

Diagnóstico de leptospirosis humana: evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad

Norma Bibiana Vanasco, BsC, Ms,^(1,2,3) María Fernanda Schmeling, MsC,⁽¹⁾ Yosena Chiani, BsC,⁽¹⁾ Javier Lottersberger, PhD,⁽³⁾ Héctor Dante Tarabla, PhD.^(4,5)

Vanasco NB, Schmeling MF, Chiani Y, Lottersberger J, Tarabla HD.
Diagnóstico de leptospirosis humana: evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. *Salud Publica Mex* 2012;54:530-536.

Vanasco NB, Schmeling MF, Chiani Y, Lottersberger J, Tarabla HD.
Human leptospirosis diagnosis: macroscopic agglutination test evaluation in different stages of the disease. *Salud Publica Mex* 2012;54:530-536.

Resumen

Objetivo. Evaluar la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR) como tamiz diagnóstico de leptospirosis humana en diferentes etapas de la enfermedad. **Material y métodos.** La definición de casos se basó en la microaglutinación (MAT), recuento de leucocitos y neutrofilia. Se incluyeron 218 casos confirmados y 242 no casos. Cada muestra del banco de sueros del laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de Santa Fe, Argentina, de 2008 a 2010, se clasificó según días de evolución en tres etapas: primera (<10 días), segunda (10-25 días) y tercera (>25 días). **Resultados.** La sensibilidad hallada fue: 71.1, 93.4 y 95.6% para etapas 1, 2 y 3 respectivamente. La especificidad varió de 79.0 a 69.2%. La variabilidad intra e interoperador fue moderada. **Conclusión.** La variabilidad del TR, su baja sensibilidad en la primera etapa y baja especificidad en todas las etapas de la enfermedad sugieren que sería indispensable la incorporación de nuevos métodos diagnósticos de tamiz para la detección precoz de casos en nuestro país, y países donde aún se apliquen este tipo de métodos.

Palabras clave: leptospirosis; diagnóstico; pruebas serológicas; pruebas de aglutinación; Argentina

Summary

Objective. To evaluate the macroscopic agglutination test using Temperature Resistant (TR) antigen as a screening test for the diagnosis of human leptospirosis in different stages of the disease. **Materials and methods.** The criteria for case definition were based on the results of the microscopic agglutination test (MAT), leukocyte counts and neutrophilia, resulting 218 confirmed cases and 242 non-cases. Each sample was classified according to the days of the disease progression in three stages: first (<10 days), second (10 - 25 days) and third (> 25 days). The design was cross-sectional observational. **Results.** TR sensitivity was 71.1% on stage 1, 93.4% on stage 2 and 95.6% on stage 3. The specificity at different stages ranged from 79.0 to 69.2%. Intra and inter-operator variability was moderate. **Conclusion.** TR variability, low sensitivity in the first stage and low specificity found in all stages of the disease, suggest that it is essential to incorporate new diagnostic methods to screen for early detection of cases in our country and in countries that still apply such methods.

Key words: leptospirosis; diagnosis; serologic tests; agglutination test; Argentina

- (1) Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dr. E. Coni.
- (2) Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Dr. Carlos G. Malbrán.
- (3) Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). Santa Fe, Argentina.
- (4) INTA Rafaela. Santa Fe, Argentina.
- (5) Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Esperanza, Argentina.

Fecha de recibido: 29 de junio de 2011 • Fecha de aceptado: 24 de mayo de 2012

Autor de correspondencia: Mtra. Norma Bibiana Vanasco. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dr E Coni.
Blas Parera 8260, Santa Fe (3000) Argentina.
Correo electrónico: bibi_vanasco@hotmail.com

La leptospirosis es reconocida como una de las enfermedades reemergentes de mayor importancia mundial.^{1,2} Constituye un problema creciente de salud pública, evidenciado por el aumento de las tasas de incidencia y múltiples brotes en todos los continentes.³⁻¹⁴ Sin embargo, es una enfermedad muy desatendida y por ello se desconoce su carga global; la incidencia estimada de medio millón de casos anuales graves en el hombre es sólo una subestimación.³ En Argentina provoca casos aislados y brotes durante los periodos estacionales de abundantes lluvias e inundaciones.¹⁵⁻¹⁸

