

DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEPTOSPIROSE POR DEMONSTRAÇÃO DE ANTÍGENOS ATRAVÉS DE EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO EM MÚSCULO DA PANTURRILHA.

David Everson UIP (1), Vicente AMATO NETO (1) & Maria Seixas DUARTE (2).

RESUMO

As dificuldades para estabelecer diagnóstico precoce e de certeza da leptospirose levaram-nos a analisar as alterações histopatológicas do músculo gastrocnêmio e avaliar, originalmente, a utilidade de método imuno-histoquímico, da peroxidase-antiperoxidase, quando desejada a demonstração do espiroquetídeo e de seus produtos no referido tecido.

O estudo histopatológico de biópsias da panturrilha configurou quadro de miosite, caracterizado pela correlação entre o infiltrado inflamatório intersticial e as anormalidades degenerativo-necróticas das fibras musculares. As lesões foram consideradas mínimas em 69,45% dos pacientes, moderadas em 19,45% e intensas em 5,55%, estando ausentes nos demais. Por seu turno, o método imuno-histoquímico enzimático identificou antígeno leptospirótico em 94,45%, configurando resultado muito expressivo.

UNITERMOS: Leptospirose; Diagnóstico precoce; Método imunohistoquímico; Músculo da panturrilha.

INTRODUÇÃO

Alterações histopatológicas da musculatura da panturrilha, concernentes à leptospirose, começaram a ser procuradas através de BEITZKJE⁽²⁾ e PICK⁽¹⁴⁾, que encontraram focos de hemorragia e degeneração parcial das fibras. JEGHERS et al.⁽¹⁰⁾ estudaram de maneira sistemática as anormalidades musculares presentes na esquiroleptose em apreço e a avaliação microscópica demonstrou a existência de necrose em poucas fibras, ao lado de acúmulo local das células mononucleares e plasmáticas, com leucócitos polimorfonucleares ocasionalmente. As fibras degeneradas estavam fragmentadas em massas arredondadas hialinas, ocorrendo restos celulares basofílicos e multinucleação do sarcolema, além da presença de vacuolização e hemorragia.

SHELDON⁽¹⁷⁾, concluiu que as lesões musculares poderiam ser consideradas típicas e sugeriu ser a biópsia do músculo da panturrilha útil para o

diagnóstico da doença de Weil.

Segundo GUEDES E SILVA et al.⁽⁹⁾, com base em 16 casos, tem lugar sobretudo infiltração hemorrágica dos focos necróticos e do interstício, necrose focal da fibra muscular e escassa reação inflamatória.

Quanto à fase aguda da doença, SADDY et al.⁽¹⁶⁾ demonstraram recorrendo a materiais de 14 pacientes, a constância das lesões parenquimatosas, as quais variaram desde a simples tumefação turva até a necrose com ruptura das fibras.

PEREIRA DA SILVA⁽¹³⁾, destacou que o distúrbio histopatológico fundamental do músculo gastrocnêmio correspondeu à necrose multifocal da fibra, acompanhada de infiltração hemorrágica. Considerou DUARTE⁽⁷⁾, como dano básico, o comprometimento segmentar das miofibrilas, com

Trabalho da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

(1) Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

(2) Laboratório de Investigação Médica- Patologia de Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: David Everson Uip; Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Av. Dr. Enecas de Carvalho Aguiar, 255 - CEP. 05403 São Paulo - Brasil.

topografia multifocal e frequentes manifestações hemorrágicas.

CARVALHO et al.⁽⁵⁾ constataram desordens degenerativas e regenerativas em fibras musculares de 12 casos fatais de leptospirose e chamaram a atenção para a formação de sincícios com padrão fusiforme; a infiltração hemorrágica, inclusive no interior da fibra e fibrose intersticial, esteve presente sem relação aparente com o tempo de evolução.

As tentativas de demonstração de leptospiras em músculo tiveram início em 1916, por intermédio de BEITZKE⁽²⁾ e da técnica de Levaditi.

