

Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IF-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis

Mag. Paulina Meny*, Tec. Elba Hernández†, Dres. Felipe Schelotto‡, Gustavo Varela§

Resumen

Introducción: la leptospirosis es una enfermedad febril, aguda, que presenta manifestaciones clínicas variadas. Esto dificulta o retarda el diagnóstico clínico, por lo cual es útil disponer de métodos de laboratorio adecuados para orientar el manejo inicial de estos pacientes.

Objetivo: evaluar un procedimiento de inmunofluorescencia para detectar IgM (IF-IgM) de elaboración propia aplicado al diagnóstico temprano de leptospirosis.

Material y método: se analizaron por IF-IgM y microaglutinación (MAT) (tomada como estándar de referencia) sueros obtenidos de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis. La sensibilidad y especificidad de la IF-IgM versus MAT se establecieron utilizando una tabla de doble entrada. La concordancia entre dos observadores se determinó por el test Kappa.

Resultados: de 161 muestras precoces analizadas, 97 sueros correspondieron a pacientes con infección aguda confirmada por MAT y 64 sin infección. La sensibilidad y especificidad de la IF-IgM con sueros de fase aguda fueron 79% y 100%, respectivamente. El índice Kappa fue 1.

Conclusiones: la IF-IgM aparece como una herramienta útil para el diagnóstico temprano de pacientes con leptospirosis. No requiere el manejo de bacterias viables, puede realizarse en laboratorios que cuenten con microscopio de luz ultravioleta, se necesita una sola muestra de suero y el resultado está listo en tres a cuatro horas. En cuanto a las desventajas, no identifica los serovares involucrados y un resultado negativo no descarta la infección. Teniendo en cuenta esto último es obligatorio analizar por MAT una segunda muestra de suero obtenida a los 10-20 días de la primera para descartarla o confirmarla.

Palabras clave: TÉCNICA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE
INMUNOGLOBULINA M
LEPTOSPIROSIS

Key words: FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE
IMMUNOGLOBULIN M
LEPTOSPIROSIS

* Asistente interino del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

† Técnico especializado, titular. Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

‡ Profesor Titular del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

§ Profesor Agregado del Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay.

Correspondencia: Gustavo Varela, Alfredo Navarro 3051, CP 11600, Montevideo. Correo electrónico: gvarela@higiene.edu.uy

El trabajo fue financiado con fondos de la Agencia Nacional de Investigación (ANII), Fondo María Viñas, y de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)-Programa Grupos.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Recibido: 13/9/13

Aceptado: 24/3/14

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira*. Actualmente se reconocen nueve especies patógenas subdivididas en más de 200 serovares⁽¹⁻³⁾. La transmisión a los seres humanos ocurre por contacto directo o indirecto con orina de animales domésticos o salvajes infectados, especialmente bovinos y roedores⁽⁴⁾.

La leptospirosis se presenta como una enfermedad febril, aguda, con manifestaciones clínicas variadas, a menudo inespecíficas. El amplio espectro de síntomas y signos dificulta el diagnóstico clínico; por lo tanto es necesario disponer de procedimientos de laboratorio adecuados para facilitar el manejo inicial de estos pacientes y la instalación de la antibioticoterapia correcta⁽⁵⁾.

El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento e identificación de las bacterias a partir de tejidos o líquidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, etcétera). Sin embargo, estos procedimientos requieren períodos de incubación prolongados y disponer de un conjunto importante de antiseros absorbidos para identificar y establecer el serovar de las cepas recuperadas⁽⁶⁾.

Por otro lado, la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de leptospirosis es la prueba de microaglutinación (MAT): un ensayo complejo que requiere el uso y el mantenimiento de bacterias viables así como la interpretación por personal experimentado^(4,7). La MAT también puede mostrar resultados negativos en las primeras etapas de la infección y generalmente no es útil para identificar los serovares involucrados⁽⁸⁾.