La presentación clínica de la enfermedad es bifásica: una primera fase aguda de leptospiremia, de aproximadamente una semana, seguida de una segunda fase (inmune o sindromática) caracterizada por la producción de anticuerpos. La mayoría de las complicaciones de la enfermedad están asociadas con la localización de las leptospiras en los diferentes tejidos en esta fase y esto ocurre a partir de la segunda semana de evolución.²

La forma de presentación clínica más común en Argentina incluye síntomas inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza y mialgias.¹⁸ Los síntomas de la enfermedad pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades febriles tales como dengue, fiebres hemorrágicas, hantavirus y hepatitis.¹⁹ El aporte del laboratorio es esencial para la confirmación de los casos, y un diagnóstico confiable y precoz es imprescindible para comenzar inmediatamente una antibioticoterapia efectiva que prevenga la evolución hacia formas graves de la enfermedad.²⁰

El diagnóstico de laboratorio depende principalmente de la serología.²¹ El test de aglutinación microscópica (MAT) es la técnica de referencia internacional para la confirmación serológica de los casos.^{2,21,22}

Si bien existen numerosas pruebas de tamiz disponibles en el mundo, en la mayoría de los laboratorios de salud pública de Argentina el cribado o tamiz diagnóstico aún se realiza mediante la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (AMTR). En este país, como no existen reactivos diagnósticos comerciales, en los últimos años se desarrollaron y validaron reactivos de ELISA, pero aún no están disponibles para su uso en todos los laboratorios del país.²³

El método AMTR conocido como TR fue desarrollado en la década de los años setenta^{24,25} y emplea como único reactivo un antígeno obtenido a partir de una cepa de leptospira inactivada por calor (30 minutos a 100°C) con visualización directa sobre un portaobjeto. Es una prueba específica de género (detecta anticuerpos anti-leptospiras) y su producción artesanal se realiza en muy pocos laboratorios de referencia del país.

Las principales ventajas de este reactivo consisten en que es económico, rápido y sencillo de realizar, lo que permite que pueda realizarse en laboratorios de baja complejidad. Todas estas ventajas favorecen la descentralización del diagnóstico; por ello, este método constituyó la herramienta esencial para la creación de la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL) y así mejorar la accesibilidad y oportunidad del diagnóstico de leptospirosis en Argentina. El laboratorio de referencia nacional de la RNLL produce en forma centralizada el reactivo TR y lo distribuye en forma gratuita a todo el país. Esto permite el diagnóstico presuntivo precoz en centros diagnósticos descentralizados de mediana y baja complejidad. Las muestras procesadas en estos laboratorios regionales/provinciales son derivadas al laboratorio de referencia correspondiente para su confirmación por MAT.

A pesar de la amplia utilización del TR en Argentina y de sus ventajas estratégicas, tiene numerosas limitaciones. Una de las desventajas operativas es su subjetividad, que no es fácil de visualizar, y requiere de muestras límpidas y bien conservadas. Sin embargo, su principal limitación es su aparente baja sensibilidad y especificidad. En el laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER-ANLIS) en un periodo de 12 años de trabajo, se documentaron falsos negativos y positivos en casos confirmados y descartados respectivamente (datos no publicados). Este hallazgo no coincide con el único estudio previo realizado en Argentina, que le atribuye al TR tanto una sensibilidad como especificidad cercana al 100%.²⁶ Los otros antecedentes hallados en la bibliografía internacional son muy escasos, limitados y con resultados dispares.²⁷⁻²⁹ Estas discordancias constituyen la principal razón que justifica este trabajo.

Por otra parte, ninguno de los estudios previos evaluó el desempeño del TR en diferentes etapas de la enfermedad, ni la cualidad de las lecturas entre un mismo operador (repetibilidad) o entre operadores diferentes (reproducibilidad). Estos datos son necesarios para evaluar la calidad del resultado de un método de diagnóstico.

Si bien en la bibliografía internacional se describen otros métodos de aglutinación macroscópica, algunos de ellos con elevada sensibilidad y especificidad, ninguno está disponible en Argentina.^{2,29-32}

El objetivo de este estudio fue evaluar la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR) como tamiz diagnóstico de leptospirosis humana, en diferentes etapas de la enfermedad.

Material y métodos

Muestras

Las muestras de suero empleadas en este estudio forman parte del banco de sueros preexistente en el laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER-ANLIS) de Santa Fe, Argentina. Todas las muestras del banco corresponden a pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas a ese laboratorio nacional de referencia de leptospirosis para su diagnóstico. Los sueros se conservaron a -70°C hasta la realización de las pruebas.

