

AValiação DA PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA NO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA *

Maricy Alves RIBEIRO **
Antonella GODANO **
Massami KAWARABAYASHI **
Raquel Bellinati Robert PIRES **
Márcia de Souza Carvalho MELHEM **
Thaís Helena Sampaio VIANNA **
Zélia Maria de Oliveira CAVALCANTE ***

RIALA6/570

RIBEIRO, M. A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R. B. R.; MELHEM, M. S. C.; VIANNA, T. H. S. & CAVALCANTE, Z. M. O. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):35-40, 1984.

RESUMO: A prova de hemaglutinação passiva foi avaliada em relação à soroaglutinação microscópica em 437 amostras de soros provenientes de 192 pacientes com quadro clínico sugestivo de leptospirose, internados no Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", em São Paulo. A prova de hemaglutinação passiva apresentou associação significativa com a soroaglutinação microscópica, revelando-se, pois, uma prova alternativa de elevado valor diagnóstico.

DESCRIPTORIOS: leptospirose humana, imunodiagnóstico; anticorpos, determinação no soro; prova de hemaglutinação passiva.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença com alta prevalência em nosso meio. Epidemias podem ocorrer na época das chuvas, quando os hospitais são procurados por numerosos pacientes com suspeita de leptospirose, provenientes das regiões atingidas pelas enchentes. O diagnóstico laboratorial é feito, principalmente, pela pesquisa de anticorpos específicos, sendo que a soroaglutinação microscópica (SAM), que utiliza culturas vivas de leptospira, é a prova-padrão recomendada pela Organização Mundial da Saúde⁴. Apresenta porém a necessidade de manutenção de culturas de numerosos sorotipos patogênicos, oferecendo ainda risco de contaminação ao laboratorista. Outras provas têm sido propostas, dentre elas a hemaglu-

tinação passiva (HAP), avaliada há vários anos por diversos autores^{2, 7, 9, 10}. No entanto, não tem sido tão empregada quanto a prova de SAM⁴, porque os resultados nem sempre se correlacionam, provavelmente devido a diferentes sistemas antígeno-anticorpo envolvidos. Conseqüentemente, tem havido tendência em subestimar o valor da prova de HAP, prevalecendo os resultados da prova de referência (SAM). Entretanto, é conceito vigente entre os pesquisadores que a prova de HAP, além de ser gênero-específica e de rápida execução, detecta anticorpos na fase aguda da infecção e, para tanto, utiliza como antígeno uma fração polissacarídica da leptospira^{4, 9}.

O presente trabalho pretende avaliar a HAP como prova diagnóstica, comparada à SAM, em condições onde o laboratório não

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto de Saúde, São Paulo, SP.

tem acesso a maiores informações quanto à fase da doença em que se encontra o paciente, por ocasião da coleta das amostras nomicamente a leptospira, a saber:

MATERIAIS E MÉTODOS

Soros analisados

No período de janeiro a abril de 1983, foram obtidas 437 amostras de sangue, colhidas por punção venosa, compreendendo 2 a 3 amostras seriadas de 192 pacientes internados no Hospital de Isolamento "Emílio Ribas" de São Paulo, com quadro clínico sugestivo de leptospirose. Foram também analisadas amostras séricas de pacientes com outras doenças que devem ser consideradas no diagnóstico diferencial, ou cujo agente etiológico está relacionado morfológica e taxonomicamente à leptospira, a saber:

- 20 pacientes com malária, com parasitemia comprovada por exame de gota espessa, sendo 13 por *P. falciparum* e 7 por *P. vivax*;
- 14 pacientes com hepatite por vírus A, cujos soros foram positivos para anticorpo IgM, ou através da prova de radioimunoensaio*;
- 42 com hepatite por vírus B, com antígeno HBs positivo na prova de hemaglutinação passiva reversa;
- 28 pacientes com sorologia sugestiva de sífilis, ou seja, reagentes nas provas de fixação de complemento (microtécnica do "Laboratory Branch Complement Fixation"), VDRL** e FTA-ABS***;
- 20 pacientes com febre tifóide, confirmados por hemocultura ou por meio de reação de Widal, com diagnóstico clínico compatível.

