (34,61%), oito no fígado (15,38%) e dois nos rins (3,84%).

As marcações observadas estavam distribuídas de forma única ou distinta no mesmo tecido conforme apresentadas na Tabela 1.

Verificação anatomopatológica

Os achados de necropsia consistiram de mucosas pálidas em 63,46% (33/52) dos casos, congestas 21,15% (11/52), ictéricas 19,23% (10/52) ou hiperêmicas 17,30% (9/52); icterícia no tecido subcutâneo

23,07% (12/52) e/ou edema 11,53% (6/52), e líquido sero-hemorrágico nas cavidades 36,53% (19/52).

No pulmão, do total de casos, constatamos edema em 71,15% (37/52), congestão 48,07% (25/52) e/ou hemorragia pulmonar 25% (13/52). Microscopicamente, pneumonia intersticial supurativa 40,38% (21/52), fibrinossupurativa 25% (13/52) ou não supurativa 13,46% (7/52); atelectasia 19,23% (10/52) e congestão 15,38% (8/52).

O fígado revelou acentuação do padrão lobular em 69,23% (36/52) dos primatas, icterícia 30,76% (16/52) e/ou áreas pálidas 23,07% (12/52). Microscopicamente, dissociação de hepatócitos 67,30% (35/52), colestase intra-hepatocitária 63,46% (33/52) e/ou intra-canalicular 17,30% (9/52), necrose hepatocelular 46,15% (24/52), degeneração 26,92% (14/52) e hepatite periportal não supurativa 25% (13/52).

Os rins apresentaram-se congestos 30,76% (16/52) ou pálidos 13,46% (7/52). Ao exame histopatológico, nefrose com cilindros hialinos 42,30% (22/52) e nefrite intersticial não supurativa 15,38% (8/52) foram os achados mais frequentes.

Tabela 1. Distribuição e frequência das imunomarcações, detectadas por IHQ, observadas em cada órgão analisado dos 52 primatas infectados por *Leptospira* spp, necropsiados no LPA da FAMV-UPF, Rio Grande do Sul, Brasil.

Órgão	Distribuição	Frequência absoluta	Frequência relativa
Pulmão	Interstício (Fig. 1A)	29/40	72,50%
	Capilares (Fig. 1B)	12/40	30%
	Macrófagos alveolares	12/40	30%
	Parede do bronquíolo	1/40	2,50%
Fígado	Entre sinusoides e hepatócitos (aderidas à membrana plasmática do hepatócito) (Fig.1C)	10/23	43,47%
	Vasos sanguíneos (capilares sinusoides e vasos sanguíneos do espaço porta)	4/23	17,39%
	Espaço porta	3/23	13,04%
	Junto à inflamação periportal	2/23	8,69%
	Células de Kupffer	2/23	8,69%
	Focos de inflamação	1/23	4,34%
Não identificado devido à autólise	1/23	4,34%	
Rins	Lúmen tubular	9/17	52,94%
	Interstício (Fig. 1D)	4/17	23,52%
	Glomérulos	3/17	17,64%
	Macrófagos intersticiais	1/17	5,88%

Inquérito sorológico

O teste sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. demonstrou positividade em 90,47% (19/21) dos primatas, apresentando-se, em sua maioria, sororreativos para mais de um sorovar e com titulações distintas. Os dois sorovares mais frequentes para esta população foram o *sejroe* e *panama*, com uma frequência de positividade pariforme de 20,83%; seguida de *andamana* com 18,75%; *autumnalis* com 12,50%; *wolffi* com 8,33%; *icterohaemorrhagiae* com 6,25%; *copenhageni* e *tarassovi* com 4,17%; *celledoni* e *castellonis* com 2,08%. As reações observadas e suas respectivas diluições constam na Tabela 2.

DISCUSSÃO

A IHQ mostrou-se eficaz no diagnóstico de leptospirose em primatas e deve ser utilizada de acordo com as características do caso a ser investigado. Ademais, a IHQ permite concluir o diagnóstico da enfermidade, além de possibilitar observar, com precisão, a distribuição do agente nos tecidos testados, encontrados com maior frequência no pulmão.

