

IMUNODIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA. 2. ESTUDO COMPARATIVO DAS REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA, HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA *

Maricy Alves RIBEIRO **
Massami KAWARABAYASHI **
Lúcia Kaoru YAMADA ***
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Marcelo Oswaldo Álvares CORRÊA **

RIALA6/537

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

RESUMO: Foram realizadas provas de hemaglutinação passiva e de imunofluorescência indireta em 98 soros obtidos de 38 pacientes com leptospirose causada presumivelmente pelos sorotipos *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippotyphosa* ou *pomona*. Hemácias de carneiro sensibilizadas com antígeno polissacarídico F₁, obtido de leptospira do sorotipo *patoc*, foram utilizadas na hemaglutinação passiva. Para a prova de imunofluorescência indireta foram empregados antígenos íntegros do mesmo sorotipo. Os resultados foram comparados com os obtidos através da prova de aglutinação microscópica, na qual foram empregados 10 sorotipos patogênicos. As reações de hemaglutinação passiva e de imunofluorescência indireta mostraram ser gênero específicas, sendo que a primeira caracterizou-se por ser a mais indicada para o diagnóstico precoce da leptospirose humana aguda.

DESCRITORES: leptospirose humana, imunodiagnóstico; provas de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva, imunofluorescência indireta.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial específico das leptospiroses ainda utiliza, como procedimento padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde¹², desde 1967, a prova de soroaglutinação microscópica^{17, 23}, na qual os antígenos são representados por culturas de diferentes sorotipos de leptospira. No entanto, a realização desta prova exige laboratórios dotados de condições de certa complexidade como, por exemplo, aquelas necessárias para a manutenção de variado estoque de culturas para o provimento de antígenos que abrangam o espectro dos sorotipos mais frequentes na área atendida pelo laboratório,

cerca de 14, segundo recomendação da OMS. Outras provas sorológicas de execução mais acessíveis têm sido relatadas, tais como a prova de hemaglutinação passiva^{10, 13, 18, 19}, o teste de fixação de complemento^{10, 14}, a prova de imunofluorescência indireta^{16, 17, 22}, a contra-imunoelectroforese²¹, o teste ELISA²⁰ etc.

No entanto, nestas reações são utilizados antígenos diferentes, de constituição não bem definida, o que dificulta a avaliação comparativa de tais reações, quando executadas por outros pesquisadores. No presente trabalho foi utilizado o antígeno polissacarídico extraído do sorotipo *patoc*, para a reação de hemaglutinação passiva, e antígeno íntegro do mesmo sorotipo, para a reação de imunofluorescência

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Hospital Heliópolis, São Paulo, SP.

indireta, tomando como referência, para estudo comparativo, a prova de soroaglutinação microscópica em duas ou três amostras séricas de cada um dos 38 pacientes com diagnóstico clínico de leptospirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros analisados

Foram colhidas 98 amostras de sangue por punção venosa de 38 pacientes internados no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, de São Paulo, com quadro clínico sugestivo de doença leptospirótica, no período de dezembro de 1977 a junho de 1978. Foram selecionados aqueles que apresentaram resultados positivos na primeira soroaglutinação microscópica e aqueles que, apesar de apresentarem reações negativas, às vezes em até duas amostras sucessivas de soro, não tiveram outro diagnóstico etiológico firmado até a alta hospitalar, prevalecendo pois o diagnóstico de leptospirose, com base em dados clínicos e laboratoriais não específicos. Os dias, após o início dos sintomas em que foram colhidas as amostras de sangue, tiveram as seguintes variações:

- 1.^a amostra, de 2 a 10 dias, média aproximada de 6 dias (38 pacientes)
- 2.^a amostra, de 11 a 28 dias, média aproximada de 16 dias (38 pacientes)
- 3.^a amostra, de 29 a 49 dias, média aproximada de 38 dias (22 pacientes)

Três amostras de sangue foram obtidas em apenas 22 pacientes, devido a transferência para outros hospitais, altas e óbitos precoces.

O grupo controle constou de soros de 100 doadores do banco de sangue e os títulos considerados significativos para as reações de hemaglutinação passiva (HAP) e imunofluorescência indireta (IFI) foram baseados na mediana dos valores obtidos neste grupo.

Todas as amostras de soro foram conservadas a -20°C até o momento da realização dos testes. Quando da colheita da primeira amostra, foi praticada a hemocultura em todos os pacientes que integram este estudo.

