

## TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CIRCULANTES DA CLASSE IgA NA LEPTOSPIROSE HUMANA

Marcos Vinicius da SILVA (1) & Eide Dias CAMARGO (2)

### RESUMO

O teste imunoenzimático (ELISA) foi avaliado para detecção de anticorpos da classe IgA na leptospirose humana. Nas amostras de soro analisadas o teste demonstrou ser sensível e específico, quando comparado ao teste ELISA-IgM.

Os resultados encontrados sugerem que os anticorpos da classe IgA aparecem tardiamente na leptospirose, e poderão ser um marcador sorológico evolutivo na progressão da doença.

**UNITERMOS:** Leptospirose humana; Anticorpos IgA; Teste ELISA-IgA.

### INTRODUÇÃO

A necessidade de aprimorar os recursos laboratoriais na leptospirose humana tem incentivado o emprego de técnicas mais sensíveis e específicas, com a finalidade de proporcionar diagnóstico laboratorial rápido e seguro.

O estudo das diferentes classes de anticorpos que podem aparecer nas fases evolutivas de uma determinada patologia permite obter melhores informações cronológicas e fisiopatológicas da doença. Na busca de marcadores biológicos, na leptospirose humana, foi padronizado o teste imunoenzimático para a detecção de anticorpos específicos da classe IgA.

### MATERIAL E MÉTODOS

1) Antígeno bruto preparado de acordo com a metodologia descrita por ADLER et. al.<sup>1</sup>, modi-

ficado por SILVA et. al.<sup>7</sup>. Foram utilizadas para a obtenção do antígeno, culturas de *Leptospira interrogans* dos sorotipos: *canicola*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *cynopteri* e *brasilien-sis*<sup>8</sup>.

### 2) AMOSTRAS DE SORO:

2.1. Soros padrão positivos e negativos: soros padrão positivos foram obtidos de 5 pacientes com leptospirose, forma icterohemorrágica da doença (síndrome de Weil), comprovado clínica e laboratorialmente (teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro SAM)<sup>2</sup> e pelo teste imunoenzimático para anticorpos específicos da classe IgM, ELISA-IgM<sup>7</sup> e soros padrão negativos de 5 indivíduos sadios, sem antecedentes clínico-epidemiológicos e com sorologia negativa (SAM e ELISA-IgM) para leptospirose.

(1) Médico da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz e do Hospital Emilio Ribas, ambos da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, SP, Brasil.

(2) PqC da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Marcos Vinicius da Silva, Instituto Adolfo Lutz — Seção de Sorologia — 10º andar. Av. Dr. Arnaldo, 351 — Caixa Postal 7027 — CEP 01246 — São Paulo, SP, Brasil.

2.2 Amostra de soros de 26 pacientes com suspeita clínica de leptospirose, 2 do sexo feminino e 24 do masculino, com idades entre 13 a 51 anos (média = 30,9 anos) e intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra variando de 5 a 16 dias (média = 9,2 dias).

2.3. O grupo controle foi constituído por soros de 31 indivíduos adultos, aparentemente saudáveis, sem antecedentes clínicos e epidemiológicos para leptospirose (17 do sexo feminino e 9 do masculino) e por 26 soros de pacientes com outras patologias: leishmaniose: cutânea (n = 1), mucosa (n = 1) e visceral (n = 2), malária por *Plasmodium falciparum* (n = 5) e *Plasmodium vivax* (n = 2), febre tifóide (n = 1), meningite bacteriana: indeterminada (n = 1), por *Streptococcus pneumoniae* (n = 2) e por diplococos gram negativo (n = 5), sarampo (n = 4), sífilis: primária (n = 1) e secundária (n = 1). Todos sorologicamente (SAM e ELISA-IgM) não reativos para leptospirose.

### 3) TESTES SOROLÓGICOS:

3.1. Teste imunoenzimático ELISA-IgA, padronizado conforme metodologia descrita:

- a) soluções e tampões: PBS: solução fosfatada (fosfatos 0,02M; NaCl 0,13M; pH 7,2). SL: solução de lavagem (solução fisiológica a 0,85% contendo 0,05% de Tween-20). PBS-I: solução tampão de incubação (PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 0,1% de leite desnatado).

Solução cromógena: 1 mg de p-nitrofenil-fosfato dissódico em 1 ml de solução tamponada de dietanolamina 1M; MgCl<sub>2</sub> 0,005M; pH 9,8.