Diferenças de intensidade nas imunomarcações teciduais foram observadas nos cortes histológicos testados para *Leptospira* spp. Além disso, em algumas amostras, os agentes encontravam-se, aparentemente, fragmentados ou em marcação difusa, sendo consideradas igualmente positivas àquelas em que o agente encontrava-se com morfologia preservada, sem

distorções. Ambas as situações são passíveis de positividade [10,14,17]. Apesar de considerarmos positivas as imunomarcações difusas e as formas fragmentadas, destacamos a relevância da avaliação do tecido como um todo, visto que se trata de uma técnica com probabilidade de falhas [21].

No presente estudo, constatou-se que, em muitos casos, a *Leptospira* spp. foi observada somente em um dos órgãos testados. No entanto, os demais também apresentaram lesões compatíveis com leptospirose, embora nestes não houvesse imunomarcações [13]. A ausência da imunomarcação não determina a ausência do agente no tecido, pois muitas podem ser as razões que impedem tais reações, como por exemplo, a distribuição ao acaso das leptospiras nos tecidos fixados, levando à ausência do agente em alguns campos observados [10,14].

Entre os 52 primatas que apresentaram positividade na IHQ, a maior parte (76,92%) apresentou algum tipo de marcação no tecido pulmonar, o que demonstra um alto índice de acometimento deste órgão pela infecção por *Leptospira* spp. Tais marcações estavam presentes no interstício, capilares alveolares, macrófagos e parede do bronquíolo. Não obstante, os nossos resultados demonstrem uma maior diversidade na distribuição das marcações, estes ainda corroboram com a forma pulmonar grave da leptospirose em humanos, em que as reações imuno-histoquímicas revelaram marcações granulares sutis, demonstrando o agente

Tabela 2. Frequência de primatas soropositivos, sorovares prevalentes e respectivas diluições do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), aplicado em amostras sorológicas de primatas dos gêneros *Sapajus* sp. e *Alouatta* sp., cativos do Zôo da Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Sorovar	Diluição			
	100	200	400	
<i>sejroe</i>	8	2	-	10 (20,83%)
<i>panama</i>	8	1	1	10 (20,83%)
<i>autumnalis</i>	4	-	2	6 (12,50%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	-	3	-	3 (6,25%)
<i>andamana</i>	5	2	2	9 (18,75%)
<i>celledoni</i>	1	-	-	1 (2,08%)
<i>wolffi</i>	4	-	-	4 (8,33%)
<i>copenhageni</i>	-	2	-	2 (4,17%)
<i>castellonis</i>	-	1	-	1 (2,08%)
<i>tarassovi</i>	1	1	-	2 (4,17%)
	30 (62,50%)	12 (25,00%)	4 (8,33%)	48 (100%)

