

AVALIAÇÃO DA CONTRAIMUNOELETROFORESE COM ANTÍGENOS DOS SOROVARS icterohaemorrhagiae E patoc NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA¹.

Paulo H. YASUDA(2), Elena E. SAKATA(3), Maria Aparecida SHIKANAI-YASUDA(4), Silvio de Arruda VASCONCELOS(5), Eliete C. ROMERO(3), Marcos Vinicius da SILVA(3) & Solange CARRASCO(2).

RESUMO

Avaliou-se o desempenho da contraimuno eletroforese (CIE) no diagnóstico sorológico da leptospirose humana utilizando três tipos de antígenos derivados da *L. interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae* e do sorovar *patoc* da *L. biflexa*. Comparou-se os resultados obtidos na CIE com a prova de referência a soroaglutinação microscópica (SAM).

Soros pareados de 135 pacientes com leptospirose foram subdivididos em 4 grupos de acordo com os resultados da SAM. Como controle coletou-se sangue de 69 indivíduos sadios.

A concordância entre as duas técnicas variou de 92,64 a 94,11%. Os resultados obtidos pela CIE com os antígenos do sorovar *icterohaemorrhagiae* foram mais favoráveis do que aqueles derivados do *patoc*. Ressaltam-se as características de elevada sensibilidade detectando anticorpos antileptospiras mais precocemente do que a microaglutinação.

As características encontradas no presente estudo credenciam o emprego da CIE como um método útil e prático para o diagnóstico da leptospirose humana na fase aguda da doença.

UNITERMOS: Leptospirose humana; *icterohaemorrhagiae*; *patoc*; antígenos; contraimuno eletroforese.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial da leptospirose tem na soroaglutinação microscópica (SAM) uma das técnicas mais difundidas e de maior confiabilidade entre os estudiosos do assunto. Entretanto, a SAM é trabalhosa, consome muito reagente e tempo para a sua execução, além de oferecer risco de contaminação acidental ao pessoal técnico por manipular grande número de amostras vivas de leptospiras patogênicas⁴.

de se substituir a SAM por provas mais simples e rápidas. A maioria dos testes substitutivos como a imunofluorescência, hemaglutinação, reação de fixação do complemento, provas imunoenzimáticas apresenta a vantagem de utilizar antígenos inativados, porém de pouca estabilidade, além de mudar o caráter da prova, isto é, de uma prova sorogrupo específica (SAM) passa-se para provas gênero específicas^{1,2,4,9}.

Inúmeras tentativas têm sido feitas no sentido

Uma proposta interessante de simplificação foi

- (1) O trabalho contou com o apoio financeiro da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Proc. Biomedicina 88/2301-4.
- (2) Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Depto. de Microbiologia. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374. 05508 São Paulo, SP, Brasil.
- (3) Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 351. CEP 01246 São Paulo, SP, Brasil.
- (4) Faculdade de Medicina da USP. Av. Dr. Arnaldo, 455. CEP 01246 São Paulo, SP, Brasil.
- (5) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720. CEP 05340 São Paulo, SP, Brasil.

feita por TERPSTRA et al.¹⁰ em 1979 empregando a contraimuno eletroforese (CIE) para o diagnóstico da leptospirose humana. Em 1987, MYERS⁸ retomou o mesmo assunto mas, ampliou o tipo de antígeno empregado e defendeu a CIE como uma prova factível, tendo em vista a rapidez e a precocidade da CIE em relação à SAM em demonstrar anticorpos antileptospiras. Relatou ainda a alta estabilidade do antígeno ensaiado de, no mínimo, dois anos à temperatura ambiente.

Objetiva-se com o presente relato apresentar os resultados da avaliação da CIE como prova gênero específica, comparando-os com os obtidos pela SAM no diagnóstico sorológico da leptospirose humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros estudados

Soros pareados de 135 pacientes com leptospirose, internados no Hospital Emílio Ribas de São Paulo, foram subdivididos em 4 grupos assim constituídos:

Grupo 1 - 58 pacientes com duas amostras de soro, sendo a primeira não reagente à SAM e a segunda reagente com soro-conversão positiva;

Grupo 2 - 30 pacientes com duas amostras de soro, com a primeira reagente com título ≥ 100 ou ≤ 400 e a segunda amostra com soro-conversão significativa;

Grupo 3 - 47 pacientes com duas amostras de soro, com a primeira reagente com título ≥ 800 e a segunda reagente, porém, não necessariamente com soro-conversão positiva;

Grupo 4 - 7 pacientes dos Grupos 2 ou 3 que foram estudados prospectivamente, por meio de seis amostras de sangue colhidas, com intervalos variáveis, para se observar a duração dos anticorpos precipitantes pela CIE, empregando o antígeno RGA-C.

