

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

Marcos Vinicius da SILVA (1), Eide Dias CAMARGO (2), Adelaide José VAZ (2),
Ana Maria Carvalho de SOUZA (2), Mirthes UEDA (3) & Elena Emiko SAKATA (4)

RESUMO

Foi avaliado o teste imunoenzimático (ELISA), para detecção de anticorpos da classe IgM na leptospirose humana. Nas amostras de soros analisadas, o teste ELISA demonstrou ser mais sensível, específico e precoce, quando comparado ao teste de soroaglutinação microscópica. A análise dos resultados obtidos nesta avaliação demonstra que o teste ELISA permite detectar níveis baixos de anticorpos circulantes, e também anticorpos não aglutinantes, não detectáveis através do teste de soroaglutinação microscópica.

UNITERMOS: Leptospirose humana; Anticorpos IgM; Teste ELISA-IgM.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição universal.

No Brasil, a leptospirose acarreta sérios problemas à saúde pública, com aumento de sua incidência nos meses com maiores índices pluviométricos, fato que associado às precárias condições de saneamento básico estabelece condições adequadas para o pleno desenvolvimento de sua cadeia epidemiológica.

Ocupa lugar importante entre as causas de doenças profissionais, levando ao absentismo e repercussões econômicas. Em veterinária acarreta sérios prejuízos, por acometer principalmente a pecuária.

Entre as diferentes manifestações clínicas da leptospirose, a forma clássica do Síndrome de Weil não apresenta dificuldades diagnósticas na maioria dos casos. O mesmo não ocorre com as outras manifestações da doença, como a meningite linfocitária e quadros febris em que o diagnóstico clínico é muito difícil, necessitando auxílio laboratorial para a sua elucidação.

O isolamento da leptospira do sangue, líquido e urina de pacientes é quase sempre impossível em nosso meio, restando apenas como confirmação laboratorial ou mesmo na elucidação diagnóstica, o teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM) que é preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Este

(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, São Paulo, SP, Brasil.

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

(3) PqC e Chefe da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

(4) PqC da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Marcos Vinicius da Silva — Instituto Adolfo Lutz, Seção de Sorologia, 10º and. — Av. Dr. Arnaldo, 351. Caixa Postal 7027. CEP01246. São Paulo, SP, Brasil.

teste apresenta positividade tardia, dificultando ou impossibilitando o diagnóstico laboratorial na fase inicial da doença, ou em casos em que não ocorre o aparecimento de anticorpos aglutinantes da classe IgG^{1, 4}.

O objetivo deste trabalho é contribuir para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial da leptospirose, através da avaliação do teste imunoenzimático (ELISA-IgM) até então não utilizado em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Antígeno — preparado de acordo com a metodologia descrita por ADLER e cols¹ com algumas modificações.

Foram utilizadas culturas de leptospiros, cepa Patoc 1, procedentes do Center for Disease Control (Atlanta, USA) e mantidas em meio EMJH, no Instituto Adolfo Lutz. No 7º dia após o repique quando se obtém cerca de 5×10^7 leptospiros/ml, as bactérias foram congeladas a -20°C, durante 7 dias. Após o descongelamento e centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C, as leptospiros foram lavadas duas vezes com solução fosfatada tamponada, 0,02M, pH 7,2 (PBS), e ressuspensas em PBS no volume correspondente ao repique inicial. Em seguida foram submetidas a três ciclos de tratamento com ultrassom, 20 Khz, 0,8 mA, três minutos cada ciclo. O antígeno assim obtido foi dividido em alíquotas de 1 ml e armazenado a -20°C. Foram determinadas a concentração proteica pelo método de BRADFORD², e a concentração ótima do antígeno através de titulação em bloco, frente a soros padrões positivo e negativo.

2. Amostras de soro

2.1. Soros Padrões positivo e negativo: foram utilizados, respectivamente, um soro de paciente com leptospirose comprovada clínica e laboratorialmente (SAM), e um soro de um indivíduo sadio sem antecedentes clínicos e epidemiológicos para leptospirose.

2.2. Amostras pareadas de 41 pacientes com suspeita clínica de leptospirose, coletadas com intervalo médio de 13,8 dias. As primeiras amostras foram denominadas A₁ e as segundas A₂.

2.3. O grupo controle foi constituído por soros de 30 indivíduos adultos aparentemente saudáveis sem antecedentes clínicos e epidemiológicos para leptospirose (11 homens e 19 mulheres) denominado grupo B, e por 30 soros de pacientes com patologias que entram no diagnóstico diferencial da leptospirose: hepatite B (n=2), febre tifóide (n=2), febre amarela (n=1), dengue (n=1), citomegalovirose (n=1), sífilis (n=4), Doença de Chagas (n=4), malária (n=3), leishmaniose cutâneo-mucosa (n=4), mononucleose infecciosa (n=1), sarampo (n=1), artrite reumatóide (n=1), lupus eritematoso (n=3) e febre reumática (n=2). Este grupo foi denominado C.