La información de cada muestra que ingresa al laboratorio del INER se carga en una base de datos. Esta base incluye para cada paciente datos demográficos, fecha de inicio de los síntomas, fecha de la toma de muestras, principales síntomas clínicos, datos generales de laboratorio clínico y datos epidemiológicos en el momento de la derivación de la primera muestra. Esta planilla, como acompaña la primera muestra, generalmente no aporta datos de tratamiento.

De la diferencia entre la fecha de la toma de muestra y de inicio de los síntomas se obtuvieron los tiempos de evolución de la enfermedad para cada muestra, y según ellos se las agrupó en tres etapas: primera (< 10 días), segunda (10 - 25 días) y tercera (> 25 días).²²

Definición de casos

Se empleó un criterio de "definición de casos" (Confirmados y No casos de leptospirosis) que incluye resultados a la prueba serológica de referencia la microaglutinación (MAT), antecedentes de laboratorio clínico general, síntomas y datos epidemiológicos. Se consideró Caso confirmado aquel con antecedentes clínicos y epidemiológicos compatibles, donde se demostró: a) seroconversión a la MAT (aumento del título al menos cuatro veces para un serovar) o b) una única muestra positiva para más de un serovar (co-aglutinación) con al menos uno con título mayor o igual a $1/200$ de MAT, en ambos casos con al menos neutrofilia mayor a 70% y recuento de leucocitos mayor a $8.000/\text{mm}^3$. Se consideró No caso al paciente con MAT negativa en dos muestras de distintas etapas de la enfermedad, con resultados de neutrofilia menor o igual a 70% y recuento de leucocitos menor o igual a $8.000/\text{mm}^3$.²²

Para evaluar la reactividad cruzada y especificidad del TR se incluyó además, un total de 123 muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de las siguientes patologías, que constituyen los principales diagnósticos diferenciales de leptospirosis en Argentina: dengue ($n=30$); hantavirus ($n=28$); fiebre hemorrágica argen-

tina ($n=52$, muestras provenientes de 26 pacientes) y hepatitis A ($n=13$), provistas por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH-ANLIS). El diagnóstico de hepatitis A y hantavirus fue confirmado por ELISA IgM de captura, el de dengue por neutralización y el de fiebre hemorrágica argentina por ELISA IgG en muestras de periodo agudo y convaleciente.

Las 123 muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de otras patologías no se incluyeron en el análisis por etapas por no disponerse del dato de los días de evolución. Sólo se incluyeron en la evaluación global del TR, independientemente de las etapas de la enfermedad.

Test de aglutinación microscópica con antígenos vivos (MAT)

La MAT se realizó siguiendo procedimientos estándar.^{8,20,21} Todos los sueros se analizaron empleando como antígeno una batería de 14 cepas diferentes de serovares, comprendidos en 12 serogrupos. Los serovares incluidos en esta batería son los consensuados y acordados por los laboratorios que integran la RNLL y realizan MAT en seres humanos en Argentina. Las cepas empleadas se detallan en el cuadro I.

Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR)

El TR evaluado corresponde al lote 2007 producido en el laboratorio del INER, Dr. E. Coni, según la metodología descrita inicialmente.^{22,24-26} Estos autores utilizan la cepa Patoc I, (serovar Patoc, serogrupo Semaranga) de *L. biflexa*. En este estudio se utilizó la cepa Hardjoprajitno (serovar Hardjo, serogrupo Sejroe), ya que previamente se evaluaron todas las serovariedades de leptospirosis utilizadas en la MAT y se observó que la cepa Hardjoprajitno fue la que evidenció la mejor reactividad frente a un panel de sueros positivos y negativos de leptospirosis.

