

Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad

Norma B. Vanasco,¹ Javier Lottersberger,² María F. Schmeling,¹ Ian A. Gardner³ y Héctor D. Tarabla⁴

Forma de citar

Vanasco NB, Lottersberger J, Schmeling MF, Gardner IA, Tarabla HD. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. Rev Panam Salud Publica. 2007;21(6):388-95.

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar un enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA) para la determinación de inmunoglobulinas G (IgG) (específico de género) y evaluarlo en diferentes etapas de la enfermedad.

Métodos. Se analizaron 1 077 muestras séricas de 812 pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la ciudad de Santa Fe, Argentina, entre 1999 y 2005. A partir de un criterio de definición de casos basado en los resultados de la microaglutinación (MAT) y del recuento de leucocitos, y de los valores de neutrofilia, se incluyeron en el estudio 182 casos confirmados (267 muestras), 167 casos negativos (293 muestras) y 40 casos probables (60 muestras). Cada muestra se clasificó según el tiempo de evolución de la enfermedad en tres etapas: primera (< 10 días), segunda (10-25 días) y tercera (> 25 días). En el ELISA, se utilizó como antígeno un extracto de una mezcla de las serovariedades Pyrogenes y Tarassovi cultivadas en medio líquido, tratado con ultrasonidos e inmovilizado por adsorción en placas de poliestireno. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. El valor de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA se determinaron utilizando como patrón la definición de casos. Para determinar el valor de corte óptimo se calculó el área bajo la curva de eficacia diagnóstica (curva ROC).

Resultados. La sensibilidad de la prueba evaluada aumentó considerablemente en la segunda etapa (93,2%), con respecto a la primera (68,1%), y descendió en la tercera (78,8%). La especificidad aumentó gradualmente desde el 96,3% en la primera etapa hasta el 100% en la tercera.

Conclusiones. Los resultados obtenidos indican que esta prueba de ELISA puede ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis en todas las etapas y, en particular, para adelantar el diagnóstico de la enfermedad aguda.

Palabras clave

Diagnóstico, leptospirosis, ELISA, Argentina.

¹ Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Dr. Emilio Coni. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán. Toda la correspondencia debe dirigirse a: Norma B. Vanasco. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Dr. E. Coni. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán. Blas Parera 8260. Santa Fe (3000), Argentina. Tel./

fax: +54-342-4892830; correo electrónico: jlotters@fbc.unl.edu.ar

² Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Pcia. de Santa Fe, Argentina.

³ Department of Medicine and Epidemiology, University of California Davis, USA.

⁴ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.), Rafaela, Pcia. de Santa Fe, Argentina.

La leptospirosis es una zoonosis emergente o reemergente de distribución mundial causada por espiroquetas del género *Leptospira* (1-3). Su ocurrencia se ve favorecida por las condiciones ambientales en regiones de clima tropical o subtropical, donde

las temperaturas elevadas y los altos índices pluviométricos de determinados períodos del año facilitan la aparición de brotes epidémicos de carácter estacional (2, 4–6).

Esta enfermedad es frecuentemente subdiagnosticada debido a que los síntomas clínicos son inespecíficos y, por lo tanto, las pruebas de laboratorio son esenciales para la confirmar los casos. La técnica de confirmación serológica de referencia internacional es la microaglutinación (MAT). Esta prueba es compleja y de difícil realización, y generalmente no permite la detección precoz de los casos (1, 2). Para evitar las complicaciones y las formas más graves de la enfermedad es imprescindible realizar un diagnóstico temprano y comenzar inmediatamente un tratamiento eficaz (7).

Según los estudios más recientes, existen dos tipos de anticuerpos específicos contra las leptospiras: unos dirigidos contra antígenos específicos de género comunes a todas las leptospiras (variedades patógenas y no patógenas) y otros contra antígenos específicos de serovariedad y serogrupo (3). Los anticuerpos específicos de género (anticuerpos coaglutinantes o de reactividad cruzada) son los primeros en aparecer (3, 8), por lo que su presencia puede ser considerada como un indicador de fase aguda de la infección (8, 9). Tras el período inicial, estos anticuerpos desaparecen gradualmente a medida que la respuesta inmunitaria madura. Los anticuerpos específicos de género sólo permanecen detectables durante unas semanas o unos meses, mientras que los anticuerpos específicos de serovariedad y serogrupo pueden determinarse por MAT durante años (3). Esto indica que un resultado positivo en la MAT puede ser de escasa utilidad para diferenciar una infección presente de una infección pasada (10–12).

En la Argentina, el cribado diagnóstico se realiza por un método de macroaglutinación con un reactivo "artesanal" específico de género producido en pocos laboratorios de referencia, el antígeno termorresistente (TR) (1, 13, 14). Este método, aunque es rápido y sencillo, tiene numerosos inconvenien-

tes: la producción del reactivo es de difícil estandarización, tanto entre laboratorios como dentro de un mismo laboratorio, y su interpretación es subjetiva, lo que dificulta la obtención de resultados comparables entre distintos laboratorios. Además, hay estudios que describen la obtención de falsos negativos y falsos positivos con este antígeno (2, 15, 16).