Soroaglutinação microscópica

A prova de soroaglutinação microscópica foi realizada de acordo com a técnica descrita em RIBEIRO *et alii*⁹, utilizando a bateria constituída pelos seguintes sorotipos:

- icterohaemorrhagiae*, cepa RGA;
- copenhageni*, cepa M20;
- panama*, cepa CZ214 K;
- grippotyphosa*, cepa Moskva V;
- canicola*, cepa Hond Utrecht IV;
- pomona*, cepa Pomona;
- bataviae*, cepa Swart;
- australis*, cepa Ballico;

wolffi, cepa Divaldo;

patoc, cepa Patoc I.

Foram considerados soros com títulos significativos, mencionados como positivos, aqueles que reagiram à diluição 1:100 ou maior, com algum dos sorotipos acima referidos, critério este adotado por diversos autores^{10, 11, 13}.

Hemaglutinação passiva

A prova de hemaglutinação passiva, para a pesquisa de anticorpos específicos para antígeno polissacarídico F₁ de *patoc* Patoc I⁵, foi realizada conforme procedimento descrito em RIBEIRO *et alii*⁹. O valor adotado como título significativo, mencionado como positivo (≥ 128), nesta prova, teve por base a análise dos resultados encontrados no grupo-controle de 100 soros humanos considerados normais, estudado em trabalho anterior⁹, onde a frequência deste título ocorreu em apenas 4% desse grupo. Foram considerados significativos, também, os resultados em que houve soroconversão, isto é, com diferença de duas ou mais diluições entre duas amostras seriadas.

Análise estatística

Foram empregados os testes do χ^2 e de igualdade de proporções, com nível de significância (α) igual a 5% para verificar respectivamente a associação e a precocidade diagnóstica apresentadas nas provas de SAM e HAP, nas amostras analisadas.

RESULTADOS

A análise dos resultados obtidos na prova de hemaglutinação passiva teve por base o confronto com a prova de soroaglutinação microscópica. Na tabela 1 são encontrados os resultados da 1.^a amostra sérica dos 192 pacientes estudados.

Observou-se positividade simultânea em 36,46% e concordância quanto a resultado negativo em 45,31% das amostras. Em 35 soros houve discordância nos resultados das provas, sendo 24 (12,50%) com títulos positivos somente para a prova de HAP e 11 (5,73%) para a prova de SAM.

A conclusão diagnóstica laboratorial específica, obtida através de ambas as provas, após seguimento sorológico dos pacientes, encontra-se na tabela 2.

Observou-se concordância entre as duas provas em 73,44% dos pacientes, quanto à presença de títulos positivos e, em 20,31%, quanto à ausência desses títulos. Em 12 (6,25%) pacientes, os resultados laboratoriais foram discordantes.

* Conjunto de reagentes HAVAB-M, Abbott Lab., North Chicago, Ill., E.U.A.

** Reação de floculação em lâmina, utilizando o antígeno de cardiolipina.

*** Teste de anticorpos treponêmicos fluorescentes com absorção prévia dos soros com treponema Reiter.

RIBEIRO, M. A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R. B. R.; MELHEM, M. S. C.; VIANNA, T. H. S. & CAVALCANTE, Z. M. O. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):35-40, 1984.

TABELA 1

Resultados obtidos nas provas de soroaclutinação microscópica e hemaglutinação passiva na 1.^a amostra sérica dos 192 pacientes

HAP \ SAM	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%
Casos positivos	70	36,46	11	5,73	81	42,19
Casos negativos	24	12,50	87	45,31	111	57,81
Total	94	48,96	98	51,04	192	100,00

$$\chi^2_{\text{observado}} = 2,708$$

$$\chi^2_{\text{crítico}} (0,05) = 3,841$$

gl = 1

TABELA 2

Distribuição dos 192 pacientes, segundo conclusão diagnóstica após o estudo sorológico seqüencial nas provas de soroaclutinação microscópica e hemaglutinação passiva

HAP \ SAM	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%
Casos positivos	141	73,44	5	2,60	146	76,04
Casos negativos	7	3,65	39	20,31	46	23,90
Total	148	77,09	44	22,91	192	100,00

$$\chi^2_{\text{observado}} = 0,533$$

$$\chi^2_{\text{crítico}} (0,05) = 3,841$$

gl = 1

Quanto aos cálculos estatísticos, o χ^2 indica a existência de associação entre as provas de SAM e HAP, ao nível de 5% na 1.^a amostra sérica (tab. 1), bem como após a conclusão diagnóstica laboratorial (tab. 2).