PAES LEME et al.⁽¹²⁾, a seguir, fizeram uso de método de coloração de Wartin e Starry, tendo no gastrocnêmio de um doente encontrado estrutura filiforme, com aspecto espiralado, semelhante à leptospira, em região vizinha à necrose. Na pesquisa que realizaram, PINTO et al.⁽¹⁵⁾ não viram pelo método de Wartin e Starry o espiroquetídeo em 12 amostras musculares.

ELLIS et al.⁽⁸⁾, valendo-se da imunoperoxidase, detectaram antígenos de leptospira em 94,45% de 18 fragmentos de rins de porco.

ALVES et al.⁽¹⁾ demonstraram depósitos granulares e filamentosos de antígeno leptospirótico em espécimes de fígado e rim estudados a partir de biópsias e necrópsias humanas.

Por fim, BRITO et al.⁽⁴⁾, trabalhando com metodologia idêntica perceberam positividade, concernente ao coração de quase todos os camundongos experimentalmente infectados, sem encontro de depósitos no miocárdio de casos humanos.

Os objetivos das pesquisas, atinentes à leptospirose, que agora relatamos foram: a) avaliar as alterações histopatológicas do músculo gastrocnêmio, correlacionando o grau de intensidade das lesões degenerativas e/ou necróticas com a inflamação intersticial; (b) analisar a utilidade do método imuno-histoquímico da peroxidase-antiperoxidase, com anticorpo específico, para o diagnóstico específico e precoce, empregando fragmentos, retirados por biópsias, do tecido mencionado.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram considerados 36 pacientes com

leptospirose, internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As idades variaram de 14 a 70 anos, assim distribuídas: de 14 a 20 - nove; de 21 a 30 - nove; 31 a 40 - sete; de 41 a 50 - sete; de 51 a 60 - um; de 61 a 70 - três. Apenas três membros da casuística eram do sexo feminino. Dados clínicos básicos: dor nas panturrilhas e febre - 36; cefaléia - 27; sufusões hemorrágicas - 16; alteração do volume urinário - 14; óbito - 2.

O diagnóstico presuntivo ou conclusivo de leptospirose ficou estabelecido por meio de dados clínico-epidemiológicos e de exames inespecíficos ou específicos, correspondendo estes à soroprecipitação microscópica; à hemocultura em meio de Fletcher e à cultura de fragmentos de músculo gastrocnêmio. Frente à suspeita, ocorreram biópsia do músculo referido, coloração de todos os fragmentos pela hematoxilina-eosina LILLIE & FULMER⁽¹¹⁾ e avaliação à microscopia óptica. Fez-se a análise semiquantitativa das variáveis morfológicas, considerando-se desta forma a ausência ou a intensidade das anormalidades: 0 - ausência da variável; 1 - mínima; 2 - moderada; 3 - intensa. Outrossim, as seguintes variáveis morfológicas, relativas ao tecido muscular esquelético, mereceram apreciação: alterações de forma, volume e arquitetura da fibra muscular esquelética (atrofia, hipertrofia e núcleos centrais); alterações degenerativas da fibra muscular esquelética (tumefação turva, degeneração hialina, basofilia e perda da estriação); alterações irreversíveis (fragmentação do sarcoplasma, picnose nuclear, necrose e fagocitose; alterações intersticiais (edema, congestão vascular, polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos, macrófagos, plasmócitos, hemorragia, infiltração gordurosa e fibrose); alterações vasculares (tumefação endotelial, inflamação das paredes vasculares e trombose).

A estimativa imuno-histoquímica foi feita através do método da peroxidase-antiperoxidase (STERNBERGER et al.⁽¹⁸⁾). Para controle de positividade serviram: a) rins de cobaias sabidamente ricos em antígenos e experimentalmente infectados com leptospiras; b) pedaços de músculo da panturrilha, de indivíduos biopsiados e sabidamente positivos às leptospiras, por métodos histoquímicos convencionais. Como parâmetros de negatividade, usamos biópsias musculares de seis cardiopatas submetidos à revascularização miocárdica através de pontes de safena.