Para o Grupo Controle foi colhida uma amostra de sangue de 69 indivíduos adultos sem nenhuma queixa clínica no momento da coleta.

Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Todos os soros acima discriminados foram submetidos à SAM, seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde⁴ e os seus resultados comparados com os obtidos pela CIE.

Os seguintes sorovars de leptospiras vivas foram empregados como antígeno: **australis**, **autumnalis**, **castellonis**, **bataviae**, **brasiliensis**, **butembo**, **canicola**, **celledoni**, **cynopteri**, **djasiman**, **grippotyphosa**, **hebdomadis**, **icterohaemorrhagiae**, **copenhagani**, **javanica**, **panama**, **pomona**, **pyrogenes**, **wolfii**, **shermani**, **tarassovi**, **andamana** e **patoc**.

Considerou-se soro reagente quando houve aglutinação significativa das leptospiras na diluição sérica a partir de 1:100.

Contraimuno eletroforese (CIE)

Os antígenos empregados na CIE foram extraídos de dois sorovars de leptospira, **icterohaemorrhagiae** cepa RGA e **patoc**, segundo metodologia preconizada por MYERS⁸. De cada sorovar obteve-se 2 tipos de antígenos designados por RGA-A e Patoc-A, derivados do tratamento das leptospiras com Triton X 100 a 4% em PBS 0,01M, pH7,2 aquecida num banho-maria a 50°C durante 4 horas e RGA-B e Patoc-B obtidos por aquecimento em água fervente durante 10 minutos dos restos celulares após o tratamento acima referido. Tais antígenos foram titulados em bloco pela CIE contra uma mistura de soros de pacientes sabidamente positivos para leptospirose, a fim de se determinar a diluição de uso dos mesmos. Uma vez de posse dos dados os antígenos foram misturados adequadamente, mantendo as suas diluições de uso individuais originando antígenos designados respectivamente por RGA-C e Patoc-C.

A corrida eletroforética empregada foi a recomendada por MYERS⁸, partindo-se de soros não diluídos. Somente os soros dos pacientes do Grupo 4 foram titulados, mediante diluição seriada de razão 2, empregando-se como antígeno somente o RGA-C.

A leitura das linhas de precipitação foi feita imediatamente após a corrida eletroforética ou após a incubação da lâmina submetida à CIE em câmara úmida por 24 horas, seguida de coloração por Amido Schwartz 10 B a 0,5%.

Método estatístico empregado

Quando possível, o teste do Qui² de McNemar foi aplicado aos resultados encontrados pelas reações de SAM e de CIE. Em todos os casos adotou-se o valor de $p \leq 0,05$ para o nível de rejeição da hipótese de igualdade entre as duas técnicas¹¹.

Estudo em termos relativos dos índices sorológicos

Para a determinação da eficiência relativa da CIE frente à prova de referência, SAM, foram calculados os índices relativos de Sensibilidade (Sr); Especificidade (Er); Valores Preditivos positivos e negativos (Vp+ e Vp-); Concordância (C) e Falsos positivos (F+) e negativos (F-) de acordo com os conceitos preconizados por BUCK & GART³; GALEN & GAMBINO⁶ e GRINER et al.⁷. Essas determinações foram realizadas com os resultados obtidos no Grupo Controle e com os soros pareados dos Grupos 1, 2 e 3, separando as primeiras das segundas amostras de soro.

RESULTADOS

A reação de SAM resultou negativa com todos os 69 soros do Grupo Controle enquanto que pela CIE o antígeno RGA-A apresentou reação com soros de 3 indivíduos normais (4,34%); o antígeno RGA-B reagiu somente com um soro (1,44%) e o RGA-C com dois soros controle (2,89%). O teste estatístico do Qui² de McNemar, para $\alpha \leq 0,05$, demonstrou não haver discrepância entre os resultados observados pelas duas técnicas.