A verificação da precocidade diagnóstica nos 141 pacientes, cujos resultados finais foram positivos em ambos os métodos, encontra-se na tabela 3.

Constatou-se que 109 pacientes mostraram títulos positivos nas duas provas, na mesma amostra sérica (positividade simultânea). Em 22 destes pacientes, a HAP demonstrou

anticorpos específicos precocemente em relação à SAM. Por outro lado, a SAM revelou precocemente títulos positivos em 10 pacientes. Aplicando-se o teste de proporções para comparar a precocidade relativa da SAM e da HAP, conclui-se que, ao nível de 5%, não houve diferença estatisticamente significante.

Na tabela 4 encontram-se os resultados obtidos com o emprego da prova HAP em uma única amostra sérica de pacientes com infecções várias, a saber: malária, hepatite, sífilis e febre tifóide. Esses soros não tiveram títulos positivos para leptospirose, na prova de soroaclutinação microscópica.

TABELA 3

Distribuição dos 141 pacientes, segundo a precocidade diagnóstica das provas de soroaglutinação microscópica e hemaglutinação passiva

Positividade simultânea	Positividade precoce		Total
	HAP	SAM	
109	22	10	141

TABELA 4

Distribuição dos 124 pacientes, segundo a doença, e títulos de anticorpos na hemaglutinação passiva para o diagnóstico da leptospirose

Doença	Título na HAP	≤ 64	128	256	TOTAL
Hepatite B		41	0	1	42
Hepatite A		13	0	1	14
Sífilis		27	1	0	28
Febre tifóide		18	2	0	20
Malária (<i>P. falciparum</i>)		13	0	0	13
Malária (<i>P. vivax</i>)		7	0	0	7
Total		119	3	2	124

DISCUSSÃO

Entre as imunoglobulinas produzidas na infecção leptospirótica humana estão as aglutininas responsáveis pela soroaglutinação microscópica, prova esta considerada relativamente sorotipo-específica⁴, quando são utilizados sorotipos patogênicos, e gênero-específica, quando o sorotipo *patoc* Patoc I é utilizado como antígeno.

Por outro lado, são conhecidos os anticorpos formados contra frações antigênicas de *Leptospira*, as quais têm a capacidade de sensibilizar eritrócitos *in vitro*, entre eles o anticorpo anti-F₁, intensivamente estudado por ADLER & FAINE¹, responsável pela reação de hemaglutinação passiva, objeto desta pesquisa. Títulos significativos obtidos nesta prova indicam presença de infecção aguda, eis que, ao

contrário da SAM, a HAP não revela anticorpos residuais de infecções progressas. O processamento das primeiras amostras de soro dos 192 pacientes demonstrou que existe associação entre SAM e HAP, ao nível de significância de 5%.

Cumpre-nos lembrar, no entanto, que não era conhecido o estágio vigente de doença na ocasião em que foram colhidas as amostras. Sabe-se que alguns pacientes vêm transferidos de outro hospital, ou procuram o Hospital "Emílio Ribas" tardiamente, de modo que nem sempre a primeira amostra por nós analisada corresponde ao período imediato ao início dos sintomas. Em vista disto, foi realizado um estudo sorológico seqüencial desses pacientes (tab. 2) onde se pode confirmar, após a conclusão diagnóstica laboratorial, que houve associação entre as provas de SAM e HAP.

Procurando avaliar os 7 casos (tab. 2), cujos resultados foram positivos somente na prova HAP, procedeu-se ao estudo retrospectivo de cada um destes pacientes, objetivando comprovação clínica, epidemiológica ou laboratorial. Verificou-se que 6 destes pacientes tiveram confirmação laboratorial (SAM com títulos positivos) em amostras subseqüentes, que foram analisadas após o término deste trabalho e apenas um caso não foi confirmado pela SAM, mas teve comprovação clínica e epidemiológica. Deste modo, foi aceita a hipótese de leptospirose nos 7 pacientes, podendo-se inferir que nesses casos houve precocidade diagnóstica da HAP em relação à SAM, e não resultados falso-positivos. Da mesma forma, a prova de SAM apresentou resultados positivos precoce em relação à HAP em 5 casos (em três os soros reagiram apenas com o sorotipo *patoc*) que foram confirmados clínica ou epidemiologicamente.