La detección de inmunoglobulinas M (IgM) por enzimoimmunoensayo (ELISA) ha sido ampliamente usada para el diagnóstico de leptospirosis y es más sensible que la MAT (1, 17, 18). Actualmente existen varios métodos comerciales que detectan tanto IgM como IgG (12, 19–22), pero ninguno de ellos está fácilmente disponible en países en desarrollo, como la Argentina. De allí que para poder contar con algún método diagnóstico alternativo se hace necesario el desarrollo y la producción nacionales.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ELISA de determinación de IgG (específico de género) y evaluarlo en diferentes etapas de la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suero

Se analizaron muestras de suero de pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas para diagnóstico al laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Santa Fe (Argentina), desde enero de 1999 hasta diciembre de 2005. Sólo se incluyeron en el estudio las muestras provenientes de pacientes que reunieron los requisitos necesarios para ser clasificados según el criterio de definición de casos. Los sueros se conservaron a -70°C hasta la realización de las pruebas.

Microaglutinación con antígenos vivos (MAT)

Todos los sueros se analizaron por MAT, usando como antígeno una bacteria de 13 serovariedades pertenecientes a 12 serogrupos (1). Los anti-

genos empleados corresponden a los siguientes serogrupos (cepas de referencia entre paréntesis): Castellonis (Castellón 3), Canicola (Hound Utrecht IV), Grippotyphosa (Moskva V), Icterohaemorrhagiae (M20), Hebdomadis (Hebdomadis), Pomona (Pomona), Pyrogenes (Salinem), Tarassovi (Perepelicin), Sejroe (Wolffi 3705), Sejroe (Hardjoprajtino), Australis (Ballico), Autumnalis (Akiyami A) y Bataviae (Swart). Las muestras se consideraron positivas a partir de la dilución 1:50, según las recomendaciones de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD) (23).

Definición de casos de leptospirosis

Se utilizó un criterio de definición de casos que incluyó los resultados de la MAT, —prueba serológica de referencia internacional—, los antecedentes de laboratorio clínico general, los síntomas clínicos y los datos epidemiológicos. Se consideraron "casos confirmados" los pacientes con antecedentes clínicos y epidemiológicos indicativos de leptospirosis, en los que se demostró a) seroconversión en la MAT (aumento del título de por lo menos cuatro veces para una serovariedad) en dos o más muestras con al menos una semana de intervalo o b) una única muestra positiva para más de una serovariedad (coaglutinación), una de las cuales, por lo menos, con un título mayor o igual a 1/200 en la MAT. En ambos casos, estos resultados debían acompañarse de neutrofilia mayor de 70% y un número de leucocitos mayor de $8\,000/\text{mm}^3$. Se consideraron "casos negativos" los pacientes asintomáticos o sintomáticos con resultado negativo en la MAT en una única muestra de la segunda o la tercera etapa de evolución, o en dos muestras de distintas etapas, con neutrofilia menor o igual a 70% y un número de leucocitos menor o igual a $8\,000/\text{mm}^3$. En este estudio no se incluyó el cultivo en el criterio de definición de casos debido a que fue muy difícil obtener muestras adecuadas y a que, lamentablemente, el tiempo transcurrido desde la obtención de las

muestras en los laboratorios locales hasta su llegada al laboratorio de referencia del INER fue demasiado largo como para permitir la viabilidad de las leptospiras. Se definieron como "casos probables" aquellos pacientes con antecedentes clínicos y epidemiológicos indicativos de leptospirosis y resultado positivo en la MAT, con título menor de 1/200 en la primera o la segunda muestra, o con al menos neutrofilia mayor de 70% y un número de leucocitos mayor de 8 000/mm³.

Población estudiada

A partir de las 1 077 muestras aisladas o pareadas analizadas en el laboratorio del INER durante el período de estudio, correspondientes a 812 pacientes, se identificaron, aplicando la definición de casos mencionada, 182 casos confirmados (267 muestras: 116 de la primera etapa, 118 de la segunda y 33 de la tercera), 167 casos negativos (293 muestras: 108 de la primera etapa, 143 de la segunda y 42 de la tercera) y 40 casos probables (60 muestras (25 de la primera etapa, 26 de la segunda y 9 de la tercera etapa). Para evaluar si la población de casos era sesgada o no, se incluyeron en el análisis de los datos los 40 casos probables dentro de los casos confirmados.

Para cada paciente, se completó una planilla clínico-epidemiológica con los datos personales, la fecha de inicio de los síntomas, la fecha de toma de muestras, los síntomas clínicos, los datos generales de laboratorio clínico y los datos epidemiológicos en el momento de la derivación de la muestra. De las diferencias entre la fecha de la toma de muestra y la fecha de inicio de los síntomas se obtuvieron los tiempos de evolución de la enfermedad relacionados con cada muestra; a partir de estos datos, las muestras se agruparon según tres etapas: primera (menos de 10 días de evolución), segunda (de 10 a 25 días de evolución) y tercera (más de 25 días de evolución). Se calcularon la media, la mediana, la desviación estándar y los intervalos de confianza de 95% (IC95%) de la duración del período de evolución.