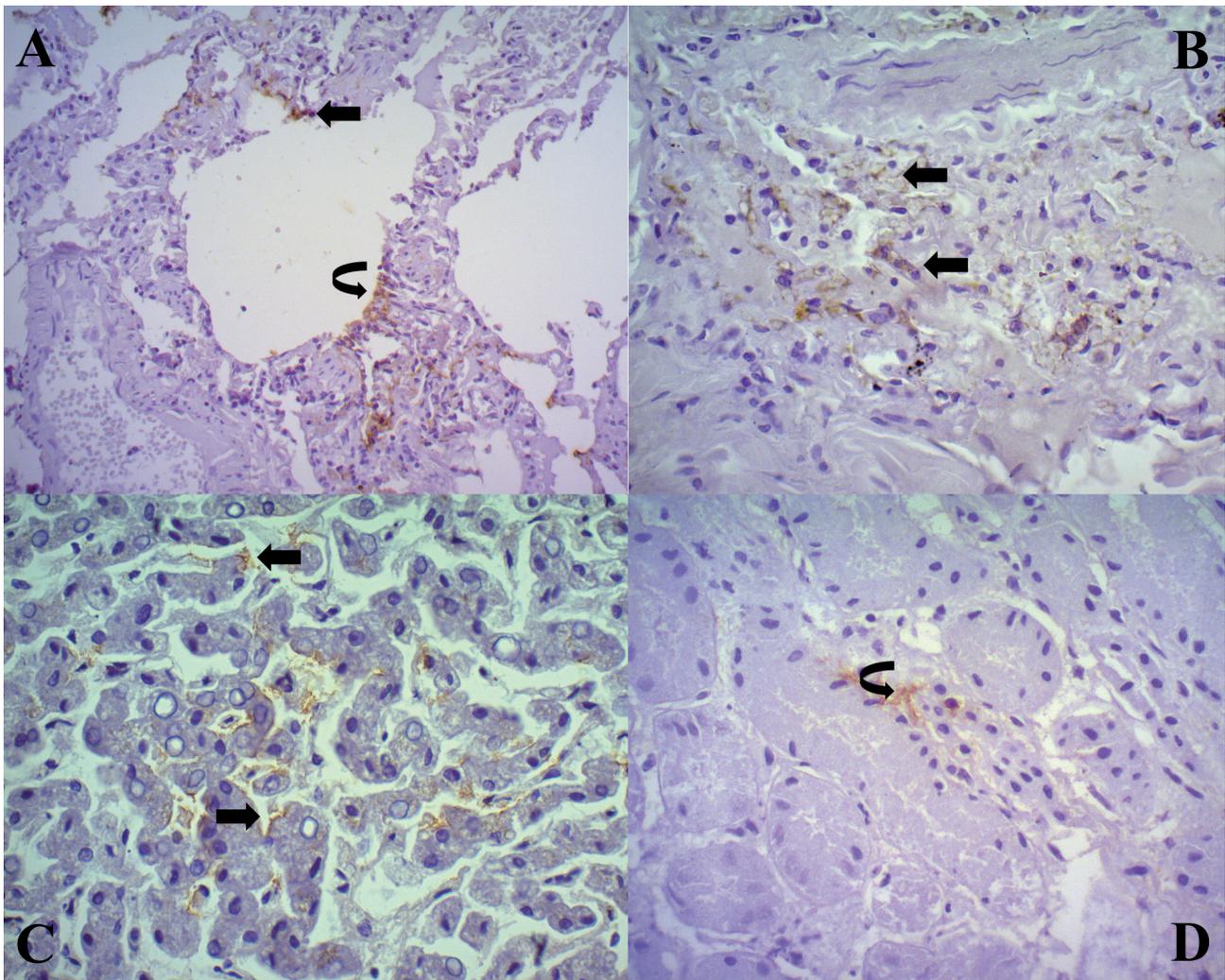


Figure 1. IHQ *Leptospira* spp. A- Pulmão. Imunomarcção no interstício (200X). B- Pulmão. Imunomarcção no interstício e macrófagos (400X). C- Fígado. Imunomarcção difusa entre sinusoides e hepatócitos (400X). D- Rim. Imunomarcção no interstício e células tubulares (400X).

engolfado por macrófagos, em septos e alvéolos [18]. Os métodos diagnósticos patológicos convencionais não possibilitam a detecção da *Leptospira* spp. no tecido pulmonar, destacando a importância da IHQ, tanto no diagnóstico como na evidência de antígenos do microrganismo nas áreas afetadas [10].

No fígado, detectamos as leptospirosas, em sua maioria, entre sinusoides, hepatócitos e nas células de Kupffer. Similarmente, em tecido hepático de cobaias, a presença de leptospirosas foi verificada não somente nas células de Kupffer, mas também aderidas à membrana plasmática dos hepatócitos [5].

As marcações que observamos nos tecidos renais formavam pequenos aglomerados de coloração marrom que, por vezes, encontravam-se dissociados e filiformes, localizados principalmente no lúmen tubular e, ocasionalmente, no interstício e glomerulos. Estas

formas de apresentação, marcação e disposição foram similares às observadas em outros estudos [2,14,17].