Hemocultura

Foi feita a sementeira com uma gota de sangue total em dois tubos com meio de Fletcher. Os meios foram mantidos em estufa a 28°C, procedendo-se ao exame em campo escuro a cada quatro dias, considerando-se negativa a cultura caso não houvesse crescimento até o trigésimo dia. Esse crescimento em geral, traduz-se pela formação de um anel bem visível, a cerca de 0,5 a 1 cm abaixo da superfície do meio. A técnica da hemocultura baseou-se no emprego da diluição progressiva, inoculando-se uma gota de sangue no pri-

meiro tubo, misturando-se e passando-se uma gota para o segundo tubo e assim sucessivamente até o quarto tubo.

Soroaglutinação microscópica

Para a execução da reação de soroaglutinação microscópica. (SAM), foram utilizadas placas de porcelana escavadas. Em tubos à parte foram diluídos os soros em exame, a 1:50, através da adição de 0,1 ml de soro a 4,9 ml de solução salina, distribuindo-se 0,2 ml desta diluição em todas as escavações de uma placa.

Culturas de leptospiros recentes (de quatro a cinco dias), semeadas em meio descrito por Ellinghausen & McCullough, modificado por Johnson & Harris (EMJH. Difco Laboratories), foram utilizadas para a preparação do antígeno que, a seguir, foi distribuído em cada escavação no volume de 0,2 ml, em concentração aproximada de 300 organismos por campo microscópico (aumento 400 X), de tal maneira que a diluição final do soro foi de 1:100. Após ligeira agitação, as placas foram incubadas a 37°C, durante duas horas, procedendo-se então à leitura em campo escuro. Foram retiradas com alça de platina de cada escavação amostras que foram colocadas em lâminas, uma para cada soro e, a seguir, lidas em microscópio de campo escuro. Havendo 50% ou mais de leptospiros aglutinados no campo, a reação foi considerada positiva.

A reação de soroaglutinação microscópica foi realizada com cepas dos seguintes sorotipos:

icterohaemorrhagiae, cepa RGA
copenhageni, cepa M20
panama, cepa CZ214 K
grippityphosa, cepa Moskva V
canicola, cepa Hond Utrecht IV
pomona, cepa Pomona
bataviae, cepa Swart
australis, cepa Ballico
wolffi, cepa Divaldo
patoc, cepa Patoc I

Os soros reagentes na diluição de 1:100 foram titulados da seguinte maneira: 0,2 ml de solução salina foram colocados em cada escavação da placa de porcelana, e foram adicionados 0,2 ml de soro diluído a 1:50 na primeira escavação. Após a mistura, foram retirados 0,2 ml, colocados na segunda escavação e assim sucessivamente, até a diluição final desejada. Foram obtidos, então, títulos de 1:100, 1:200, 1:400 etc. A seguir, foram colocados 0,2 ml de antígeno em cada uma das diluições de soro que apresentaram títulos finais dobrados, respectivamente: 1:200, 1:400, 1:800 etc.

As placas foram incubadas a 37°C, durante duas horas, procedendo-se, a seguir, à leitura em microscópio de campo escuro.

De acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde¹², foi considerado

como parâmetro diagnóstico mínimo, nesta reação, o título de 1:200.

Em relação à soroaglutinação para a cepa Patoc I, rotineiramente utilizada como antígeno de triagem⁶, os resultados foram expressos como positivo ou negativo na diluição de 1:100, não se procedendo ao teste para diluições sucessivas, em caso de positividade.

Hemaglutinação passiva

A prova de hemaglutinação passiva (HAP) para a pesquisa de anticorpos anti-F₁, onde F₁ é o antígeno polissacarídico de FAINE et alii⁸, foi realizada conforme a técnica descrita por RIBEIRO et alii¹⁵. O sorotipo usado para a extração do antígeno polissacarídico F₁ foi o patoc Patoc I.

Reação de imunofluorescência indireta

Para a prova de imunofluorescência indireta (IFI), culturas da cepa Patoc I, em meio Korthoff, foram fixadas em formol a 1%, durante uma hora, a 37°C; a seguir, centrifugadas a 15.900 x g*, durante 15 minutos, e lavadas duas vezes com solução salina tamponada fosfatada (SSTF), pH 7,2. O sedimento ressuspenso numa concentração de aproximadamente 100 leptospiros por campo microscópico (aumento 400 x) foi distribuído em lâminas adequadas para imunofluorescência. As lâminas foram fixadas a 37°C e conservadas a -70°C.

Os soros dos pacientes, diluídos à razão dois, foram gotejados sobre o antígeno a partir da diluição de 1:2, em seguida, incubados a 37°C, durante 30 minutos, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 2 vezes durante dez minutos com SSTF, pH 7,2, e incubadas, durante 30 minutos a 37°C, com o conjugado, constituído por soro de coelho anti-imunoglobulinas totais e anti-IgM humanas, marcado com isotiocianato de fluoresceína, diluído conforme o título em Azul de Evans a 1 mg%, em SSTF, pH 7,2; após a incubação, foram lavadas duas vezes durante dez minutos com SSTF, pH 7,2, e a seguir foram cobertas com lamínulas e glicerina tamponada, pH 8,5.