- b) execução do teste: a cada cavidade das placas de poliestireno, fundo U (INLAB, Brasil), foram adicionados 100 µl do antígeno diluído, conforme seu título, em PBS. Após incubação de uma hora a temperatura ambiente e 15 a 18 horas a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com SL e utilizadas em seguida. Os soros foram diluídos em PBS-I, na razão 2, a partir de 1:5, e 100 µl de cada diluição foram adicionados às cavidades da placa. Após uma hora de incubação a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas três ve-

zes. Cem microlitros do conjugado anti-IgA-humano-fosfatase alcalina (SIGMA, USA), na diluição adequada em PBS-I foram adicionados aos orifícios da placa. Após novo ciclo de incubação e lavagens, adicionou-se 100 µl da solução cromógena e incubou-se a placa a 37°C por 45 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µl de NaOH 2M e a densidade óptica (DO) determinada em espectrofotômetro de placas (Multiskan MCC, Flow-USA), no comprimento de onda de 409 nm. Foram realizados paralelamente testes com placas onde o antígeno foi substituído por PBS, para controle dos soros.

O limiar de reatividade (cut-off) do teste foi determinado pela média aritmética das D.O. das amostras do grupo controle (item 2.3), acrescida de três desvios padrão, na diluição 1:40.

3.2. Teste ELISA-IgM, padronizado conforme metodologia descrita por SILVA et. al.<sup>7</sup>.

3.3 Soroaglutinação microscópica (SAM), realizado de acordo com as normas preconizadas pela OMS<sup>2</sup>. Soros com títulos iguais ou maiores do que 200 foram considerados positivos.

- 4) Teste estatístico do qui quadrado<sup>3</sup>.

## RESULTADOS

As curvas dose-resposta dos soros padrão: 5 soros positivos e 5 soros negativos, são apresentadas na figura 1.

Os resultados comparativos dos testes ELISA-IgM, ELISA-IgA e SAM, obtidos nos soros dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose e do grupo controle, são apresentados na tabela 1.

Os pacientes com suspeita clínica de leptospirose foram divididos em dois grupos de acordo com o intervalo de tempo entre o início dos primeiros sintomas e a coleta da amostra. No primeiro grupo com 17 pacientes, o intervalo de tempo foi de 5 a 9 dias e no segundo (9 pacientes) de 10 a 16 dias. Os resultados são apresentados na tabela 2.

TABELA 1

Resultados comparativos dos testes: ELISA-IgM, ELISA-IgA e SAM\* quanto a reatividade dos soros dos 26 pacientes com suspeita clínica de leptospirose e do grupo controle.

grupos	testes:	ELISA-IgM		ELISA-IgA		SAM	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
(1)		26	0	13	13	26	0
(2)		0	57	0	57	0	57

\* SAM — sorroaglutinação microscópica

(1) soros dos pacientes com suspeita clínica de leptospirose (n = 26)

(2) soros do grupo controle (n = 57)

TABELA 2

Resultados do teste ELISA-IgA aplicado nos soros dos 26 pacientes com suspeita clínica de leptospirose, segundo o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra.

At (dias)	teste ELISA-IgA	Positivo		Negativo		Total n
		n	(%)	n	(%)	
5 — 9		4	(23,53)	13	(76,47)	17
10 — 16		9	(100)	—	—	9

At = intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra.

com o objetivo de obter-se outro marcador sorológico, que não a IgM e a IgG<sup>4, 5, 6, 7</sup> na tentativa de ampliar o recurso laboratorial desta importante antropozoonose.

As curvas dose-resposta obtidas no teste ELISA-IgA (figura 1) para os soros padrão de pacientes com leptospirose e de indivíduos normais, mostraram que o teste foi discriminante e que há proporcionalidade entre concentração de anticorpo e D.O. obtida ( $0,010 < p < 0,025$ ). A melhor diluição do soro a ser empregada no teste ELISA-IgA foi 1:40 conforme observado na figura 1.

## DISCUSSÃO

O teste ELISA-IgA para o diagnóstico da leptospirose humana foi padronizado e avaliado

O limiar de reatividade (cut-off) determinado através da média aritmética das densidades