O anti-soro contra leptospira foi fornecido pela secção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (Drs. Paulo Yasuda e Elena Y. Sakata). Após absorção com pó de fígado de cobaia por 24 horas à 4°C (0.1 mg/pó/ml de soro) utilizou-se o anticorpo primário na diluição de 1/800.

Incubamos os controles positivos com anticorpo primário previamente absorvido com leptospiros e, constatando-se a negatividade da reação nos cortes processados, nós os utilizamos como controle negativo.

RESULTADOS

A reação de soro-aglutinação microscópica, efetuada sistematicamente em diferentes etapas da evolução, forneceu 80,55% de confirmações diagnósticas. Em relação a sete casos (19,45%) os informes sorológicos indicaram compatibilidade com a presença de leptospirose e essa presunção teve apoio em elementos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais inespecíficos.

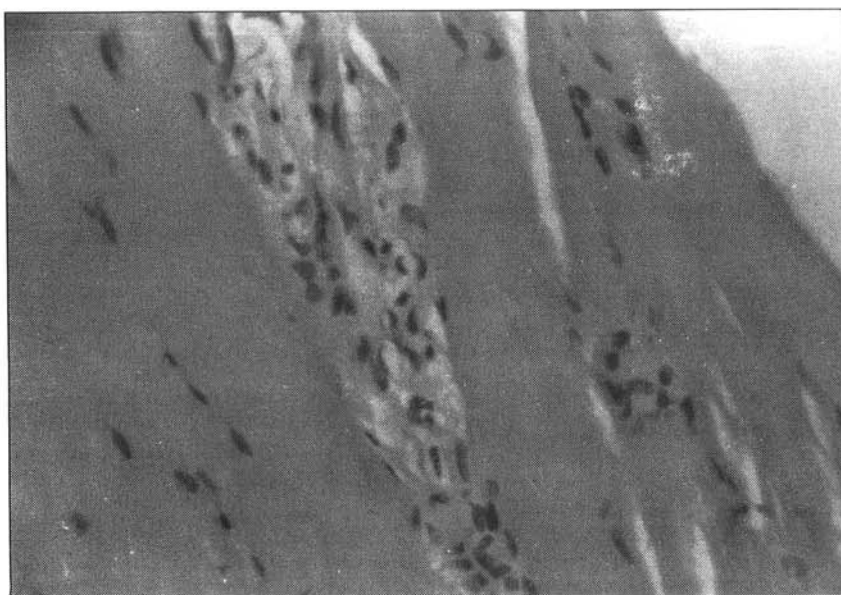
O sorotipo implicado em 47,25% das situações provavelmente correspondeu ao *icterohaemorrhagiae* e, em 5,55%, ao *javanica*, levadas em conta as coaglutinações; essa especificação não se tornou possível em 27,75%.

As hemoculturas, sempre realizadas, propiciaram 11,15% de positivities. A cultura do fragmento muscular nunca revelou leptospiros.

Encontramos alterações histopatológicas consideradas mínimas em 25 pacientes, (69,45%), moderadas, em sete (19,45%) (Figura 1) e intensas em dois (5,55%); ausência de alterações histológicas em dois (5,55%). As modificações vistas mais comumente configuraram a correlação de infiltrado inflamatório intersticial multifocal com lesões degenerativas de fibras, reversíveis ou irreversíveis.

O exame imuno-histoquímico localizou material positivo nas secções teciduais do músculo, demarcando três tipos de apresentação morfológica: filamentar - fortemente corado, presente no interstício e com dimensão semelhante à leptospira (Figura 2); granular - aparentemente livre no interstício ou presente no citoplasma das células macrofágicas (Figura 3); homogêneo - em que se visualizem células macrofágicas de citoplasma difusamente corado (Figura 4). Rotulamos a reação como positiva quando percebemos material filamentar isolado ou em combinação com as demais modalidades morfológicas. A positividade global registrada atingiu 94,45% (34 doentes).