Quanto aos aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães, os rins foram os órgãos de eleição para a execução da IHQ e confirmação diagnóstica da doença [19]. Tendo em vista que detectamos o maior número de positivos no pulmão, seguido do fígado e tecido renal, defendemos que a técnica, quando aplicada a fragmentos desses três tecidos, diminui a chance de ocorrência de falsos negativos. Ademais, há uma peculiaridade em relação à patogenicidade para cada sorovar de *Leptospira* spp. Tal fator determina variações no curso clínico da enfermidade, assim como nas lesões e tecidos acometidos pelo patógeno [4].

As lesões mais comuns da leptospirose em diversas espécies, inclusive em fetos, consistem de

icterícia, acentuação do padrão lobular hepático, evidência das estriações corticais renais e hemorragia intestinal. Microscopicamente, na coloração de HE, observa-se dissociação de hepatócitos, degeneração e necrose hepatocelular, além de colestase, nefrite intersticial não supurativa e nefrose [19,22]. Estudos anatomopatológicos sobre leptospirose em primatas são escassos. Em cães, a enfermidade ocorre, principalmente, de forma aguda a subaguda com lesões renais caracterizadas por degeneração e necrose do epitélio tubular, debris celulares e cilindros hialinos obstruindo os túbulos e nefrite intersticial não supurativa com graus variados de intensidade do infiltrado. No fígado, observa-se dissociação dos cordões dos hepatócitos e acúmulo de pigmento biliar no interior dos canalículos, e necrose hepatocelular em alguns casos. No pulmão de cães com leptospirose relata-se lesão alveolar difusa com hemorragia e edema, além de capilarite, que consiste de agregados de neutrófilos no interior de microvasos [19]. Os achados anatomopatológicos, em nosso estudo, foram compatíveis com leptospirose e corroboram com a maioria dos achados supracitados.

A alta frequência de animais positivos, determinada pelo inquérito sorológico, foi consistente com os dados revelados pelo teste imuno-histoquímico. Assim, foi possível comprovar a alta prevalência do patógeno em populações de primatas neotropicais, na região estudada.

Inquéritos sorológicos já foram realizados em populações de primatas, apresentando variações de frequência e de sorovares entre regiões. Dentre estes, destacaram-se: *ballum*, *icterohaemorrhagiae*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *panama*, *pomona*, *tarassovi* e *canicola* [3]; *castellonis*, *copenhageni* e *grippotyphosa* [7]; *cynopteri*, *andamana*, *hebdomadis*, *copenhageni*, *patoc*, *cuíca*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *grippotyphosa* e *autumnalis* [8]. A biodiversidade da

Leptospira spp. em determinados ambientes é definida pelo clima, geografia e interações bióticas [20].

Embora alguns sorovares considerados mais patogênicos tenham sido detectados em maior diluição, os animais encontravam-se assintomáticos no momento da colheita de material, situação semelhante à descrita anteriormente [11,16]. As razões pelas quais alguns pacientes apresentam manifestações clínicas graves e outros a sintomatologia é nula ou moderada, ainda são desconhecidas e podem estar ligadas não somente às características do agente, mas também a fatores relacionados ao hospedeiro como os genéticos, nutricionais e imunitários, por exposição prévia à *Leptospira* spp.[12].

A IHQ permite detectar leptospiroses nos tecidos testados e deve ser utilizada de acordo com as características do caso a ser investigado.

CONCLUSÃO

A IHQ revelou eficácia no diagnóstico de leptospirose em primatas possibilitando observar, precisamente, a distribuição do agente nos tecidos. A partir dos dados evidenciados pela IHQ, aliado ao inquérito sorológico, comprovou-se a alta prevalência do patógeno em populações de primatas, tendo o pulmão como o órgão de predileção.

MANUFACTURER

¹Biogen Brasil Produtos Farmacêuticos Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

Acknowledgements. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Universidade de Passo Fundo (UPF), pelo apoio prestado.

Ethical approval. No tocante à pesquisa sorológica, esta foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Passo Fundo, RS, sob o parecer nº 006/2013 e registro nº 015/2012.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Adin C.A. & Cowgill L.D. 2000. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 casos (1990-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 216(3): 371-375.
- 2 Azizi S., Kheirandish R. & Rahimi E. 2014. Comparison of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect *Leptospira* spp. in kidneys of slaughtered cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 81(1): Art. #821, 6 pages. [Fonte: <http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v81i1.821>].
- 3 Baulu J., Everard C.O.R. & Everard J.D. 1987. Leptospire in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaues*) on Barbados. *Journal of Wildlife Disease*. 23(1): 60-66.