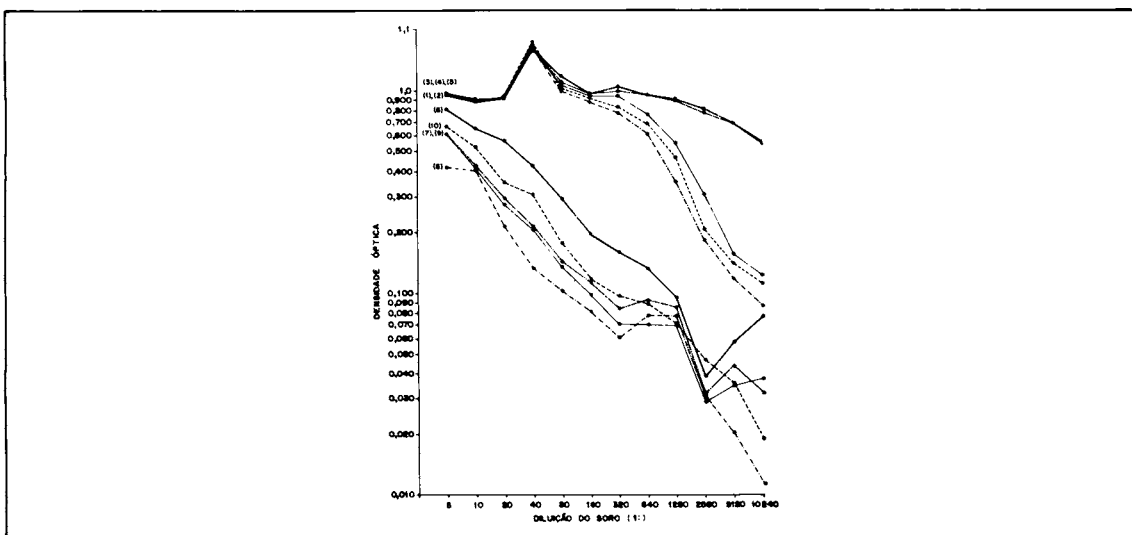


Fig. 1 — Curvas dose resposta obtidas no teste ELISA-IgA para soros de pacientes com leptospirose (1, 2, 3, 4 e 5) e de indivíduos normais (6, 7, 8, 9 e 10).

ópticas das amostras de soros de 31 indivíduos sadios e das 26 amostras de soros de outras patologias, acrescida de três desvios padrões, na diluição 1:40, resultou em 0,630.

Embora a positividade do teste ELISA-IgA tenha sido de 50%, quando comparado aos testes ELISA-IgM e SAM, cabe ressaltar que quando os pacientes com suspeita clínica de leptospirose foram divididos em 2 grupos de acordo com o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta da amostra observou-se fato interessante. Nos pacientes cujo intervalo de tempo foi de 5 a 9 dias, 4 soros (23,53%) foram positivos pelo teste ELISA-IgA, e naqueles, cujo intervalo de tempo foi de 10 a 16 dias, a sorologia foi positiva em 100%.

Este resultado sugere que os anticorpos da classe IgA podem ser um marcador evolutivo na progressão da doença, com aparecimento tardio em relação aos da classe IgM, possibilitando futuras investigações que podem contribuir para o diagnóstico da leptospirose humana e a melhor compreensão de sua fisiopatologia.

#### SUMMARY

#### Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for the detection of antibodies in the human leptospirosis.

An Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA was evaluated for the detection of IgA antibodies in the human leptospirosis. The assay proved to be sensitive and specific when compared with the ELISA-IgM, in the examined serum samples.

The results found suggest that IgA antibodies became positive later in leptospirosis, and

will can be an evolutive indicator in the development of the disease.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B.; MURPHY, A. M.; LOCARNINI, S. A. & FAINE, S. — Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. clin. Microbiol.*, 11: 452-457, 1980.
2. FAINE, S., ed. — Guidelines for the control leptospirosis. Geneve, World Health Organization, 1982 (WHO offset publication n° 67).
3. GUEDES, M. L. S. & GUEDES, J. S. — Bioestatística para profissionais da Saúde. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico; Brasília, CNPq, 1988.
4. HARTMAN, E. G. — An IgM and IgG specific enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect anti-leptospiral immunoglobulins in dogs. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 257: 508-510, 1984.
5. MAILLOUX, M.; MAZZONELLI, J. G. & DUFRESNE, Y. — Application of an immuno-enzyme technique to titration of antibodies in leptospirosis. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 257: 511-513, 1984.
6. MILNER, A. R.; JACKSON, K. B.; WOODRUFF, K. & SMART, I. J. — Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. clin. Microbiol.*, 22: 539-542, 1985.
7. SILVA, M. V.; CAMARGO, E. D.; VAZ, A. J.; UEDA, M. & SAKATA, E. E. — Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgM na leptospirose humana. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 30: 95-100, 1988.
8. SILVA, M. V.; CAMARGO, E. D.; VAZ, A. J.; SOUZA, A. M. C.; CHIEFFI, P. P. & SAKATA, E. E. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana através do teste ELISA-IgM, empregando-se diferentes preparações antigênicas a partir de sorotipos prevalentes de *Leptospira interrogans*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 32: 233-239, 1990.

Recebido para publicação em 29/8/1991.

Aceito para publicação em 13/3/1992.