Diseño del estudio y análisis estadísticos

El diseño del estudio fue de tipo observacional transversal que evalúa simultáneamente tanto las condiciones de Casos confirmados como de No casos. El (n) se calculó para una sensibilidad y especificidad estimada de 90%, un error absoluto de 5%; el nivel de confianza de 95% fue de 138 al utilizar el programa Epi Info 6.04. Para asegurar la validez interna del estudio, se siguió el protocolo operativo estándar (POE) del TR del INER y se utilizó siempre el mismo laboratorio bajo las mismas condiciones de operación. La estimación de la sensibilidad y

Cuadro I
LEPTOSPIRAS EMPLEADAS EN LA MICROAGLUTINACIÓN (MAT) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS HUMANA.
ARGENTINA 2008-2010

Especies Genómicas	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
		Icterohaemorrhagiae	RGA
		Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Wolffi	3705
		Hardjo	Hardjoprajitno*
	Bataviae	Bataviae	Swart
	Australis	Australis	Ballico
	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis
Tarassovi		Tarassovi	Perepelitsin
Sejroe		Sejroe	M 84
<i>L. kirschneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc I

* Cepa empleada para la producción del antígeno termorresistente en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Santa Fe, Argentina

especificidad se efectuó con las lecturas realizadas por un mismo operador especializado. Los sueros utilizados para la evaluación del TR se procesaron a doble ciego para controlar el sesgo de revisión. Se minimizó el sesgo de verificación al aplicar el TR, sumado a la confirmación por MAT a todos los pacientes incluidos en el estudio, en forma independiente de los resultados obtenidos en cada una de estas pruebas.

La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, intervalos de confianza 95% (IC 95%) e índices de Youden se calcularon empleando el programa Epidat 3.1 (cuadro II).

Las muestras empleadas para la evaluación de la variabilidad intra e interoperador, fueron escogidas al azar, codificadas adecuadamente para evitar interpretaciones subjetivas y luego leídas por tres operadores diferentes (A, B y C), cada uno de ellos por duplicado el mismo día. Para la evaluación de la variabilidad intraobservador (A) e interobservador (A versus B) se utilizaron 106 muestras, mientras que para la evaluación interobservador (A y B versus C) se emplearon 65 muestras.

La concordancia entre las lecturas intra e interoperador se midió mediante el coeficiente Kappa (K) y el error aleatorio se cuantificó por el IC 95%. Los valores de K

mayores a 0.75 se interpretaron como una concordancia excelente, entre 0.75 y 0.40 como moderada, y menores a 0.40 como pobre.²²

Resultados

Del total de primeras y segundas muestras de pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al laboratorio INER en Santa Fe, Argentina, desde enero de 2008 a marzo de 2010, 460 (230 pacientes) tuvieron suficiente información y reunieron los requisitos de definición de casos para ser incluidos en este estudio, de lo que resultaron 218 Casos confirmados y 242 No casos.

La edad de los 230 pacientes incluidos en el estudio fue de 1 a 88 años, con una media de 34 años. El 77% (177) de los pacientes era de sexo masculino y 23% (53) de sexo femenino.

En el cuadro III, se describen los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), Índice de Youden e IC 95% hallados para el diagnóstico por TR en tres etapas de la enfermedad.

Resultaron reactivas al TR, sólo una de las 30 muestras de pacientes con dengue, 9 de las 28 muestras de pacientes con hantavirus, 25 de las 52 muestras de

Cuadro II
SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALORES PREDICTIVOS E ÍNDICES DE YOUTEN DE LA AGLUTINACIÓN MACROSCÓPICA (TR),
COMO MÉTODO TAMIZ PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS EN TRES ETAPAS DE LA ENFERMEDAD. ARGENTINA 2008-2010

	N° de muestras Casos confirmados	No casos	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPN (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	Índice de Youden
Etapa 1 (<10 días)	104	100	71,1 (62.0-80.3)	79.0 (70.5-87.5)	72.48 (63.6-81.3)	77.9 (69.0-86.8)	0.5 (0.4-0.6)
Etapa 2 (10 a 25 días)	91	103	93.4 (87.8-99.0)	73.8 (64.8-82.8)	92.7 (86.4-98.9)	75.9 (67.5-84.3)	0.7 (0.6-0.8)
Etapa 3 (>25 días)	23	39	95.6 (85.1-100)	69.2 (53.5-85.0)	96.4 (87.8-100.0)	64.7 (47.2-82.2)	0.6 (0.5-0.8)

Cuadro III
VALORES DE KAPPA (IC 95%) PARA LAS DIFERENTES
LECTURAS DE TR REALIZADOS INTRA E INTER OPERADOR

Operadores	K (IC 95%)
Intra Operador A (repetibilidad)	0.71 (0.56-0.85)
Inter Operador (A vs B) (reproducibilidad)	0.64 (0.49-0.80)
Inter Operador (A vs C) (reproducibilidad)	0.51 (0.33-0.68)

pacientes con fiebre hemorrágica argentina y 9 de las 13 muestras de hepatitis.