A leitura foi efetuada em microscópio de fluorescência**, sendo o título final considerado como aquele correspondente à última diluição do soro, que apresenta fluorescência positiva. Para controle da reação, foram utilizados soros positivos e negativos.

RESULTADOS

Hemocultura — Em todas as hemoculturas semeadas não houve crescimento de leptospira.

Reações sorológicas — Os resultados pormenorizados obtidos com estas reações estão distribuídos na tabela 1, onde na 1.ª coluna se encontram as iniciais dos nomes dos 38 pa-

cientes, seguindo-se o número de dias após o início dos sintomas nos quais foram colhidas a 1.ª, 2.ª e 3.ª amostras de sangue. A seguir, constam os títulos obtidos na prova de SAM para os quatro sorotipos em que houve positividade, a saber: *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippotyphosa* e *pomona*. Nas colunas seguintes, estão os resultados das reações de HAP e IFI para pesquisa de imunoglobulinas totais e da classe M.

Soroaglutinação microscópica — O presumível sorotipo causador da doença foi aquele para o qual foram encontrados os maiores títulos de aglutininas específicas nas amostras de soro examinadas. Predominou o sorotipo *icterohaemorrhagiae*, em 25 casos. O sorotipo *copenhageni* foi detectado em quatro casos, o sorotipo *grippotyphosa*, em três, e o sorotipo *pomona*, em um. As soroaglutinações efetuadas com a cepa Patoc I foram positivas em todos os pacientes que apresentaram reação positiva para algum dos sorotipos já citados. Em três pacientes (n.º 13, 31, 33), as reações de soroaglutinação foram sempre negativas. O paciente número 3 apresentou nas três amostras os seguintes resultados: negativo na 1.ª amostra, título positivo a 1:800 para os sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*, na 2.ª amostra, e título de 1:200 para os mesmos sorotipos na 3.ª amostra. A SAM do paciente n.º 21, negativa na 1.ª amostra, foi positiva, ao título de 1:400 na 2.ª amostra, para *icterohaemorrhagiae* assim como para *grippotyphosa*.

A frequência dos sorotipos presumivelmente causadores da moléstia, determinada através da prova de soroaglutinação microscópica, encontra-se na tabela 2.

Do total de 38 pacientes, 19 (50%) apresentaram título inicial menor ou igual a 1:200, na prova de soroaglutinação microscópica.

As variações dos títulos das reações mostraram a seguinte distribuição da 1.ª para a 2.ª amostra: 25 pacientes (65,79%) tiveram ascensão de títulos, 6 (15,79%), queda, 4 (10,53%) mantiveram o mesmo título e 3 (7,80%) apresentaram aglutinação sempre negativa (menor que 1:200).

Da 2.ª para a 3.ª amostra, em 8 pacientes (36,36%) houve ascensão de título, em 9 (40,90%), houve queda, 4 (18,18%) mantiveram o mesmo título e 1 (4,54%) continuou negativo.

Reação de hemaglutinação passiva — Nos 38 pacientes cujas amostras de soro foram examinadas pela técnica de HAP, a variação de título encontrada da 1.ª para a 2.ª amostra sérica mostra 28 pacientes (73,68%) com ascensão, 2 (5,26%), com queda, 6 (15,79%), com manutenção do título. Dois pacientes (n.º 13 e 31) apresentaram nas duas amostras títulos de 1:16.

* g = aceleração padrão da gravidade (9.807 mm/s²).

** Olympus — lâmpada Osram HBO-200 W/4.

TABELA 1

Resultados obtidos com as reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta para pesquisa de imunoglobulinas totais (Ig totais) e imunoglobulinas da classe M (IgM) nas amostras de soro dos pacientes com quadro clínico sugestivo de leptospirose