Figura 1 - Miosite moderada, sendo perceptíveis fragmentação e necrose de fibra esquelética, com infiltrado inflamatório mononuclear, em músculo da panturrilha (HE, 400X).



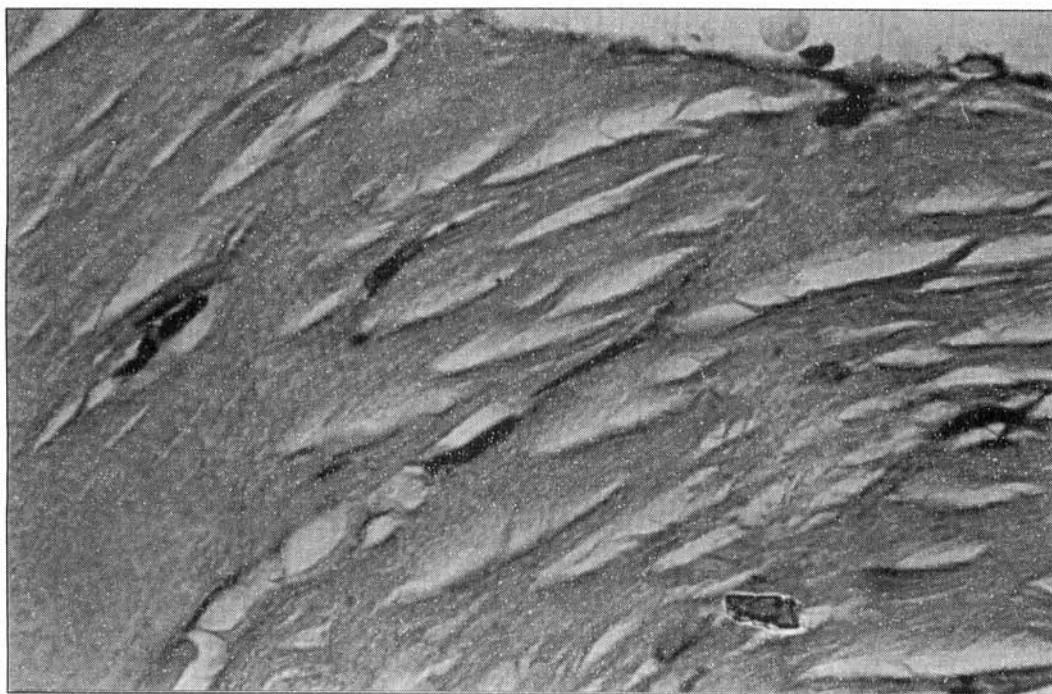


Figura 2 - Padrão filментар, evidenciado, pela técnica imunohistoquímica da peroxidase-antiperoxidase, em músculo da panturrilha (200X).