La edad de los pacientes incluidos en el estudio estuvo comprendida entre 1 y 76 años, con una media de 30 años y una mediana de 28 años (68 pacientes sin información). El 77,4% de los pacientes (301) era de sexo masculino y 22,6% (88), de sexo femenino. Los datos clínicos en el momento de la derivación de la primera muestra fueron: fiebre en 261 pacientes (67,1%, 74 sin información), ictericia en 125 pacientes (32,1%, 79 sin información), cefalea en 233 pacientes (59,9%, 84 sin información), enrojecimiento ocular bilateral en 142 pacientes (36,5%, 91 sin información), dolores musculares en 212 pacientes (54,5%, 81 sin información), síndrome respiratorio en 96 pacientes (24,7%, 96 sin información), síndrome hepático en 115 pacientes (29,6%, 117 sin información), síndrome renal en 89 pacientes (22,9%, 117 sin información), síndrome meníngeo en 34 pacientes (8,7%, 102 sin información), síndrome hemorrágico en 38 pacientes (9,8%, 126 sin información). Estos pacientes residían en 12 provincias de Argentina: 88,1% en Santa Fe (32,4%), Entre Ríos (29,6%) y Misiones (26,1%), y 11,9% restante en Jujuy, Buenos Aires, Corrientes, Formosa, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro y Salta.

ELISA indirecto

Se utilizó como antígeno un extracto de una mezcla de las serovariedades Pyrogenes y Tarassovi, obtenido de un cultivo en medio líquido de Ellinghausen, McCullough, Johnson, Harris (EMJH) de entre 7 y 14 días de desarrollo (17). Previamente, se habían evaluado extractos provenientes de todas las serovariedades de leptospiras utilizadas en la MAT y se había observado buena reactividad en cada uno de ellos; se seleccionaron las serovariedades Pyrogenes y Tarassovi por mostrar la mayor capacidad para distinguir entre sueros provenientes de casos negativos y de casos confirmados, y la menor reactividad de los sueros de casos negativos. El cultivo se centrifugó 20 minutos a 10 000 g, se lavó con solución salina tamponada

con fosfato (PBS) de pH 7,2 y se trató con ultrasonidos dos veces, durante dos minutos cada vez. Se determinó la cantidad de proteínas del extracto crudo antigénico por el método del Biuret (Proti-2, Wiener Lab., Argentina). Se determinaron las variables adecuadas para la inmovilización del antígeno en la fase sólida: estabilización y conservación de las superficies de inmunocaptura preparadas (24). Se determinaron asimismo las condiciones para el ensayo: tipo y concentración de muestras, tipos de conjugados y condiciones de cada una de las etapas del ensayo (25, 26). El antígeno se inmovilizó por adsorción en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar, EE. UU., referencia: 2592), en una solución reguladora de carbonato y bicarbonato de sodio 0,1M de pH 9,6. Se incubaron 100 µl por pocillo de la disolución (concentración de proteínas totales: 10 µg/ml) durante toda la noche, a 4 °C. Tras la incubación, las placas se lavaron dos veces con solución de lavado (PBS con polisorbato 20 a 0,05%, pH 7,2) y dos veces con agua destilada. Luego, se secaron y se conservaron selladas en bolsas plásticas con desecadores, a 4 °C, hasta su utilización. Las muestras se diluyeron según un factor de 1:200 en una solución proteica (PBS con caseína a 1%, Sigma, EE. UU.) y se incubaron por duplicado alícuotas de 100 µl de cada dilución durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la incubación, las placas se lavaron seis veces con solución de lavado. El anticuerpo monoclonal (anticuerpo de cabra anti-IgG humanas, específico del fragmento Fc, conjugado con peroxidasa; Chemicon International [EE. UU.], referencia: AP113P) se diluyó según un factor de 1:40.000 con la solución proteica y luego, se incubaron 50 µl de dilución en todos los pocillos, durante 30 minutos a 37 °C. Tras la incubación se repitió el paso de lavado. El revelado se realizó por incubación con 100 µl de una solución comercial de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) lista para usar (Zymed, EE. UU.) durante 15 minutos, a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 100 µl de solución de ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia a 450 y 630 nm se midió en

un lector de placas (MRX II, Dynatech, EE. UU.) (24). En cada placa se procesaron por triplicado una mezcla de sueros de pacientes clasificados como casos negativos (control negativo) y una mezcla de sueros de pacientes clasificados como casos confirmados (control positivo). Las muestras se procesaron por duplicado y se obtuvo la densidad óptica media (DOM) de cada una de ellas. Los resultados se expresaron como densidad óptica corregida (DOC), la cual se obtuvo, para cada muestra, dividiendo la densidad óptica media correspondiente por la densidad óptica media del control negativo. Las muestras se consideraron positivas cuando su densidad óptica corregida resultó mayor que el valor de corte.