Amostra Nome	Dia da coleta após o início dos sintomas			Soroaglutinação microscópica (título 1:)												Hemaglutinação Passiva (título 1:)			Imunofluorescência indireta (título 1:)					
				Sorotipos															Cepa Patoc I			Cepa Patoc I		
	icterohaemorrhagiae			copenhageni			grippityphosa			pomana			Ig totais			IgM								
1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	
1) MTS	7	28	40	200	3.200	800	200	3.200	12.800	—	1.600	3.200	—	—	—	612	512	256	32	512	32	256	256	256
2) MFL	6	27	39	1.600	800	800	800	400	400	200	800	400	—	—	—	128	2.048	512	4	64	512	64	64	256
3) ESO	10	22	40	25.600	12.800	3.200	400	800	200	800	1.600	800	—	—	—	16.384	1.024	512	512	512	64	64	256	256
4) JV	7	22	35	—	1.600	3.200	—	200	400	—	800	800	—	—	—	32	2.048	1.024	8	512	256	8	256	256
5) JAS	5	16	...	200	400	...	400	3.200	...	—	—	—	—	—	—	256	2.048	...	64	256	...	64	256	...
6) YK	5	17	45	—	1.600	1.600	—	—	—	—	800	3.200	—	—	—	256	2.048	2.048	8	256	64	256	512	512
7) LBS	4	15	33	3.200	800	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32	1.024	1.024	8	64	256	256	512	512
8) JAC	7	18	34	—	800	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	1.024	512	256	512	256	512	256	512
9) ACD	8	16	48	—	—	—	—	800	1.600	—	—	—	—	—	—	2.048	2.048	1.024	64	256	16	512	512	256
10) MAS	4	12	...	—	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	1.024	...	64	64	...	256	512	...
11) ARS	4	13	44	—	1.600	800	—	1.600	1.600	—	1.600	6.400	—	—	—	2.048	65.536	32.768	64	256	256	512	1.024	512
12) SMA	4	13	43	—	800	1.600	—	—	400	—	—	800	—	—	—	64	512	256	16	256	256	8	512	256
13) JCC	8	15	...	—	—	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	16	...	512	64	...	256	256	...
14) MS	5	12	...	400	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16.384	32.768	...	64	64	...	512	1.024	...
15) TVP	10	23	...	—	400	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	256	2.048	...	64	64	...	512	512	...
16) EVC	2	11	34	—	400	400	—	—	—	—	400	6.400	—	—	—	64	256	256	64	512	64	512	256	256
17) PS	4	12	...	800	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.024	1.024	...	64	256	...	512	512	...
18) JCB	4	11	35	—	400	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	1.024	256	32	256	64	4	256	64
19) MIP	8	18	...	200	800	...	—	400	...	—	400	...	—	—	—	2.048	8.192	...	256	512	...	64	256	...
20) ASS	8	18	...	6.400	6.400	...	200	1.600	...	200	1.600	...	—	—	—	1.024	2.048	...	512	1.024	...	64	512	...
21) RJS	6	13	...	—	400	...	—	—	—	—	400	...	—	—	—	64	512	...	16	512	...	8	512	...
22) FJA	7	14	...	200	200	...	—	—	—	—	—	...	—	—	—	2.048	8.192	...	256	512	...	512	1.024	...
23) JLR	7	14	31	3.200	6.400	800	—	400	800	—	200	800	—	—	—	256	256	256	512	1.024	64	64	64	256
24) KI	10	20	...	800	1.600	...	200	—	...	—	—	...	400	800	...	8.192	8.192	...	64	512	...	2.048	512	...
25) JM	3	12	...	3.200	3.200	...	—	400	...	—	400	...	—	—	—	8.192	16.384	...	1.024	256	...	256	2.048	...
26) CRS	4	14	29	—	400	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32	512	128	4	64	64	—	256	258
27) MCAS	4	13	...	6.400	1.600	...	800	1.600	...	1.600	3.200	...	800	1.600	...	16.384	1.024	...	64	512	...	512	512	...
28) MHK	7	16	35	1.600	3.200	400	—	200	200	—	—	—	400	200	—	1.024	2.048	512	256	2.048	512	1.024	512	256
29) JRO	6	15	...	400	200	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	1.024	...	256	64	...	64	64	...
30) AN	3	11	...	200	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	2.048	...	512	256	...	256	256	...
31) JOS	10	22	...	—	—	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	16	...	64	64	...	4	—	...
32) IMG	7	23	49	1.600	1.600	3.200	1.600	25.800	51.600	400	1.600	3.200	—	—	—	2.048	8.192	32.768	1.024	1.024	512	2.048	256	256
33) TAC	10	23	31	—	—	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	128	512	128	256	512	16	64	256	64
34) JAF	8	17	33	—	800	200	—	800	200	—	200	200	—	—	—	2.048	2.048	2.048	256	256	64	64	64	64
35) FPS	7	14	32	400	800	400	—	800	200	—	400	200	—	—	—	512	1.024	256	64	64	64	32	64	16
36) JDM	3	11	30	—	200	...	—	—	—	—	—	—	400	400	...	256	1.024	128	—	256	64	—	256	64
37) JCS	7	13	31	—	200	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	256	128	512	256	64	64	256	64
38) CAS	5	11	33	1.600	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	256	16.384	8.192	64	1.024	512	64	256	256

Observação: as casas com o sinal de menos (—) indicam reações negativas, e com o sinal de pontuação (...) indicam amostras não colhidas.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, I.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. —
Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. —
 Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutina-
 ção microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*,
 41(2):135-143, 1981.