Os antígenos Patoc-A, B e C apresentaram os seguintes índices de positividade com os soros do Grupo Controle: 7,24; 86,95 e 84,05%, respectivamente, demonstrando a total inadequação de se trabalhar com os dois últimos tipos de antígenos. A comparação entre os resultados da SAM e CIE com o antígeno Patoc-A nesse grupo de soro permitiu observar um valor de Qui² = 3,2 que não é estatisticamente significativo, porém optou-se pela sua eliminação nos estudos subseqüentes.

Os resultados obtidos com os soros pareados dos Grupos 1, 2 e 3 estão resumidos na Tabela I. As primeiras amostras do soro do Grupo 1 eram não reagentes à SAM, porém a CIE apresentou resultados positivos em 22,41% com o antígeno

RGA-B e 31,03% com o RGA-A. A mistura antigênica RGA-C reagiu em 27,58% dos casos. Os títulos séricos obtidos pela SAM com as segundas amostras de soro no presente Grupo variaram de 200 a 51.200 (dados não discriminados), caracterizando uma nítida conversão sorológica. A CIE apresentou os seguintes índices de positividade, 86,20; 82,75 e 87,93% respectivamente com os antígenos RGA-A, B e C. No Grupo 2 as primeiras amostras de soro apresentavam títulos sorológicos pela SAM variando entre 100 a 400. Os índices de positividade obtidos pela CIE podem ser observados na mesma Tabela.

Na Tabela 1 também estão discriminados os índices obtidos pela CIE no Grupo 3. Pela SAM as primeiras amostras de soro apresentavam títulos ≥ 800 e as segundas amostras, apenas um soro foi reagente na diluição de 1:100 e o restante com títulos entre 400 e 51.200 (dados não apresentados).

Os valores das características sorológicas relativas entre as técnicas da SAM e da CIE foram obtidos separadamente para as primeiras e para as segundas tomadas de soro dos Grupos 1, 2 e 3. Constam na Tabela 2 as percentagens de tais valores.

Na Tabela 3 estão expressos os resultados do acompanhamento longitudinal realizado em 7 pacientes do Grupo 4 pelas técnicas de SAM e CIE. Já nas primeiras amostras de soro todos os pacientes apresentavam títulos detectáveis pelas duas técnicas. Não se observou de maneira clara a soro conversão dos pacientes pela CIE. O paciente 129 não apresentou mais linha de precipitação no 89º dia da doença, observando-se o mesmo com o paciente 140 no 121º dia da doença. Somente o paciente 358 mostrou-se reagente até a última tomada de soro.

DISCUSSÃO

No diagnóstico sorológico da leptospirose dois tipos de antígenos são empregados, gênero específico e sorogrupo específico; este último representado na soroaglutinação microscópica (SAM). Uma reação gênero específica apresenta uma positividade e uma negatividade mais precoce do que a revelada pela SAM^{4,5}.

Os antígenos empregados na CIE, RGA-A, B e C mostraram um comportamento gênero específico pois, nas primeiras amostras de soro do Grupo 1,

Tabela 1

Resultados das reações de SAM (soroaglutinação microscópica) e da CIE (contraímunoelctroforese) com os antígenos RGA-A, B e C aplicadas aos soros pareados de pacientes com leptospirose dos grupos 1, 2 e 3.

CIE POS/EX	SAM POS/EX*	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
		1ª amostra	2ª amostra	1ª amostra	2ª amostra	1ª amostra	2ª amostra
		0/58	58/58	30/30	30/30	47/47	47/47
RGA-A		18/58	50/58	19/30	27/30	45/47	46/47
%**		31,03	86,20	63,33	90,00	95,74	97,87
RGA-B		13/58	48/58	18/30	26/30	44/47	47/47
%		22,41	82,75	60,00	86,66	93,61	100,00
RGA-C		16/58	51/58	21/30	28/30	45/47	46/47
%		27,58	87,93	70,00	93,33	95,74	97,87

* POS/EX = nº de resultados positivos sobre nº de soros examinados.

**% = porcentagem.

Tabela 2

Valores relativos (%) da Sensibilidade (Sr), Falso negativo (F-), Especificidade (Er), Falso positivo (F+), Concordância (C), Valores preditivos positivo (Vp+) e negativo (Vp-), observados entre a contraímunoelctroforese e a soroaglutinação microscópica, segundo os antígenos utilizados em amostras de soros de 135 pacientes e 69 indivíduos controle.