Diseño del estudio y análisis estadísticos

Para asegurar la validez externa del estudio se tomó una muestra representativa de la población de referencia y se calculó el número mínimo de casos confirmados y de casos negativos que hay que incluir en el estudio según la fórmula para estimar el intervalo de confianza de una proporción. El número obtenido para una sensibilidad y una especificidad estimada de 90%, un error absoluto de 5% y un nivel de confianza de 95% fue de 138, utilizando el programa EpiInfo 6.04 (27). Para asegurar la validez interna del estudio se siguieron protocolos estándar, siempre en el mismo laboratorio y en las mismas condiciones, y se confiaron las determinaciones a un único analista. El diseño del estudio fue de tipo observacional transversal. Las muestras se analizaron a doble ciego, para controlar el sesgo de revisión, y por duplicado, para controlar el error aleatorio. Se minimizó el sesgo de verificación aplicando la determinación por ELISA y la confirmación por MAT a las muestras de todos los pacientes incluidos en el estudio, en forma independiente de los resultados obtenidos en cada una de estas pruebas. La inestabilidad cuantitativa se estimó mediante los intervalos de confianza de 95%.

CUADRO 1. Sensibilidad, especificidad y valor de corte del inmunoensayo de fase sólida (ELISA) para el diagnóstico de la leptospirosis en las tres etapas de la enfermedad, Argentina, 1999–2005

Etapa	N.º de muestras de casos confirmados	N.º de muestras de casos negativos	Valor de corte (DOC) ^a	Sensibilidad (%) (IC95%) ^b	Especificidad (%) (IC95%) ^b	Área bajo la curva ROC ^c (IC95%) ^b
1	116	108	> 2,28	68,1 (58,8 – 76,4)	96,3 (90,8 – 99,0)	0,851 (0,797 – 0,895)
2	118	143	> 2,44	93,2 (96,1 – 99,9)	99,3 (96,1 – 99,9)	0,978 (0,952 – 0,992)
3	33	42	> 2,29	78,8 (61,1 – 91,0)	100 (100,0 – 100,0)	0,947 (0,8700,985)

^a DOC: densidad óptica corregida = densidad óptica media de las muestras / densidad óptica media del control negativo.

^b IC95%: intervalo de confianza de 95%.

^c Curva ROC: curva de eficacia diagnóstica.

El valor de corte, la sensibilidad y la especificidad del ensayo se calcularon para cada una de las tres etapas de la enfermedad definidas anteriormente, utilizando las definiciones de caso confirmado y caso negativos como patrón. Para determinar el valor de corte óptimo se calculó el área bajo la curva de eficacia diagnóstica (curva ROC, del inglés *Receiver Operating Characteristics*), utilizando el programa Medcalc[®] (28–30).

RESULTADOS

La sensibilidad calculada aumentó considerablemente en la segunda etapa, con respecto a la primera, y descendió nuevamente en la tercera. La especificidad resultó elevada en todas las etapas (desde 96,3% hasta 100%) y aumentó gradualmente desde la primera hasta la tercera (cuadro 1).

Los valores estimados de sensibilidad y especificidad del ELISA luego de incluir los casos probables dentro de los casos confirmados fueron muy similares a los obtenidos considerando sólo los casos confirmados. En la primera etapa, la sensibilidad fue de 68,8% (IC95%: 60,5 – 76,3%) y la especificidad, de 96,3% (IC95%: 90,8 – 99,0%); en la segunda, la sensibilidad fue de 86,8% (IC95%: 80,2 – 91,9%) y la especificidad, de 99,3% (IC95%CI, 96,2 – 99,9%), y en la tercera, la sensibilidad fue de 73,8% (IC95%: 58,0 – 86,1%) y la especificidad, de 100% (IC95%: 100 – 100%).

En relación con la duración de la evolución de la enfermedad en los pacientes incluidos en el estudio, en la primera etapa, el valor mínimo fue de 0 días, con una media de (5,6 ± 2,4) días (IC95%: 5,3 – 5,9) y una mediana de 6,0 días (IC95%: 5,3–6,0); en la segunda etapa, la duración media fue de (15,3 ± 4,4) días (IC95%: 14,8 – 15,9) y la mediana, de 14,0 días (95%CI, 14,0 a 15,0), y en la tercera etapa, la duración máxima de la evolución fue de 494 días, con una media de (72,6 ± 72,4) días (IC95%: 56,3 – 88,9) y una mediana de 37,0 días (95%CI: 33,3 – 47,3). En las figuras 1, 2 y 3 se presentan los diagramas de puntos de las muestras con resultados positivos y negativos en el ELISA según el criterio de definición de casos en la primera, segunda y tercera etapa, respectivamente.

Dentro de la población estudiada se encontraron 16 casos de otras enfermedades que requieren un diagnóstico diferencial de leptospirosis: infección por hantavirus ($n = 5$), hepatitis A ($n = 5$), dengue ($n = 3$), sepsis por *Staphylococcus* spp ($n = 2$), sepsis por *Enterobacter* spp ($n = 1$) y malaria ($n = 1$). Las 16 muestras analizadas fueron negativas en el ELISA.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de leptospirosis es muy complejo; los métodos tradicionales incluyen el cultivo en medios con polisorbato y la detección de anticuerpos por MAT. Ambos procedi-

FIGURA 1. Diagrama de puntos de los resultados del inmunoensayo de fase sólida (ELISA) para el diagnóstico de la leptospirosis según el criterio de definición de casos, en la primera etapa de la enfermedad, Argentina, 1999–2005