TABELA 2

Freqüência dos sorotipos de leptospira causadores da moléstia nos 38 pacientes, determinada através da soroaglutinação microscópica

Sorotipo	N.º de casos *	Freqüência (%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	25	65,79
<i>copenhageni</i>	4	10,53
<i>grippotyphosa</i>	3	7,89
<i>pomona</i>	1	2,63
<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>copenhageni</i>	1	2,63
<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>grippotyphosa</i>	1	2,63

* Nos 38 casos analisados, 3 foram sempre negativos para a soroaglutinação microscópica.

Da 2.^a para a 3.^a amostra, 1 paciente (4,54%) mostrou ascensão de título, 16 (72,73%) tiveram queda, enquanto que em 5 (22,73%) os títulos não se alteraram.

A mediana dos títulos de HAP e IFI, no grupo de controle, foi de 1:16 (tabela 3).

Reação de imunofluorescência indireta — Os títulos obtidos nas amostras séricas dos 38 pacientes, através da prova da IFI para a pesquisa de imunoglobulinas totais, apresentaram as seguintes variações da 1.^a para a 2.^a amostra: 28 pacientes (65,79%) revelaram ascensão de título, 5 pacientes (13,16%) revelaram queda e 8 (21,05%) mantiveram o título.

Da 2.^a para a 3.^a amostra, 2 pacientes (9,09%) apresentaram ascensão, 16 (72,73%) mostraram queda e 4 pacientes (18,81%) não alteraram seus títulos.

Na IFI para pesquisa de IgM específicos, houve a seguinte alteração de títulos da 1.^a para a 2.^a amostra: 17 pacientes (44,74%), com ascensão, 8 (21,05%), com queda, e 12 pacientes (31,58%) com manutenção de título inicial. Um paciente, (2,63%), o de n.º 31, manteve-se sempre negativo, com título menor ou igual a 1:4. Da 2.^a para a 3.^a amostra, 3 pacientes (13,64%) apresentaram aumento de títulos, 9 pacientes (40,90%) mostraram queda de títulos, enquanto que 10 pacientes (45,45%) se mantiveram no mesmo título.

TABELA 3

Varição de título apresentado pelo grupo controle (100 soros humanos normais) nas reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta para pesquisa de imunoglobulinas totais (Ig totais) e anticorpos IgM

Título (1:)	N.º de casos	Hemaglutinação passiva	Imunofluorescência indireta	
			Ig totais	IgM
negativo		2	4	5
2		1	3	2
4		13	16	12
8		16	12	19
16		23	40	27
32		27	22	24
64		14	2	11
128		2	1	0
256		2	0	0
Mediana dos títulos		16	16	16

TABELA 4

Distribuição das reações sorológicas segundo os resultados positivos ou negativos nos 38 pacientes estudados

Reações	N.º de casos	Títulos	
		Negativos	Positivos
SAM		3	35
HAP		2	36
IFI (Ig totais)		0	38
IFI (IgM)		1	37

Comparando-se a sensibilidade das reações experimentadas em todas as amostras de soro, verificou-se a distribuição das reações sorológicas, segundo os títulos positivos ou negativos, nos 38 pacientes estudados, conforme a tabela 4.

Aplicando-se o teste estatístico do X^2 , não foi verificada diferença significativa quanto à sensibilidade dessas reações, a nível de 5%.

A porcentagem comparativa de resultados com títulos significativos na 1.ª amostra de soro dos 38 pacientes examinados pelas reações sorológicas está representada na figura 1.