Característica (%)	Antígeno	1ª Amostra			2ª Amostra		
		RGA			RGA		
		A	B	C	A	B	C
Sr		60,74	55,55	60,74	91,11	89,62	92,59
F-		39,25	44,44	39,25	8,88	10,37	7,40
Er		95,65	98,55	97,10	95,65	98,55	97,10
F+		4,34	1,44	2,89	4,34	1,44	2,89
C		72,54	70,09	73,03	92,64	92,64	94,11
Vp+		96,47	98,68	97,61	97,61	99,18	98,42
Vp-		55,46	53,12	55,83	84,61	82,92	87,01

quando a SAM ainda não era capaz de revelar anticorpos contra leptospirose, a reação ora preconizada foi reativa nas seguintes porcentagens, 31,03; 22,41 e 27,58 respectivamente. A precocidade de uma reação é desejada para a aplicação de terapêutica adequada num intervalo de tempo o mais curto possível para se evitar o agravamento do estado do paciente, principalmente num caso de um infecção aguda como é a leptospirose⁵.

Acompanhando o comportamento da CIE com

os soros do Grupo 4 (Tabela 3) observa-se a negatificação mais precoce desta reação. Em torno do 4º ao 6º mês da doença a maioria dos pacientes não mais apresentava anticorpos detectáveis pela CIE embora a SAM ainda permanecesse positiva.

A concordância entre a CIE e a SAM descrita por TERPSTRA et al.¹⁰ foi de 91%, enquanto que MYERS⁸ relata um índice de 97,2%. As taxas de concordância obtidas no presente estudo variaram de acordo com o material examinado. Nas primei-

Tabela 3

Recíproca das diluições séricas positivas de amostras seriadas de 7 pacientes (Grupo 4), colhidas periodicamente após o início da doença (em dias), pela técnica da contraimunoeletroforese com o antígeno RGA-C e pela soroaglutinação microscópica com 23 antígenos de leptospirosas.

Paciente	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			4ª Amostra			5ª Amostra			6ª Amostra		
	DIAS	SAM	CIE	DIAS	SAM	CIE	DIAS	SAM	CIE	DIAS	SAM	CIE	DIAS	SAM	CIE	DIAS	SAM	CIE
358	3	3200	4	5	3200	1	40	3200	2	88	1600	4	130	800	4	179	1600	1
1011	4	400	4	11	1600	4	32	12800	8	60	3200	2	95	1600	2	165	800	0
31	4	3200	8	27	12800	2	57	3200	1	99	1600	1	140	800	1	173	400	0
95	5	400	8	39	25600	8	71	12800	4	101	6400	1	136	3200	4	192	3200	0
129	5	3200	8	27	6400	8	55	1600	8	89	800	0	124	100	0	194	200	0
456	6	400	4	11	1600	4	32	12800	8	60	3200	2	95	1600	2	165	800	0
140	7	3200	8	29	3200	4	64	1600	2	99	3200	1	121	800	0	156	800	0

ras amostras de soro a concordância calculada foi de 72,54; 70,09 e 73,03% respectivamente com os antígenos RGA-A, B e C. As segundas amostras de soro propiciaram índices de concordância de 92,64; 92,64 e 94,11% respectivamente para os antígenos acima referidos. Estes índices ficaram próximos aos obtidos pelos dois autores retro citados mas, ressalte-se que os valores não são totalmente comparáveis devido às diferenças no tipo de antígeno e principalmente pelo grupo de soro estudado.

A especificidade relativa da CIE foi elevada, variando de 95,65 a 98,55%, demonstrando que os antígenos derivados da cepa RGA apresentam boa capacidade de discriminar indivíduos sadios dos doentes. A sensibilidade relativa da reação da CIE foi melhor com as segundas tomadas de soros. Variou de 55,55 a 60,74% para as primeiras amostras e de 89,62 a 92,59% para as segundas amostras com antígenos da cepa RGA. Nas primeiras amostras de soro a sensibilidade da reação foi fortemente afetada pelos altos índices de falsos negativos, pois 39,25 a 44,44% dos soros desse conjunto apresentaram resultados negativos pela CIE. Tais índices revelam a necessidade de se interpretar com cautela os resultados não reagentes da CIE (Tabela 2).