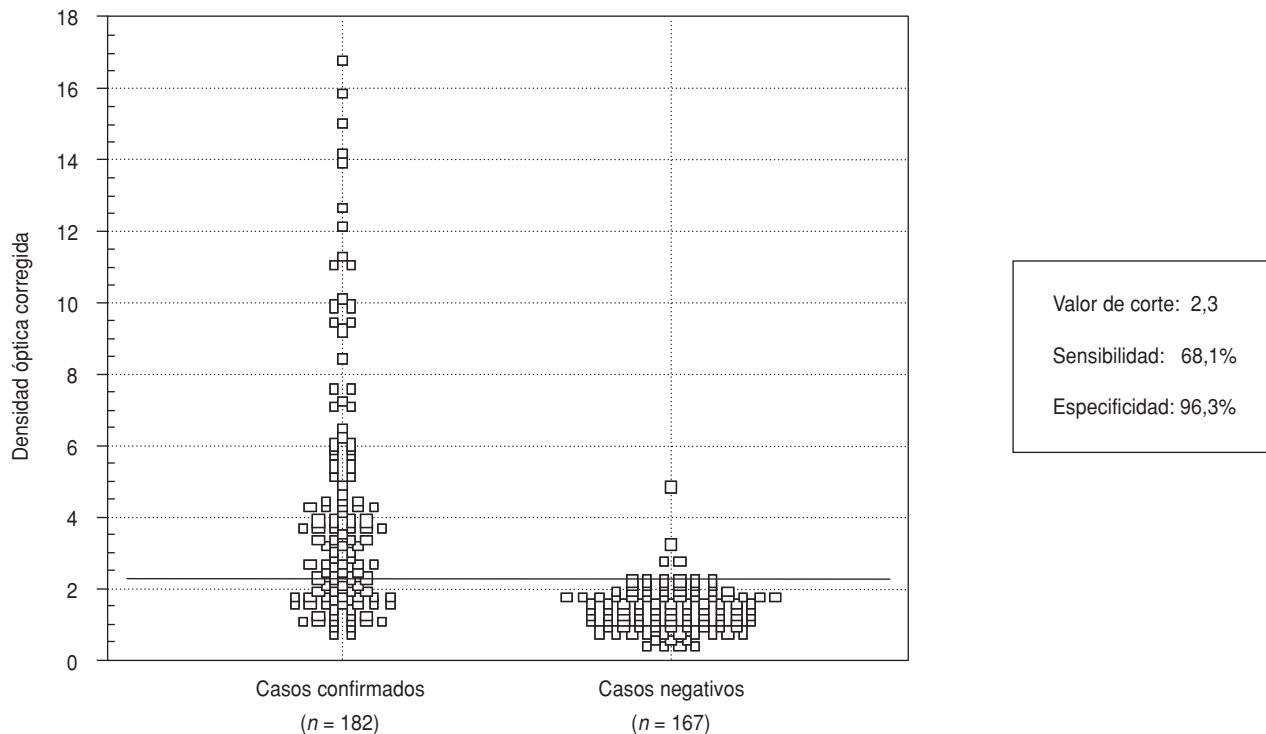


FIGURA 2. Diagrama de puntos de los resultados del inmunoensayo de fase sólida (ELISA) para el diagnóstico de la leptospirosis según el criterio de definición de casos, en la segunda etapa de la enfermedad, Argentina, 1999–2005