Los resultados de la evaluación del TR, independientemente de las etapas de la enfermedad, considerando el total de muestras (n= 583) (incluidas las de pacientes con diagnóstico confirmado de otras patologías) fueron: sensibilidad 83.5% (IC 95%: 78.3 – 88.6), especificidad 71.8% (IC 95%: 67.0 – 76.5), VPP 63.9% (IC 95%: 58.1-69.6) y el VPN de 87.9% (IC 95%: 84.1-91.8). El Índice de Youden fue de 0.6 (IC 95%: 0.5 – 0.6).

Los resultados de los valores del coeficiente K (IC 95%) para las diferentes lecturas de TR realizados por una repetición de un mismo operador y entre diferentes operadores se presentan en el cuadro III.

Discusión

En este estudio la menor sensibilidad del TR (71.1%; IC95%:62,0-80,3) fue la correspondiente a la primera etapa de la enfermedad (<10 días de evolución), que es justamente donde se esperaría que sea elevada para permitir la detección precoz de la mayor cantidad de casos, más aún si este método se emplea como tamiz y

sólo se derivan los positivos para su confirmación por MAT. Estos resultados confirman las observaciones previas de falsos negativos hallados en el laboratorio, y son coincidentes con los descritos por otros autores que le atribuyen una baja sensibilidad a este método.^{2,28} Sin embargo, se contraponen con la elevada sensibilidad de 97.7% e incluso 99% respecto de la MAT hallados previamente en el único estudio previo de evaluación efectuado en Argentina.²⁶ Una de las posibles razones de esta diferencia podría atribuirse a que todas las muestras provenían de pacientes de un hospital especializado. En estos casos, con muestras tomadas pasados los 10 días de evolución y la mayoría de los pacientes probablemente en fase sindrómica, es de esperarse una mayor sensibilidad. Sin embargo, tanto la sensibilidad de la última etapa (95.6%) como la global (83.5%) hallada en el presente trabajo, independientemente de las etapas de la enfermedad, también fueron inferiores a la obtenida en ese estudio previo de evaluación.

Más aún, es precisamente debido a la baja sensibilidad del TR que surgen las modificaciones a este método.² Estas modificaciones consisten en diferentes tratamientos a las células enteras de una o más de una variedad de leptospira y además algunos de ellos utilizan otros componentes para facilitar la visualización de la aglutinación como partículas de látex o colorantes, todos estos métodos serológicos, al igual que el TR, son rápidos y género-específicos.^{2,29-32}

La sensibilidad fue ascendiendo en la etapa 2 (93.4%) y alcanzó su máximo valor (95.6%) en la tercera etapa donde ya no sería tan necesaria la utilización de un método de detección precoz, y donde generalmente la muestra ya resulta MAT positiva.

La sensibilidad de cada método serológico depende del tiempo comprendido entre el inicio de los síntomas

y la fecha de obtención de la muestra. Aunque el TR no fue evaluado previamente en diferentes etapas de la enfermedad, sí lo hicieron algunos de los métodos de aglutinación posteriormente modificados descritos, y los resultados de sensibilidad y especificidad hallados también son muy variables entre ellos.³⁰⁻³² Uno de estos métodos es la aglutinación macroscópica modificada por Galton que mostró buena sensibilidad y especificidad global (99%), aunque la reactividad hallada fue de 57% en muestras de hasta 6 días de evolución y de 99% en muestras de 15 días a 2 meses de evolución.^{2,29} Otro método, que incorpora varias modificaciones y utiliza colorantes, describe una muy baja especificidad (55%) y aunque la sensibilidad global descrita es buena (94%), la reactividad hallada en muestras de hasta 7 días de evolución fue sólo de 45.5%.³¹ El primer estudio del tercer método (ensayo de aglutinación del látex) describe una sensibilidad y especificidad global promedio del 82.3 y 94.6%, respectivamente,³² aunque evaluaciones posteriores de este mismo ensayo le atribuyen similar sensibilidad pero una especificidad inaceptable de 10%.³³⁻³⁴ Mientras tanto, la sensibilidad observada en este mismo método fue de 54.2% en muestras de hasta 10 días y de 93.8% en muestras de 10 a 30 días de evolución.³¹ Todos estos antecedentes implican que la baja sensibilidad del TR hallada en este estudio en la etapa 1 (<10 días de evolución) es comparable a la descrita previamente para otros métodos de aglutinación con células enteras.³⁰⁻³³