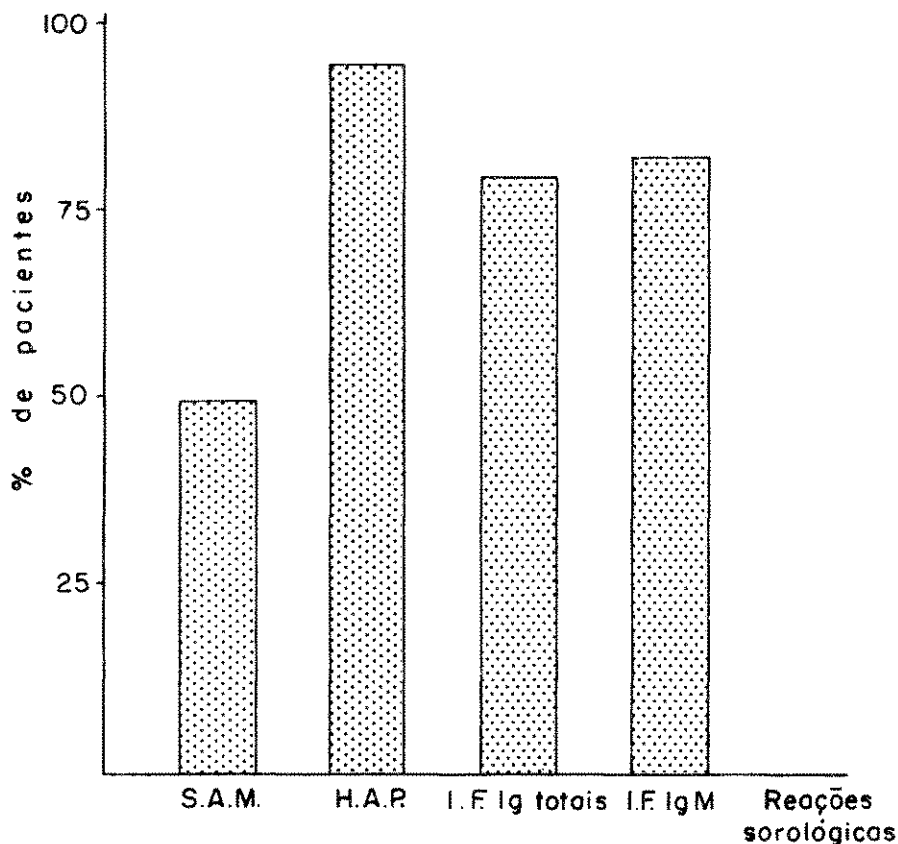


FIGURA 1 — Frequência percentual dos 38 pacientes com reações sorológicas com títulos significativos na 1.ª amostra de soro.

Aplicando-se o teste estatístico de igualdade de proporções para comparar a porcentagem de positividade na 1.^a amostra, foi verificada diferença significativa da reação de soroaglutinação microscópica comparativamente às demais. Tal diferença não foi verificada entre a hemaglutinação passiva e a imunofluorescência indireta.

Entre a 1.^a e a 2.^a amostra de sangue, considerando-se a ascensão de título nas quatro reações testadas, não foi verificada diferença estatisticamente significativa; porém, entre a 2.^a e a 3.^a amostra houve diferença como pode ser evidenciado na figura 2.

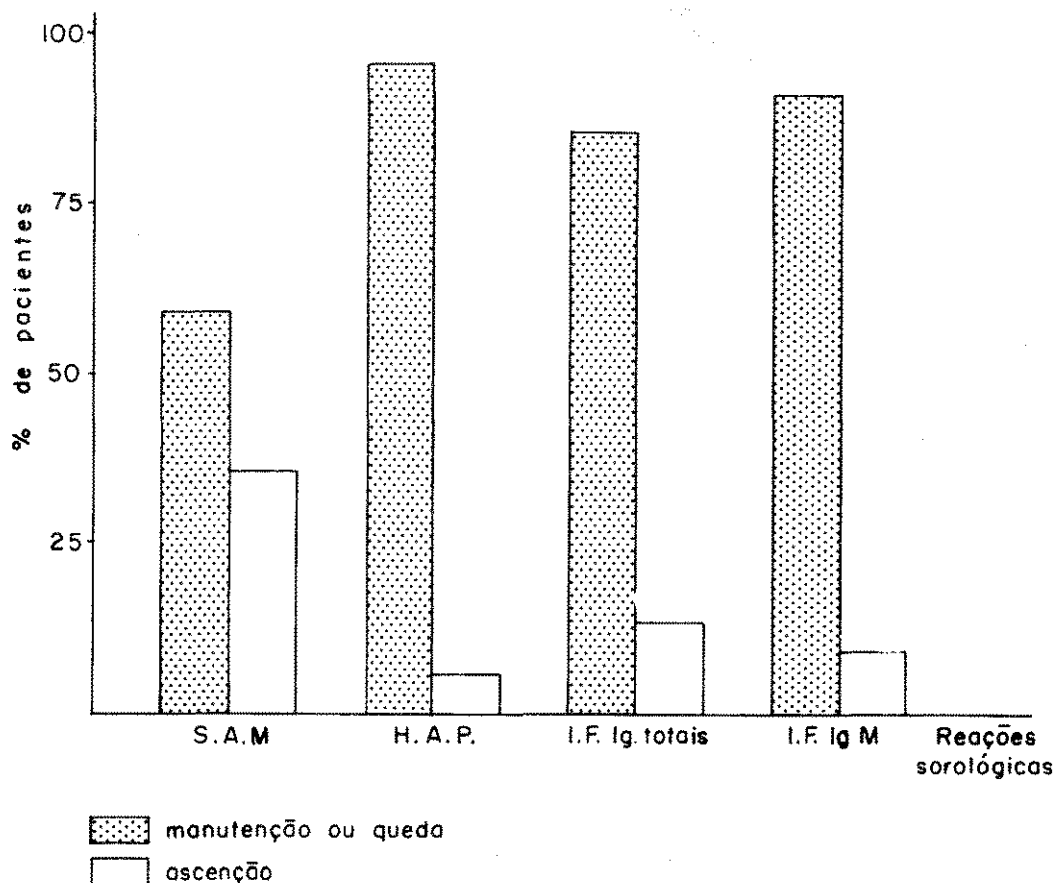


FIGURA 2 — Frequência percentual de 22 pacientes com manutenção ou queda e ascensão de títulos entre a 2.^a e 3.^a amostras de sangue.