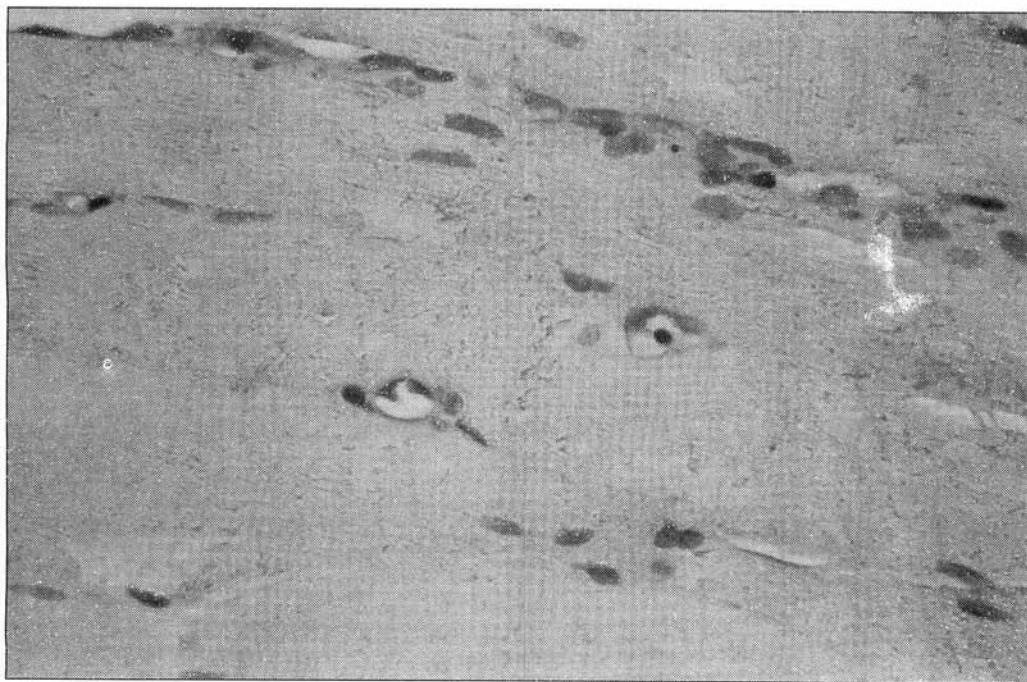


Figura 3 - Padrão granular no citoplasma de célula mononucleada, evidenciando, pela técnica imuno-histoquímica da peroxidase antiperoxidase, em músculo da panturrilha (200X).

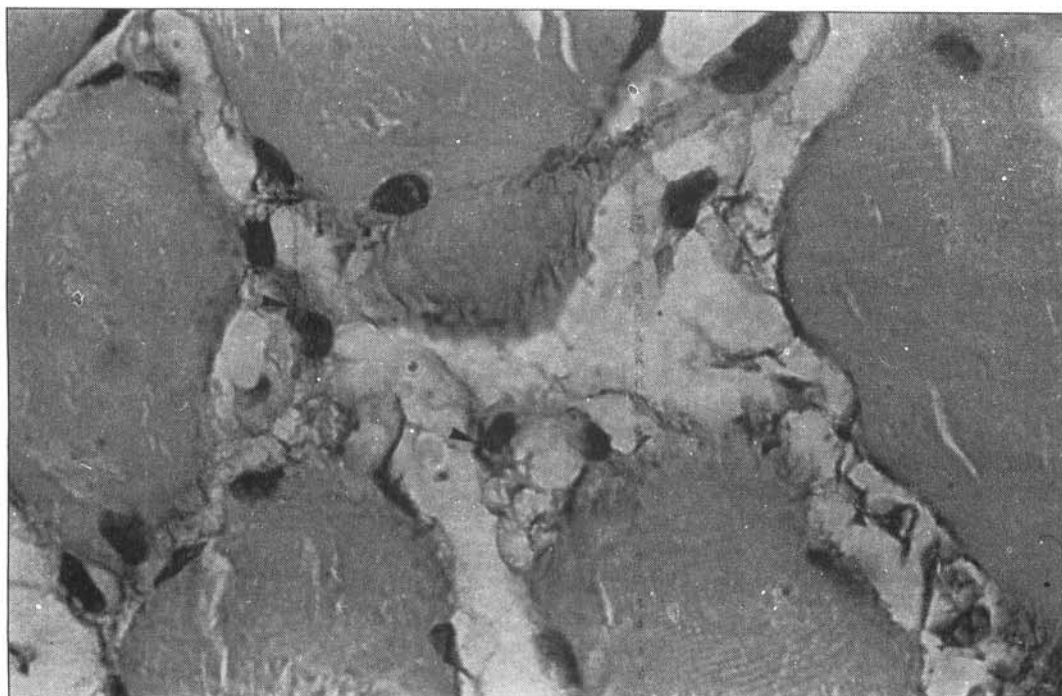


Figura 4 - Padrões filментар e homogêneo, evidenciados, pela técnica imuno-histoquímica da peroxidase- antiperoxidase, em músculo da panturrilha (400X).