Una revisión reciente sugiere que los métodos que detectan anticuerpos anti-leptospiras enteras (no sólo los de aglutinación) pueden presentar baja sensibilidad durante la fase aguda de la enfermedad y baja especificidad en áreas altamente endémicas.³⁴ Todos estos resultados implicarían que, en caso de trabajar en el desarrollo de reactivos para aumentar su sensibilidad y especificidad del TR mediante alguna de las modificaciones descritas (por ejemplo, partículas de látex), no deberían emplearse células enteras como antígeno.

La especificidad (de 69.2 a 79.0%) hallada en este estudio en las diferentes etapas de la enfermedad fue baja. Estos resultados coinciden también con las observaciones previas documentadas en el laboratorio del INERANLIS y datos publicados para otras aglutinaciones,^{30,33} pero se contradicen con la elevada especificidad (99.4 o incluso 100%) global respecto de la MAT halladas en el único estudio previo.²⁶ Más aún, la presencia de falsos positivos después fue corroborada en este trabajo con las muestras de No casos de leptospirosis o pacientes con confirmación de laboratorio de los principales diagnósticos diferenciales de esta enfermedad en Argentina en la

actualidad. La especificidad global del TR, incluyendo estas muestras, fue de 71.8%. La reactividad cruzada en casos de dengue fue sólo de 3.3%, de 32.1% en hantavirus y 48.1% para fiebre hemorrágica argentina, siendo la máxima para hepatitis A (69.2%). Estudios posteriores deberán estudiar las causas de estas reacciones cruzadas.

La variabilidad tanto intraoperador (repetibilidad) como interoperador (reproducibilidad) fue moderada, lo que confirma que la interpretación subjetiva podría dificultar la obtención de resultados totalmente comparables y reproducibles entre operadores y, por lo tanto, entre laboratorios. Esto implica que es necesario reforzar los controles de calidad periódicos y evaluar la concordancia de las lecturas entre los laboratorios que aún emplean este método. La estrategia sugerida para vigilar la calidad del TR es solicitar periódicamente a cada laboratorio descentralizado la derivación de 10% de las muestras no reactivas para su reprocesamiento y control. Esta estrategia es una práctica habitual en los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis en Argentina. Por otra parte, las muestras reactivas, como son derivadas para su confirmación, se controlan en su totalidad cuando se procesan por otros métodos.

El valor predictivo negativo global del ensayo (87.9%) y sobre todo el de la etapa 1 (72.48%) indican que un paciente con leptospirosis, más aún con pocos días de evolución, tiene una alta probabilidad de resultar no reactivo al TR a pesar de estar enfermo. Por esa razón sería necesario implementar, además, otros métodos de tamiz en los laboratorios descentralizados para permitir la detección precoz de esos casos que serían falsos negativos del TR y, por lo tanto, no serían tratados oportunamente.

Los bajos valores predictivos positivos 63.9% de VPP global y 77.9, 75.9, 64.7% en las etapas 1, 2 y 3, respectivamente, indican, además, una probabilidad de entre 22 y 36% de falsos positivos atribuibles a otras patologías. Esto implica que los laboratorios deben conocer esta situación para poder colaborar en la interpretación de los resultados. Esta situación se resolvería en parte con la derivación de las muestras TR reactivas al laboratorio de referencia para su confirmación por MAT.

La variabilidad del TR demostrada en este estudio, sumada a la baja sensibilidad en la primera etapa y la baja especificidad global y en todas las etapas de la enfermedad, sugieren que sería indispensable la pronta incorporación de nuevos métodos diagnósticos de tamiz para la detección precoz de casos en nuestro país y en países donde aún se apliquen este tipo de métodos.

Agradecimientos

A las doctoras S. Levis y A. Morales del INEVH por la provisión de los controles para evaluar la reactividad cruzada. El presente proyecto fue financiado por el programa CAI+D (2009) de la UNL.