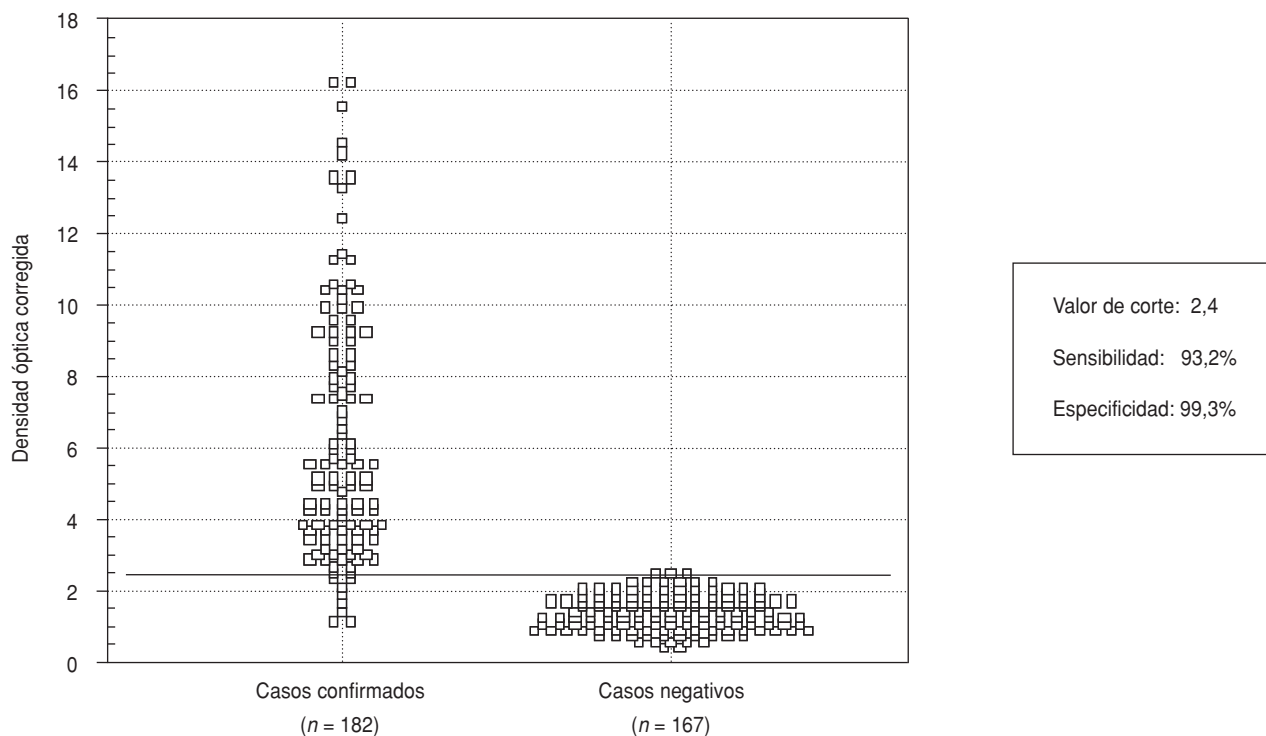
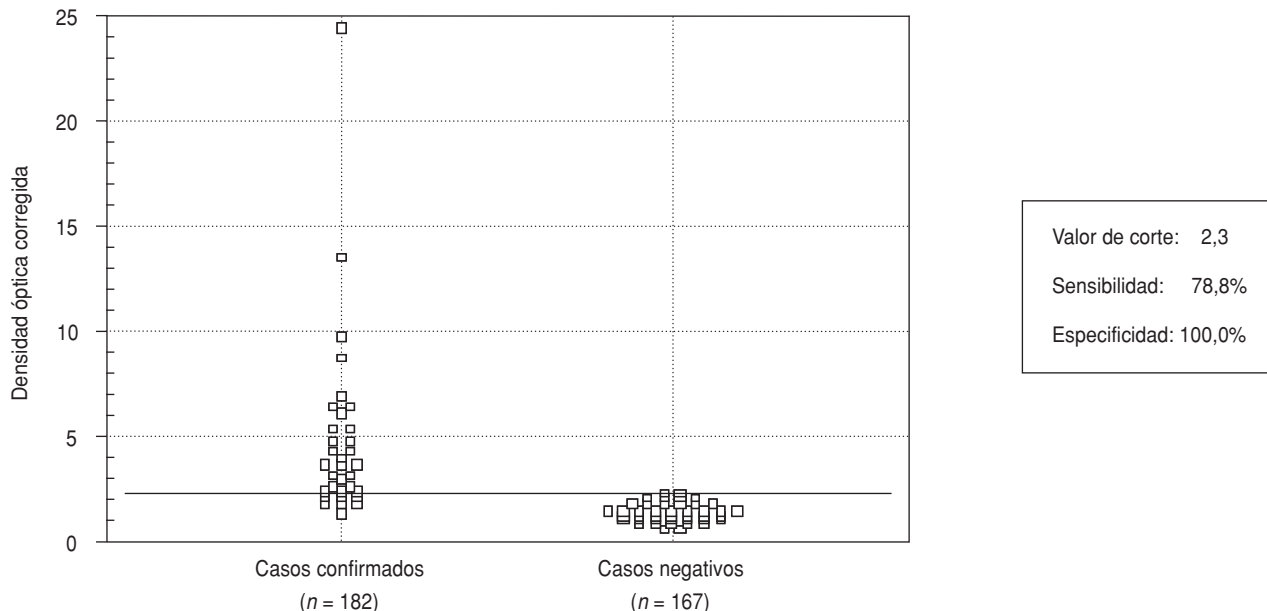


FIGURA 3. Diagrama de puntos de los resultados del inmunoensayo de fase sólida (ELISA) para el diagnóstico de la leptospirosis según el criterio de definición de casos, en la tercera etapa de la enfermedad, Argentina, 1999–2005



mientos tienen limitaciones. El cultivo es lento, produce resultados retrospectivos y tiene baja sensibilidad, puesto que se logran aislamientos en menos de 50% de los casos (11,12); si las muestras para cultivo no se obtienen en el momento apropiado de la enfermedad, su sensibilidad es menor aún. La MAT requiere gran experiencia para su realización e interpretación (1), y es de poca utilidad para guiar el manejo clínico temprano de la enfermedad, puesto que los títulos de anticuerpos detectados por esta técnica aumentan más tarde que los determinados por otros métodos (18, 31) y, además, debe transcurrir mucho tiempo antes de poder detectar la seroconversión entre muestras de fase aguda y de convalecencia (21). Se ha demostrado que el método de ELISA es más sensible para detectar anticuerpos no aglutinantes que anticuerpos aglutinantes (12, 17, 18). Los títulos de anticuerpos dirigidos contra las leptospiras comienzan a ser detectables en sangre entre 5 y 10 días luego de la aparición de los síntomas de la enfermedad; los anticuerpos de tipo IgM generalmente aparecen antes que los de tipo IgG (3). Debido a ello, se podía