3. Testes sorológicos

3.1. Teste imunoenzimático, ELISA-IgM, padronizado conforme metodologia descrita por MILNER e cols.⁶, com algumas modificações:

- a) Soluções e tampões: PBS: solução fosfatada tamponada (fosfatos 0,02M; NaCl 0,13M; pH 7,2). PBS-T: solução tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween-20). PBS-TL: solução tampão de incubação (PBS-T contendo 0,1% de leite Molico[®]). Solução cromógena: 1 mg de p-nitro-fenil-fosfato dissódico em 1 ml de solução tamponada de dietanolamina (dietanolamina 1 M; MgCl₂ 0,005M; pH 9,8).
- b) Execução do teste: a cada cavidade das placas de poliestireno, fundo U (Inlab, Brasil), foi adicionado 100 µl do antígeno diluído, conforme seu título, em PBS. Após incubação de uma hora à temperatura ambiente e 15 a 18 horas a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e utilizadas em seguida. Os soros foram diluídos em PBS-TL, na razão 2, a partir de 1:200, e 100 µl de cada diluição foi adicionado às cavidades da placa. Após uma hora de incubação a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas três vezes. Cem microlitros do conjugado, anti-IgM humano-fosfatase alcalina (Sigma, USA), na diluição adequada em PBS-TL foram adicionados aos orifícios da placa. Após novo ciclo de incubação e lavagens, 100 µl da solução cromógena foi adicionado, e a placa incubada a 37°C por 45 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µl de NaOH 2M, e a densidade óptica (DO) determi-

nada 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 "cut off" do teste foi determinado pela média aritmética das D.O. das amostras do grupo B, acrescida de três desvios padrões, na diluição 1:200.

3.2. Soroaglutinação microscópica (SAM), realizado de acordo com as normas preconizadas pela OMS³. Soros com títulos iguais ou maiores que 1:200 foram considerados positivos.

4. Análise estatística

O teste χ^2 de McNemar foi utilizado para a determinação dos níveis de significância⁸ e, estudados os índices de sensibilidade e especificidade.

RESULTADOS

A concentração proteica do antígeno obtida foi de 100 $\mu\text{g/ml}$.

A Figura 1 mostra a titulação em bloco do antígeno no teste ELISA-IgM, frente aos soros padrões positivo e negativo.