Declaración de conflicto de intereses. Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

- World Health Organization. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec* 1999;74(29):237-244.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):296-326.
- Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world 2011. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(4):494-501.
- Easton A. Leptospirosis in Philippine floods. *BMJ* 1999; 319(7204):212.
- Jayaraman KS. India urged to act against leptospirosis. *Nature* 1998;392(6671):4.
- Ko AI, Galvao-Reis M, Ribeiro-Dourado CM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 1999;354(9181):820-825.
- Lupidi R, Cinco M, Balinzin D, Delprete E, Varaldo PE. Serological follow-up of patients in a localized outbreak of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1991;29(4):805-809.
- Sanders EJ, Rigua-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, et al. Increase in leptospirosis in dengue-negative patients, after a hurricane in Puerto Rico in 1996. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61(5):399-404.
- Sehgal SC. Human leptospirosis-an emerging public health problem in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;10(4):477-478.
- Sehgal SC, Vijiyachari P, Murhekar MV, Sugunan AP, Sharma S, Singh SS. Leptospirosis among primitive tribes Andaman and Nicobar islands. *Epidemiol Infect* 1999;122(3):423-428.
- Suarez-Hernandez M, Martinez-Sanches R, Posada-Fernandez PE, Vidal-García I, Bravo-Fleites F, Sanchez-Sibello A. Brotes de leptospirosis humana en la provincia de Ciego de Avila, Cuba. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32(1):13-18.
- Tangkanakul W, Kingnate D. Leptospirosis epidemic in north-eastern provinces of Thailand, 1997. *Health Sci* 1998; (7):386-395.
- Trejevo RT, Rigua-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 1998;178(5):1457-1463.
- AAVLD in Xlla Reunión Científico Técnica. 1998 Oct. Mar del Plata.
- Vanasco NB, 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 J et al. Brote de leptospirosis humana luego de una inundación. Reconquista (Santa Fe), 1998. *Rev Arg Microbiol* 2002;34(3):124-131.
- 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.
- Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical Characteristics and Risk Factors of Human Leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Tropica* 2008;107(3):255-258.
- Kobayashi Y. Human Leptospirosis: Management and Prognosis. *J Postgrad Med* 2005; 51(3):201-204.
- Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 1995;21(1):1-6.
- World Health Organization. International Leptospirosis Society (WHO-ILS). Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. NLM classification: WC 420. Malta: World Health Organization, 2003: 109.
- Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World health Organization (WHO Offset Publ. No.67). England: World Health Organization, 1982: 161.
- Vanasco NB, Lottersberger J, Schmeling F, Gardner I, Tarabla H. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un ELISA-IgG en diferentes etapas de la enfermedad en Argentina. *Pan Am J Public Health* 2007;21(6):388-395.
- Mazzonelli J, Mazzonelli GD, Mailloux M. Antigene Thermoresistant chez les Leptospire. *Ann Microbiol (Paris)* 1974;125A(1):125-126.
- Mailloux M, Mazzonelli J, Mazzonelli GD. Thermoresistant Antigen in Leptospire. Possibility of a Macroscopic Diagnosis of Leptospirosis with a Single Antigen. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* 1974;A(229):238-241.
- Seijo AC, Mazzonelli J. Evaluación del antígeno termorresistente en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Acta Bioq Clínica Lat* 1993;27(4):487-491.
- Banfi E, Cinco M, Delia S, Castagnari L, Vullo V, Mastroianni CM et al. New Trends in the Rapid Serodiagnosis of Leptospirosis. *Zentralbl Bakteriell Hyg* 1984;257(4):503-507.
- Regalado-Segui JD, López-Acosta C, Pedrosa-Peña P, Ramos-Pérez LR. Estudio serológico de pacientes con leptospirosis mediante el antígeno TR. *Rev Cuba Med Trop* 1990;42(2):208-218.
- Brandao AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva MV, Abrao RV. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998;36(11):3138-3142.
- Wanyangu SW, Palmer MF, Zochowski WJ, Waitkins SA. Comparison of the Difco and Patoc I slide Antigen in the Screening of Leptospirosis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1987; 10(2):155-161.
- Bragger JM, Adler B. A card test for the serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Pathol* 1976;29(3):198-202.
- Smits HL, Van Der Hoorn MA, Goris MG. Simple Latex Agglutination Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1272-1275.
- 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):1464-1469.
- McBride AJ, Santos BL, Queiroz A. Evaluation of tour Whole-Cell Leptospira-Based Serological Tests for Diagnosis of Urban Leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(9):1245-1248.