Analisando a precocidade diagnóstica das provas de SAM e HAP (tab. 3), constatou-se que, dentre os 141 pacientes que apresentaram títulos positivos em ambas as provas, 22 casos foram precocemente diagnosticados pela HAP contra 10, que o foram pela SAM. Porém, tal diferença não foi estatisticamente significativa ao nível de 5%, discordando dos resultados anteriormente apresentados por

RIBEIRO et alii⁹. Com isto, torna-se indispensável uma reavaliação da precocidade diagnóstica relativa às duas provas, utilizando-se os mesmos critérios de positividade, num grupo de pacientes com leptospirose, com conhecimento prévio da data do início dos sintomas.

Quanto à especificidade da prova de hemaglutinação, conforme observado na tabela 4, não foi relevante o número de casos com títulos positivos encontrados nos grupos de pacientes portadores de hepatite por vírus A e B, sífilis e malária. Sobre a ocorrência de dois casos de febre tifóide que apresentaram título igual a 128, não se pode descartar a hipótese de infecção dupla, conforme foi descrito por TIRIBA et alii¹². Devido ao número reduzido de casos estudados e à falta de maiores informações sobre esses pacientes, impõe-se a necessidade de nova investigação sobre a incidência de títulos de anticorpos hemaglutinantes para leptospirose, em indivíduos portadores de outras infecções.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao Dr. Marcelo O.A. Corrêa, pelo constante incentivo, e pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

RIALA6/570

RIBEIRO, M. A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R. B. R.; MELHEM, M. S. C.; VIANNA, T. H. & CAVALCANTE, Z. M. O. — Evaluation of passive hemagglutination test for human leptospirosis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):35-40, 1984.

ABSTRACT: The passive hemagglutination test for leptospirosis was compared with the microscopic seroagglutination test in 437 sera from 192 patients suspected to have leptospirosis, admitted to a hospital for infectious diseases in São Paulo City, Brazil. Passive hemagglutination assay demonstrated significant association with the microscopic seroagglutination test, revealing itself as an excellent alternative diagnostic method.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunodiagnosis; antibodies, determination in serum; passive hemagglutination test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B. & FAINE, S. — The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. med. Microbiol.*, 11:387-400, 1978.
2. CHANG, R. SHIH-MAN & McCOMB, D. E. — Erythrocyte sensitizing substances from five strains of leptospirae. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 3:481-9, 1954.
3. CORRÊA, M. O. A.; NATALE, V.; SADAT-SUNE, T. & FLEURY, G. C. — Valor prático do uso da *Leptospira semaranga* Patoc. I no diagnóstico das leptospiroses humanas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 12:284-7, 1970.
4. FAINE, S., ed. — *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, WHO, 1982. 171 p. [WHO offset publication n.º 67]

RIBEIRO, M. A.; GODANO, A.; KAWARABAYASHI, M.; PIRES, R. B. R.; MELHEM, M. S. C.; VIANNA, T. H. S. & CAVALCANTE, Z. M. O. — Avaliação da prova de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leptospirose humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):35-40, 1984.

5. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 52:311-9, 1974.
6. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Group d'experts de l'OMS. — *Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose*. Moscou, 1966. *Rapport*. Genève, 1967. [Sér. rapp. techn. n.º 380]
7. PALIT, A. & GULASEKHARAM, J. — Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. clin. Path.*, 26:7-16, 1973.
8. RIBEIRO, M. A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A. K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:127-33, 1981.
9. 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 soroglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:135-43, 1981.
10. 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. Microb.*, 2:218-21, 1975.
11. TERPSTRA, W. J.; SCHOONE, G. J. & LIGTHART, G. S. — Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of human leptospirosis. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 244: 285-90, 1979.
12. TIRIBA, A. C.; CALY, M. L.; PESSOA, M. C. & GUIMARÃES, J. X. — Febre tifóide com leptospirose icterohaemorrágica. Quatro casos de infecção simultânea observados no Hospital "Emílio Ribas", durante os anos de 1970-71. *R. Soc. bras. Med. trop.*, 6:399-400, 1972. [Resumo]. Apresentado no 8.º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, 1972.
13. TURNER, L. H. — Leptospirosis II. Serology. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 62:880-99, 1968.

Recebido para publicação em 10 de novembro de 1988.