- 4 Bharti A.R., Nallyb J.E., Ricaldic J.N., Matthiasa M.A., Diazd M.M., Lovettb M.A., Levette P.N., Gilmanf R.H., Willigd M.R., Gotuzzoc E. & Vinetza J.M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*. 12(3): 757-771.
- 5 Brito T., Menezes, L.F., Lima D.M.C., Lourenço S., Silva A.M.G. & Alves V.A.F. 2006. Immunohistochemical and *in situ* hybridization of the liver and kidney in human leptospirosis. *Virchows Archives*. 448(5): 576-583.
- 6 Cole Junior J.R., Sulzer C.R. & Pursell A.R. 1973. Improved microtechnique for agglutination test. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25(6): 970-980.
- 7 Corrêa S.H.R., Vasconcellos S.A., Morais Z., Teixeira A.A., Dias R.A., Guimarães M.A.B.V.G., Ferreira F. & Ferreira Neto J.S. 2004. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41(3): 189-193.
- 8 Costa S.M. 2010. Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. e *Trypanosoma cruzi* em primatas neotropicais mantidos em cativeiro. 94f. Belém, PA. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Pará, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal Rural da Amazônia.
- 9 Cullen J.M. 2007. Liver, Biliary System and Exocrine Pancreas. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds). *Pathology Basis of Veterinary Disease*. 4th edn. St. Louis: Mosby Elsevier, pp.393-462.
- 10 Ellis T.M, Robertson G.M, Hustas L. & Kirbi M. 1983. Detection of leptospire in tissue using immunoperoxidase staining procedure. *Australian Veterinary Journal*. 60(12): 364-367.
- 11 Ferreira D.R.A., Laroque P.O., Wagner P.G.C., Higino S.S.S., Azevedo S.S., Rego E.W. & Mota R.A. 2011. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. em *Cebus* spp. mantidos em cativeiro no Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(11): 1019-1023.
- 12 Garcia-Vázquez E., Herrero J.A., Hernández A. & Gómez J. 2010. Leptospirosis. *Medicine*. 10(57): 3896-3902.
- 13 Girio R.J.S., Pereira F.L.G., Marchiori Filho M., Mathias L.M., Herreira R.C.P., Alessi A.C. & Girio T.M.S. 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. *Ciência Rural*. 34(1): 165-169.
- 14 Haanwinckel M.C.S., Megid J. & Souza L.C. 2004. Avaliação da prova de Imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. *Arquivos do Instituto Biológico*. 71(3): 293-301.
- 15 Hill M.K. & Sanders C.V. 1997. Leptospiral pneumonia. *Seminars in Respiratory Infections*. 12(1): 44-49.
- 16 Pimentel J.S., Gennari S.M., Dubey J.P., Marvulo M.F.V., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Silva J.C.R. & Evêncio Neto J. 2009. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 29(12): 1009-1014.
- 17 Scanziani E, Luini M., Fabbi M. & Pizzocaro P. 1991. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Research in Veterinary Science*. 50(2): 229-232.
- 18 Silva J.J., Dalston M.O., Carvalho J.E., Setúbal S., Oliveira J.M. & Pereira M.M. 2002. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(4): 395-399.
- 19 Tochetto C., Flores M.M., Kommers G.D., Barros C.S.L. & Figuera R.A. 2012. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(5): 430-443.
- 20 Vinetz J.M., Glass G.E., Flexner C.E., Mueller P. & Kaslow DC. 1996. Sporadic urban leptospirosis. *Annals of Internal Medicine*. 125(10): 794-798.
- 21 Ward J.M. & Rehm S. 1990. Applications of immunohistochemistry in rodent tumor pathology. *Experimental Pathology*. 40(4): 301-312.
- 22 Zachary J.F. 2013. Mecanismos das infecções bacterianas. In: Zachary J.F. & McGavin M.D. (Eds). *Bases da Patologia em Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.147-187.