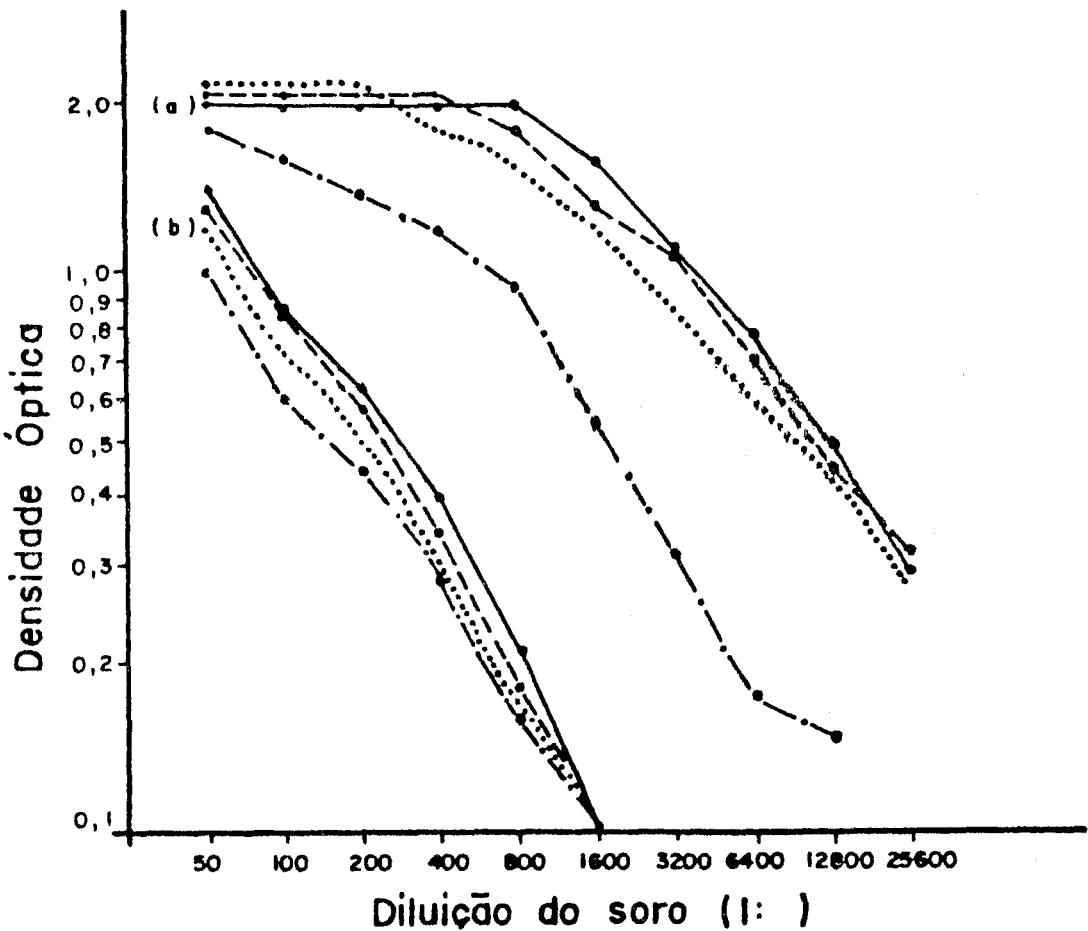


Fig. 1 — Densidades ópticas obtidas para as diluições dos soros padrões positivo (a) e negativo (b), no teste ELISA-IgM, empregando antígeno de leptospira cepa Patoc 1, nas concentrações de 10 $\mu\text{g/ml}$ (—); 5 $\mu\text{g/ml}$ (---); 3 $\mu\text{g/ml}$ (...) e 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (-.-).

A concentração de $3\mu\text{g/ml}$ ou $0,3\mu\text{g}$ por cavidade, foi escolhida para sensibilização das placas.

As curvas dose-resposta de cinco soros do grupo A_2 e 5 soros do grupo B são apresentados na figura 2.

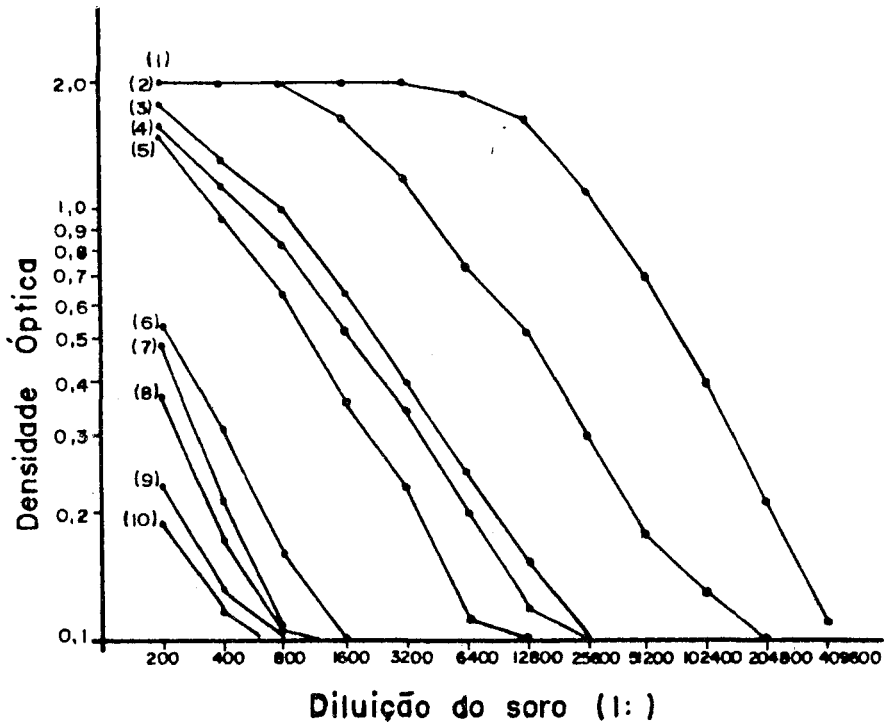


Fig. 2 — Curvas dose-resposta obtidas no teste ELISA-IgM para soros de pacientes com leptospirose (1, 2, 3, 4, 5) e de indivíduos normais (6, 7, 8, 9 e 10).

Os resultados comparativos dos testes ELISA-IgM e SAM, obtidos nos soros dos grupos: A, B e C são apresentados na tabela 1; a tabela 2 mostra as percentagens de falso negatividade e falso positividade.

TABELA 1

Resultados comparativos dos testes ELISA IgM e SAM quanto à reatividade dos soros dos grupos A, B e C.

Testes	ELISA-IgM Positivo		ELISA-IgM Negativo		Total
	SAM Positivo	SAM Negativo	SAM Positivo	SAM Negativo	
Grupos					
A_1	0	21	0	20	41
A_2	41	0	0	0	41
B	0	0	3	27	30
C	0	0	6	24	30

A - soros pareados (A_1 primeira e A_2 segunda amostra) de pacientes com suspeita clínica de leptospirose.