DISCUSSÃO

A partir da descrição dos primeiros casos de leptospirose, no final do século passado, diversos pesquisadores têm-se deparado com dificuldades para estabelecer os diagnósticos precoce e de certeza.

Os pacientes incluídos neste estudo tornaram-se suspeitos de estarem com leptospirose no momento da internação. Os sinais e sintomas mais expressivos foram a febre de início abrupto, a dor muscular principalmente na panturrilha, a cefaléia frontal, as sufusões hemorrágicas, a icterícia e a mudança do volume urinário. Os exames laboratoriais inespecíficos auxiliaram o diagnóstico presuntivo e a diferenciação com outras doenças. Em contrapartida, as hemoculturas e o cultivo de leptospiros a partir de fragmentos do músculo gastrocnêmio em pouco contribuíram para os reconhecimentos precoce ou de certeza.

Soro-aglutinações negativas e hemoculturas discordantes foram fatos apontados por CURSONS et al.⁽⁶⁾. BLACKMORE⁽³⁾ anotou a persistência de teores de positivities por longos pe-

ríodos, sem existência de manifestações clínico-laboratoriais concomitantes. Outros percalços são a necessidade de pelo menos duas colheitas de sangue, com intervalo não inferior a sete dias, para correto seguimento e percepção da viragem ou a conveniente espera da elevação de valores. Tudo isto estimula a busca de procedimento seguro para reconhecimento etiológico, com presteza.

Exame histológico do músculo gastrocnêmio evidenciou alterações histopatológicas em 94,45% dos casos, sendo que a intensidade das lesões não pode ser estatisticamente correlacionada com o período evolutivo da doença. Os achados mais frequentes à microscopia óptica evidenciaram haver correlação da inflamação intersticial, caracterizada por edema, congestão vascular, hemorragia e infiltrado inflamatório multifocal por células mononucleadas, com as anormalidades degenerativas de fibras, representadas por tumefação turva, degeneração hialina, basofilia e perda da estriação, reversíveis, com regeneração, ou irreversíveis, com fragmentação do sarcoplasma, picnose e necrose. Essa correlação derivou de análise semiquantitativa dos danos das fibras e, em face às verificações mencionadas, ca-

racterizamos nitidamente miosite. Portanto, a leptospirose deve ser incluída entre as causas desse distúrbio inflamatório.

A pesquisa do antígeno leptospirótico, por intermédio de método imuno-histoquímico, com a ampliação pelo complexo peroxidase-antiperoxidase foi bem sucedida em 34 pacientes (94,45%). Nos dois casos negativos os danos eram histopatologicamente intensos, de modo a permitir questionar se a demonstração é prejudicada em tecidos com grandes processos inflamatórios, à semelhança do que tem lugar em outras entidades, como a hepatite por vírus B, ou se algum transtorno à fixação do material prejudicou a evidênciação. O padrão filamentar apareceu no interstício, próximo ou em contato com as membranas das fibras musculares lesadas, e o material positivo, granular, estava no citoplasma dos macrófagos ou livre. Não vimos substância antigênica nas células endoteliais dos vasos ou perto delas.

Os resultados expostos e os conhecimentos que constam da literatura permitem-nos sugerir que o processo patogênico básico, na leptospirose, deve ser desencadeado pela ação direta do agente causal e de seus produtos, nos tecidos.

É lícito concluir, finalmente, que o método imuno-histoquímico, quando aplicado a fragmento de músculo da panturrilha, possibilita diagnóstico etiológico da leptospirose, com vantajosa precocidade e configurando procedimento sem especiais dificuldades.

SUMMARY

Early diagnosis of leptospirosis by immune histochemical examination of hamstring muscles.

Establishing an early and certain diagnosis of leptospirosis has been a difficult task. So, we analysed the histopathological alterations of the gastrocnemius muscle, and studied, for the first time, the usefulness of the immune histochemical method of peroxidase-antiperoxidase for the demonstration of the spirochete and of its products in this tissue.