Comparando-se a porcentagem de pacientes com manutenção ou queda de títulos, e depois a porcentagem dos pacientes com ascensão de títulos de anticorpos pelo teste de igualdade de proporções, foi verificada diferença estatisticamente significativa; assim é que a reação de soroaglutinação microscópica foi a que apresentou menor tendência à queda dos títulos de anticorpos comparativamente às demais. Diferença significativa não foi verificada entre as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta (Ig totais e IgM).

DISCUSSÃO

O isolamento da leptospira através da hemocultura tem sido pouco freqüente^{3,7}. A maioria dos pacientes com leptospirose procura assistência médico-hospitalar ao fim da 1.^a semana do início dos sintomas, coincidindo com o aparecimento de anticorpos circulantes e, conseqüentemente, diminuição ou mesmo ausência de microrganismos no sangue, o que resulta em negatização da maioria das hemoculturas, como aconteceu em nosso estudo.

O sorotipo predominante, na prova de soroaglutinação, foi o *icterohaemorrhagiae*. Este resultado concorda com os relatos de diferentes autores 1, 2, 4, 5, 9, 11.

Em decorrência da análise estatística, o título considerado significativo para as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência foi maior do que 16, pois a mediana do grupo controle situou-se em 16.

Em nossa casuística, as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta apresentaram resultados positivos na maioria dos pacientes, já na 1.^a amostra de soro — 94,74%, na hemaglutinação, 78,95%, na imunofluorescência para pesquisa de imunoglobulinas totais e 81,58%, na imunofluorescência para anticorpos IgM — ao contrário da reação de soroaglutinação microscópica cuja falha foi de 50%, sendo tal diferença estatisticamente significativa. É ponto pacífico que, na fase aguda da leptospirose, o anticorpo predominante é da classe M.

Na comparação dos padrões de queda ou manutenção e ascensão de títulos de anticorpos, na evolução dos pacientes, entre a 2.^a e a 3.^a amostras de soro (figura 2) evidenciou-se que as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta apresentaram queda precoce, ao passo que a reação de soroaglutinação microscópica, em oito dentre 38 pacientes, com uma média aproximada de 38 dias após o início dos sintomas, continuou com ascensão de títulos. Por conseguinte, as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta apresentaram-se como melhores testes para o diagnóstico de doença aguda.

A sensibilidade das reações, conforme ficou demonstrado pela análise da tabela 4, utilizando-se o teste do X^2 , não apresentou diferença estatisticamente significativa; porém, analisando-se individualmente os dados de três pacientes (n.º 13, 31 e 33), negativos à soroaglutinação microscópica, nas diferentes amostras de sangue, verifica-se que apresentaram anticorpos detectáveis à reação de imunofluorescência indireta para IgM ou

para imunoglobulinas totais. A paciente n.º 33 apresentou resultados positivos também na prova de hemaglutinação passiva.

A utilização de uma única cepa saprofítica, nas provas de HAP e IFI, foi suficiente para detectar anticorpos na maioria dos pacientes, fato de importância em clínica, pois o diagnóstico específico da doença é suficiente, desde que não existe tratamento medicamentoso diferente para as leptospiroses causadas pelos diferentes sorotipos. Ademais, a precocidade do diagnóstico laboratorial é de primordial importância para a orientação terapêutica adequada. Caso haja a necessidade de se identificar o sorotipo causador, por motivos epidemiológicos ou por outras razões, as amostras de soro poderão ser testadas convenientemente, em laboratórios dotados de possibilidades diagnósticas mais amplas.

CONCLUSÕES

A hemocultura, como método de diagnóstico laboratorial na leptospirose, não apresentou valor prático no material estudado.

A utilização de uma única cepa saprofítica, sorotipo *patoc* Patoc I, nas reações de hemaglutinação e de imunofluorescência indireta foi suficiente para a detecção de anticorpos nos pacientes com leptospirose, comportando-se as referidas reações como gênero-específicas.