O antígeno Patoc-B mostrou-se totalmente inadequado para ser empregado nas CIE pois reagiu com soros de 86,95% do Grupo Controle. Não há na literatura mundial qualquer relato da alta reatividade, não específica, dessa ou qualquer outra fração antigênica da cepa Patoc-1. O antígeno Patoc-C teve o mesmo comportamento pois continua, na mistura, o Patoc-B.

No presente trabalho, pode-se descrever a precocidade da CIE em revelar anticorpos específicos em soros não reagentes à SAM, bem como os altos índices de especificidade, além de elevados valores de sensibilidade relativa e de concordância com a SAM em soros com altos títulos de anticorpos aglutinantes. Tais características aliadas à facilidade de execução, ausência de risco de infecção acidental ao operador e grande estabilidade do antígeno descrito por MYERS⁸, a credenciam como reação aplicável à prática laboratorial no diagnóstico da leptospirose humana.

SUMMARY

Evaluation of Counterimmuno-electrophoresis with the serovars *icterohaemorrhagiae* and *patoc* antigens in the diagnosis of human leptospirosis.

Counterimmuno-electrophoresis (CIE) was applied on paired sera from 135 patients with leptospirosis and on 69 sera from a control group. The sera from patients were subdivided in 4 groups according to the results obtained by the Microscopic Agglutination Test (MAT).

The first samples sera from 58 patients were non reagent by MAT. Six monthly samples of sera were taken from 7 patients to follow-up and to determine the level of agglutinin and precipitin antibodies present using MAT and CIE.

Serovars *icterohaemorrhagiae* and *patoc* were used as antigens. Three types of antigens were compared, 1) Triton-X-100 extracted; 2) heat

extacted and 3) a pool of them. The CIE using *icterohaemorrhagiae* derivated antigens types agreed with MAT in 92.64, 92.64 and 94.11% of the leptospirosis sera. The *patoc* antigens types reacted with the control group in 7.24, 86.95 and 84.05% of the samples, and consequently were eliminated from the present study.

The *icterohaemorrhagiae* CIE reaction become positive earlier than MAT negative sera, and reverted to negative earlier in the follow-up samples from the patients.

The CIE was sensitive and specific, gave rapid results and was easy to perform.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B.; CHAPPEL, R.J. & FAINE, S. - The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg., 1 ABT. Orig. A*, 252: 405-413, 1982.
2. ADLER, B. & FAINE, S. - The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. med. Microbiol.*, 11: 387-400, 1978.
3. BUCK, A.A. & GART, J.J. - Comparison of a screening test and a reference test in epidemiologic studies. I. Indices of agreement and their relation to prevalence. *Amer. J. Epidem.*, 83: 596-692, 1966.
4. FAINE, S. - *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization, 1982. (Offset Publ., 67: 1-171, 1982).
5. FEIGIN, R.D. & ANDERSON, D.C. - Human leptospirosis. *CRC Crit. Rev. clin. Lab. Sci.*, 5: 413-467, 1975.
6. GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R. - *Beyond normality: the predictive value and efficacy of medical diagnosis*. New York, John Wiley, 1975. 237 p.
7. GRINER, P.F.; MAYEWSKI, R.J.; MUSHLIN, A.I. & GREENLAND, P. - Selection and interpretation of diagnostic test and procedures. Principles and applications. *Ann. intern. Med.*, 94: 557-600, 1981.
8. MYERS, D.M. - Serodiagnosis of human leptospirosis by counterimmuno-electrophoresis. *J. clin. Microbiol.*, 25: 897-899, 1987.
9. PALIT, A. & GULASEKHARAM, J. - Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. clin. Path.*, 26: 7-16, 1973.
10. TERPSTRA, W.J.; SCHOONE, G.J. & LIGTHART, G.S. - Counterimmuno-electrophoresis in the diagnosis of human leptospirosis. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. ABT 1. Orig. A*, 244: 285-290, 1979.
11. ZAR, J.H. - *Biostatistical analysis*. 2nd. ed. Englewood, Prentice Hall, 1984.

Recebido para publicação em 12/03/1991.
Aceito para publicação em 06/06/1991.