Histopathological observations have shown a picture of myositis, characterized by interstitial inflammatory infiltrate and necrotic-degenerative abnormalities of muscle fibers. The lesions were con-

sidered minimal in 69.45% of the patients, moderate in 19.45%, severe in 5.55% and absent in the remaining. On the other hand, the immune histochemical method identified the etiology in 94.45% what was considered very expressive.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, V. A. F.; VIANNA, M. R.; YASUDA, P. H. & BRITO, T. - Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J. Path.*, 151:125-131, 1987.
2. BEITZKE, H. - Ueber die pathologische Anatomie der ansteckenden gelbsucht (Wiel'sche Krankheit). *Berl. Klin. Wschr.*, 53:188-191, 1916.
3. BLACKMORE, D. K. - The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *N. Z. med. J.*, 97:83-86, 1984.
4. BRITO, T.; MORAIS, C.F.; YASUDA, P. M.; LANCELLOTTI, C.P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; YAMASHIRO, E. & ALVES, V. A. F. - Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 81: 1-8, 1987.
5. CARVALHO, F.G.; VIEIRA, A.R.M.; MATOS, H.J.; PEREIRA DA SILVA, M.I.S.; LOMELINO, M. R. & GONÇALVES, A. J. R. - Alterações histológicas musculares na leptospirose. Estudo em material de autópsia. *Arq. bras. Med.*, 59: 317-320, 1985.
6. CURSONS, R.T.M.; PYKE, P.A. & PENNIKET, J. - The serological diagnosis of leptospirosis. *N.Z. Med. J.*, 95: 36-37, 1982.
7. DUARTE, F. - A biópsia muscular na leptospirose. Rio de Janeiro, 1974. (Tese de Livre Docência - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro).
8. ELLIS, T.M.; ROBERTSON, G.M.; HUSTAS, L. & KIRBY, M. - Detection of leptospirosis in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.*, 60: 364-367, 1983.
9. GUEDES E SILVA, J. B.; PAIVA, L.M.; PEREIRA DA SILVA, J. J.; BARRETO NETTO, M. & COURA, J. R. - A biópsia muscular no diagnóstico das leptospiroses. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 3: 305-316, 1969.
10. JEGHERS, H. J.; HOUGHTON, J.D. & FOLEY, J.A. - Weil's disease. Report of a case with postmortem observations and review of recent literature. *Arch. Path.*, 20: 447-476, 1935.
11. LILLIE, R. D. & FULLMER, H. M. - *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York, Mc Graw-Hill, 1976.
12. PAES LEME, C.; BRANDÃO, D.M.S. & ANDRADE

- JÚNIOR, I.V. - Achado de leptospira em biópsia de panturrilha. *Brasília méd.*, 18: 31, 1980.
13. PEREIRA DA SILVA, J. J. - Formas graves de leptospirose, contribuição ao seu estudo clínico. Niterói, 1974. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro).
14. PICK, L. - Zur pathologischen Anatomie des infektiösen Icterus. *Berl. Klin. Wschr.*, 19: 451-455, 1917.
15. PINTO, A. A.; SANTA ROSA, C. A.; SADATSUNE, T. & FLEURY, G.C. - Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination tests for leptospiral diagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 16: 28-31, 1974.
16. SADDY, J. C.; PEREIRA DA SILVA, J. J.; VIEIRA, W.A. & COURA, J.R. - Avaliação da atividade enzimática da creatinofosfoquinase no soro de pacientes com leptospirose. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 5: 323-331, 1971.
17. SHELDON, W. H. - Lesion of muscle in spirochetal jaundice (Weil's disease; spirochetosis icterohemorrhagica). *Arch. Intern. Med.*, 75: 119-124, 1945.
18. STERNBERGER, L.A.; HARDY JR., P.H.; CUCULIS, J.J. & MEYER, H.G. - The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18: 315-333, 1970.

Recebido para publicação em 29/7/1991
Aceito para publicação em 14/7/1992