As reações de hemaglutinação passiva e de imunofluorescência indireta utilizam antígenos estáveis que podem ser estocados pelo prazo de seis meses a um ano. Comparativamente à reação de soroaglutinação microscópica, positivam-se precocemente, demonstrando mais rapidamente a queda de títulos de anticorpos, durante a evolução clínica do paciente, proporcionando, por conseguinte, uma informação mais precisa da doença leptospirótica aguda. A hemaglutinação passiva é mais adequada porque, além de possuir as características acima, é mais rápida e de custo operacional mais barato.

RIALA6/537

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Immunodiagnosis of human leptospirosis. 2. Comparative study of microscopic agglutination, passive hemagglutination and indirect immunofluorescence tests. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

ABSTRACT: Tests of passive hemagglutination employing sheep red blood cells sensitized with F₁ polysaccharide antigen of serovar *patoc* and indirect immunofluorescence using the same serovar antigen were carried out in 98 specimens from 38 patients suffering from leptospirosis presumably caused by serovars *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippothyphosa* or *pomona*. The results were compared with those obtained with microscopic agglutination test using 10 pathogenic serovars. Passive hemagglutination and indirect immunofluorescence tests were genus-specific. Passive hemagglutination is considered to be more appropriate for the early diagnosis of acute human leptospirosis.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunodiagnosis; microscopic agglutination; passive hemagglutination; indirect immunofluorescence.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, A.D. — La distribution de la leptospirosis en America Latina. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 49:149-64, 1960.
2. AZEVEDO, R. & CORRÊA, M.O.A. — Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife em 1966. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:85-111, 1968.
3. BORG-PETERSEN, C. — Experience of leptospirosis in Denmark. *Proc. R. Soc. Med.*, 42:714-8, 1949.
4. CALDAS, E.M.; COSTA, E. & SAMPAIO, M.B. — Leptospire na cidade de Salvador (Brasil). Alguns aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20:164-76, 1978.
5. CORRÊA, M.O.A. — Human leptospirosis in Brazil. *Int. J. Zoonosis*, 2:1-9, 1975.
6. CORRÊA, M.O.A.; NATALE, V.; SADATSUNE, T. & FLEURY, G.C. — Valor prático do uso da *Leptospira semaranga* Patoc I no diagnóstico das leptospiroses humanas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 12:284-7, 1970.
7. CORRÊA, M.O.A.; VERONESI, R.; BRITO, T.; HYAKUTAKE, S.; SANTA ROSA, C.A. & EDELWEISS, E.L. — Leptospiroses. In: VERONESI, R. — *Doenças infecciosas e parasitárias*. 6.^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p. 787-803.
8. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 52:311-9, 1974.
9. MAGALDI, C. — Incidência, prevalência e distribuição das leptospiroses no Brasil. *Arq. Hig. Saúde públ.*, 28:187-97, 1963.
10. MYERS, D.M. — Evaluacion de antigenos de la envoltura externa de *Leptospira* en las pruebas de fijacion de complemento y de hemaglutinacion para la leptospirosis. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 87:141-50, 1979.
11. OLIVEIRA, V.J.C.; ROCHA, J.M.B.; SILVA, G.B. & CABRAL, C.L.N. — Considerações sobre o novo surto epidêmico de leptospirose humana na Grande Recife, Brasil, em 1975. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:33-36, 1977.
12. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE — Group d'experts de l'OMS. *Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose*. Moscou, 1966. *Rapport*. Genève, 1967. [Sér. rapp. techn. n.º 380]
13. PALIT, A. & GULASEKHARAM, J. — Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. clin. Path.*, 26:7-16, 1973.
14. 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.
15. RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polisacárido para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:127-133, 1981.
16. ROCH, P.; SRAMKOVÁ, L. & SALÁK, J. — The agglutinating and immunofluorescent activities of antileptospiral antibodies of human sera and of immunoglobulins M and G. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, Prague, 20:341-52, 1976.
17. SANTA ROSA, C.A. — Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, 1:97-109, 1970.
18. SULZER, C.R.; GLOSSER, J.W.; ROGERS, F.; JONES, W.L. & FRIX, M. — Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J. clin. Microbiol.*, 2:218-21, 1975.
19. SULZER, C.R. & JONES, W.L. — Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Appl. Microbiol.*, 26:655-7, 1973.
20. TERPSTRA, W.J.; LIGTHART, G.S. & SCHOONE, G.J. — Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 247:400-5, 1980.
21. TERPSTRA, W.J.; SCHOONE, G.J. & LIGTHART, G.S. — Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of human leptospirosis. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 244:285-90, 1979.
22. TORTEN, M.; SHENBERG, E. & VAN DER HOEDEN, J. — The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. *J. infect. Dis.*, 116:537-43, 1966.
23. TURNER, L.H. — Leptospirosis II: serology. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 62:880-99, 1968.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1981.