esperar que en la primera etapa, la sensibilidad del método de ELISA evaluado en este estudio fuera baja. Sin embargo, a pesar de que algunas de las muestras de la primera etapa correspondían a una evolución de la enfermedad de cero días (media = 5,6 días, mediana = 6 días), la sensibilidad observada del ELISA (68,1%) fue considerablemente elevada, lo cual coincide con resultados obtenidos en la evaluación de otras pruebas de ELISA por otros autores (11, 31). No obstante, dado que la duración de la evolución se estimó a partir de datos proporcionados por los pacientes, no puede descartarse la presencia del sesgo de memoria, y que la duración de este período haya sido en realidad mayor que la estimada. Sin embargo, se debe seguir trabajando para obtener pruebas de mayor sensibilidad en etapas iniciales, mediante la detección de anticuerpos o de antígenos de leptospiras que permitan un diagnóstico de la enfermedad en las etapas iniciales, donde el tratamiento es más eficaz, para mejorar así las posibilidades de curación del paciente.

La especificidad del ELISA (96,3%) durante la primera etapa de la enfer-

medad fue muy elevada, lo cual sugiere que un resultado positivo en esta prueba, incluso si la MAT es aún negativa, puede ser de gran utilidad diagnóstica, a la espera de confirmación por esta última prueba en etapas posteriores de la enfermedad. Esto, sumado a la alta especificidad del ensayo frente a muestras de pacientes con otras enfermedades de síntomas similares, respaldan su utilidad en las etapas iniciales de la leptospirosis.

Durante la segunda etapa de la enfermedad se observó la mayor sensibilidad (93,2%) y una muy buena especificidad (99,3%) del ELISA, mientras que las áreas bajo la curva de eficacia diagnóstica indicaron que los casos confirmados tenían mayor probabilidad de obtener un valor alto en este ensayo que los casos negativos. Todo esto sugiere que durante esta etapa, el ELISA puede ser muy útil como complemento de la MAT. Más aún, en laboratorios donde no se dispone de los equipos y de la destreza necesarios para la realización de la MAT, el resultado del ELISA puede adelantar el diagnóstico presuntivo hasta tanto se pueda derivar la muestra a un laboratorio de referencia para confirmación por MAT. Esto

constituye una gran ventaja de este ELISA respecto a la otra prueba de cribado (específica de género) que se emplea en Argentina, la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, que proporciona falsos resultados negativos (2, 15, 16).

En este estudio, las muestras de la tercera etapa correspondieron a evoluciones de la enfermedad de entre 25 y 494 días (media = 72,6 días, mediana = 37,0 días). La sensibilidad hallada en la tercera etapa (78,5%) disminuyó con respecto a la segunda etapa. Este hecho podría deberse a una disminución de la concentración de los anticuerpos específicos de género determinados en el ELISA, que ya pueden haber comenzado a descender a partir de 25 días de evolución. La persistencia, incluso por muchos años, de anticuerpos aglutinantes valorables por MAT determina que en zonas de elevada endemicidad una alta proporción de la población puede

presentar anticuerpos debidos a infecciones pasadas (10–12). De allí que el diagnóstico presuntivo basado en una única muestra con títulos inicialmente elevados en la MAT es posible, pero el valor umbral (o sensibilidad diagnóstica) dependerá de la prevalencia de leptospirosis en la población. El descenso de la sensibilidad de este ELISA en muestras tomadas a partir de 25 días de evolución sugiere que, a diferencia de la MAT, esta prueba puede ser de gran utilidad para diferenciar las infecciones agudas de las infecciones pasadas, sobre todo si se considera que la especificidad del ELISA fue máxima (100%) en la tercera etapa de la enfermedad.

Aunque el número de pacientes definidos como casos probables no fue muy elevado, los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en todas las etapas no variaron mayormente al incluir los casos probables dentro de los casos confirmados, lo

que sugiere que estos últimos constituían una muestra no sesgada de la población de referencia.

En este estudio se evaluó el desempeño de un ELISA de determinación de IgG (específico de género) en diferentes etapas de la enfermedad. La sensibilidad y la especificidad medias estimadas en todas las etapas fueron elevadas, lo cual indica que este ensayo puede ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis en todas las etapas y, en particular, para adelantar el diagnóstico de la enfermedad aguda. Esta prueba constituye un nuevo medio diagnóstico en la Argentina que, conforme a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (32), puede contribuir a un registro más confiable del número de casos de leptospirosis y a una medida más real del impacto de esta enfermedad en la salud pública.