B - soros de adultos saudios.

C - soros de pacientes com outras patologias.

TABELA 2

Resultados falso negativo e falso positivo dos testes ELISA-IgM e SAM para os grupos de soros estudados.

Resultados	Testes	ELISA-IgM		SAM	
Falso Negativo	A_1	48,78%	*	100%	*
	A_2	0		0	
Falso Positivo	B	0	**	10%	**
	C	0	***	20%	***

teste estatístico aplicado X^2 de McNemar

* $P < 0,005$

** $0,010 < p < 0,025$

*** $p < 0,005$

A - soros pareados (A_1 primeira e A_2 segunda amostra) de pacientes com suspeita clínica de leptospirose.

B - soros de adultos saudios

C - soros de pacientes com outras patologias.

A sensibilidade e a especificidade obtidas para os testes de acordo com os grupos de soros estudados, são apresentados na tabela 3.

TABELA 3

Sensibilidade e especificidade segundo teste sorológico e grupo de soros

Índices	Testes	ELISA-IgM	SAM
	Sensibilidade	A ₁ A ₂	51,22% 100%
Especificidade	B C	100% 100%	90% 80%

A - soros pareados (A₁ primeira e A₂ segunda amostra) de pacientes com suspeita clínica de leptospirose.

B - soros de adultos saudáveis

C - soros de pacientes com outras patologias.

DISCUSSÃO

Foi padronizado e avaliado o teste ELISA-IgM para o diagnóstico sorológico da leptospirose humana, na tentativa de se obter um teste mais sensível que a SAM³.

O teste SAM preconizado pela OMS apresenta algumas desvantagens: 1 — A utilização de leptospirosas vivas com riscos de infecção acidental do pessoal de laboratório, e perdas das culturas por contaminação⁵. 2 — É um teste de leitura visual microscópica, sujeito a maior margem de erro. A leitura espectrofotométrica dos testes imunoenzimáticos diminui em muito tal tipo de erro.

O preparo do antígeno utilizado no teste ELISA-IgM, cepa Patoc 1, leptospira não patogênica, é de fácil execução e de bom rendimento: um ml do antígeno permite realizar cerca de 300 testes (figura 1).

As curvas dose-resposta obtidas no teste ELISA-IgM (figura 2) para os soros de pacientes com leptospirose, e de indivíduos normais mostram que o teste foi discriminante e que há proporcionalidade entre concentração de anticorpos e D.O. obtida.

O "cut off", determinado através da média aritmética das 30 amostras de soros de indivíduos saudáveis (grupo B) acrescida de três desvios padrões, na diluição 1:200, resultou em 0,589. A mesma determinação aplicada ao grupo de soros de pacientes portadores de outras patologias (grupo C), resultou em 0,502 valor abaixo do "cut off".

Na avaliação comparativa, o teste ELISA-IgM mostrou-se mais sensível e específico do que a SAM (tabelas 1, 2, 3), resultados estes concordes com os da literatura^{6, 7, 9}.

Embora a positividade do teste ELISA-IgM tenha sido superior ao da SAM ($P < 0,005$), a baixa positividade (51,22%) encontrada nas primeiras amostras (A₁), poderia ser explicada pelo emprego do antígeno cepa Patoc 1, leptospira não patogênica.

Os resultados do teste ELISA-IgM sugerem futuras investigações, entre elas, a utilização de bateria antigênica de diferentes sorotipos de leptospirosas do grupo *Icterohaemorrhagiae*, para melhor avaliação do imunodiagnóstico da leptospirose.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo H. Yasuda pela orientação e pelo auxílio no preparo do manuscrito, e à Dra. Marina Ortolan pela manutenção e fornecimento da cepa de leptospira.

SUMMARY

Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgM antibodies in human leptospirosis

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of immunoglobulin M (IgM) antibodies in human leptospirosis was evaluated. From the results obtained in this study, it may be concluded that the IgM-ELISA is a suitable technique not only for the detection of low levels of antibody, but also for measurement of non-agglutinating antibodies undetectable by means of microscopic agglutination test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BRADFORD, M. M. — A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.

3. FAINE, S., ed. — Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva, World Health Organization, 1982. (WHO offset publication n° 67).
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. PAPPAS, M. G.; BALLOU, W. R.; GRAY, M. R.; TAKAFUJI, E. T.; MILLER, R. N. & HOCKMEYER, W. T. — Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM — specific dot-Elisa: comparison with the microscopic agglutination test. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 346-354, 1985.
8. SIEGEL, S. — *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1975. 350 p.
9. TERPSTRA, W. J.; LIGTHART, G. S. & SCHOONE, G. J. — ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J. gen. Microbiol.*, 131: 377-385, 1985.

Recebido para publicação em 18/11/1987.