REFERENCIAS

- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 1982. (WHO offset publication 67).
- Levett, PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296–326.
- World Health Organization, International Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: WHO, ILS; 2003.
- Vanasco, N.B, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD, Enría D. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. *Rev Panam Salud Pública.* 2000;7(1):35–40.
- Vanasco NB, Fusco S, Zanuttini JC, Dalla Fontana L, Manattini S, Prez, et al. Brote de leptospirosis humana luego de una inundación. Reconquista (Santa Fe), 1998. *Rev Arg Microbiol.* 2002;34(3):124–31.
- Vanasco NB, Kemerer R, Oliva ME. Brote de leptospirosis rural en un tambo de la provincia de Entre Ríos, Argentina, febrero-marzo 2003. *Salud (i) Ciencia.* 2004;12(4):26–31.
- Perani V, Farina C, Maggi L, Michetti G, Moiola FP, Pizzocaro, Pugliese C. Pneumonia due to *Leptospira* spp.: results of an epidemiological and clinical study. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:766–70.
- Cacciapuoti B. Co-antibodies in Human Leptospirosis. *Boll Ist Sieroter Milanese.* 1976;55(6):495–509.
- Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001;69:4958–68.
- Lupidi R, Cinco M, Balanzin D, Delprete E, Verardo P. Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:805–9.
- Cumberland PC, Everard COR, Wheeler JG, Levett PN. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989. *Eur J Epidemiol.* 2001;17(7):601–8.
- Levett PN, Branch SL. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):745–8.
- Mazzonelli J, Mazzonelli GD, Mailloux M. Antigene thermoresistant chez les leptospires. *Ann Microbiol (Paris).* 1974 Jan;125 A (1):125–6.
- Mailloux M, Mazzonelli J, Mazzonelli GD. Thermoresistant antigen in leptospires. possibility of a macroscopic diagnosis of leptospirosis with a single antigen. *Zentralbl Bakteriol (Orig A).* 1974;229(2):238–41.
- Sulzer CR, Glosser JW, Jones WL, Frix M. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1975;2 (3):218–21.
- Wanyangu SW, Palmer MF, Zochowski WJ, Waitkins SA. Comparison of the Difco and *Patoc 1* slide antigen in the screening of leptospirosis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 1987;10(2):155–61.
- Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1980;11(5):452–7.
- Cumberland PC, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis (MAT). *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(5):731–4.
- Smits HL, Ananyina YV, Chereshtsky A, Dancel L, Lai-A-Fat RF, Chee HD, et al. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M anti-

- bodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2904–9.
20. Zochowski WJ, Palmer MF, Coleman TJ. An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK. *J Clin Pathol.* 2001; 54(1):25–30.
 21. Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, Sasaki DM. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1464–9.
 22. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):803–9.
 23. Argentina, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD), Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis, Manual de Leptospirosis. Buenos Aires: AAVLD; 1994.
 24. Tijssen, P. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, practice and theory of enzyme immunoassays Vol 15. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1987.
 25. Vanasco NB, Lottersberger J, Sequeira MD, Tarabla H. Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. *Vet Microbiol.* 2001;82: 321–30.
 26. Lottersberger J, Pauli R, Vanasco NB. Development and validation of an ELISA for diagnosis of bovine leptospirosis. *Arch Med Vet.* 2002;34(1):89–95.
 27. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. Epi Info version 6. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention; 1994.
 28. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978; 8:283–298.
 29. Zweig MH, G. Campbell. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.* 1993;39:561–77.
 30. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH. Med-Calc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Programs Biomed.* 1995; 48:257–62.
 31. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3303–10.
 32. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record. 2000;27(75):217–24.

Manuscrito recibido el 10 de agosto de 2006. Aceptado para publicación, tras revisión, el 1 de marzo de 2007.

ABSTRACT

Diagnosis of leptospirosis: evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay in different stages of the disease

Objective. To develop a solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) for genus-specific immunoglobulin G (IgG) determination with leptospirosis and to evaluate the ELISA in different stages of the disease.

Methods. A total of 1 077 serum samples from 812 patients with suspected leptospirosis were analyzed. The samples had come from diagnoses done in the laboratory of the National Institute of Respiratory Diseases (*Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*), in the city of Santa Fe, Argentina, between 1999 and 2005. Included in the study were 182 confirmed cases (267 samples), 167 negative cases (293 samples), and 40 probable cases (60 samples) (based on case definitions based on the results from the microscopic agglutination test (MAT), leukocyte counts, and neutrophilia values). Each sample was classified, according to the days of the natural history of disease, into one of three stages: first (< 10 days), second (10–25 days), or third (> 25 days). The antigen used in the ELISA was an extract of a mixture of pyrogenes and tarassovi serovars cultivated in a liquid medium, treated with ultrasound, and immobilized by adsorption on polystyrene plates. As a secondary antibody, a peroxidase-conjugated goat anti-human IgG monoclonal antibody was used. The cutoff value, sensitivity, and specificity of the ELISA were determined using the definitions of confirmed cases and of negatives cases as the standard. In order to determine the optimal cutoff value, the area under the receiver operating characteristic curve was calculated.

Results. The sensitivity of the evaluated test was much higher in the second stage (93.2%) than in either the first stage (68.1%) or the third stage (78.8%). The specificity increased gradually from 96.3% in the first stage to 100% in the third stage.

Conclusions. Our results indicate that this ELISA test can be a very useful complement to the MAT for the diagnosis of leptospirosis in all the stages and, in particular, in order to diagnose acute disease sooner.

Key words

Leptospirosis, diagnosis, enzyme-linked immunosorbent assay, Argentina.