Como alternativa a la MAT se ha desarrollado una variedad de pruebas rápidas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo (tests inmuno-enzimáticos, tests de aglutinación macroscópica, tests inmunocromatográficos, etcétera) o en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos (AAN), tanto reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) convencional como PCR en tiempo real (qPCR)⁽⁹⁻¹¹⁾. Sin embargo, muchos de estos procedimientos (AAN, ELISA) no son aplicables en laboratorios de mediana complejidad.

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica rápida, de fácil ejecución e interpretación cuando se compara con la MAT y que no requiere trabajar con bacterias vivas en la etapa de ejecución del procedimiento y lectura de los resultados. La IF permite, además, demostrar la presencia de anticuerpos de tipo IgM presentes habitualmente en las primeras etapas de la infección⁽¹²⁾.

El objetivo de este trabajo fue evaluar un procedimiento de IF "propio" para detectar IgM en su aplicación al diagnóstico temprano de leptospirosis.

Material y método

Se analizaron por IF-IgM, 161 sueros (anónimos, codificados con letras y fecha) obtenidos en la fase aguda de 161 pacientes con sospecha de leptospirosis. Estos sueros fueron enviados al Laboratorio del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene entre 2009 y 2013 para la confirmación de la enfermedad por MAT. La MAT se realizó tanto sobre sueros de la etapa aguda como sobre aquellos obtenidos 10-15 días después (fase convaleciente) siguiendo el procedimiento descrito previamente⁽¹³⁾.

Los sueros se clasificaron como correspondientes a una infección aguda cuando los resultados de la MAT en las dos muestras consecutivas (aguda y convaleciente) fueron -/+, o cuando en la primera muestra el título fue ≥ 400 para uno o más de los 20 serovares que integran el conjunto de cepas de referencia incluidas en la MAT⁽¹³⁾; cuando los resultados fueron negativos en ambas muestras, el paciente se consideró sin evidencias de infección.

Los 161 sueros correspondientes a la etapa aguda se conservaron a -20°C y se procesaron posteriormente por IF-IgM, sin conocer los resultados de la MAT.

También se analizaron por IF-IgM, 15 sueros de pacientes con hepatitis por virus B y 20 con sífilis.

Preparación de las láminas para IF

Las cepas de *Leptospira* spp utilizadas (*Australis bratislava*, *Ballum castellanis*, *Icterohaemorrhagiae copenhageni* y *Canicola canicola*) para sensibilizar las láminas de inmunofluorescencia (Multi-Spot, Thermo Scientific®) fueron seleccionadas en función de los serovares que habitualmente dan títulos altos en MAT en nuestro laboratorio⁽¹³⁾.

Cada cepa se cultivó en medio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco®) a 28°C hasta que alcanzó una concentración de 0,8-0,9 en la escala Mac Farland. Un ml de cada cultivo se utilizó para hacer un pool bacteriano que luego se diluyó 100 veces en buffer-fosfato-salino (PBS) 1X pH 7.2. En cada hoyo se colocaron 20 μl de esta dilución; la cantidad de bacterias se controló por microscopía en campo oscuro y luego las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. La fijación se hizo con 20 μl de acetona (grado analítico) durante 8-10 minutos. Las láminas preparadas se conservaron a -20°C hasta su uso.

Detección de IgM

Se utilizó el procedimiento descrito por Agudelo-Flórez y colaboradores⁽⁵⁾.

En cada hoyo se colocaron 20 μl de una dilución 1/50 en PBS 1X pH 7.2 del suero a estudiar. En cada lámina se incluyeron sueros positivos y negativos para

Tabla 1. Resultados obtenidos en los 161 pacientes con los procedimientos de MAT e IF-IgM

		Infección aguda establecida por MAT [†]		Total
		Sí	No	
IF-IgM positiva *	Sí	77	0	77
	No	20	64	84
	Total	97	64	161

* Por este procedimiento únicamente se analizaron las muestras de suero correspondientes a la etapa aguda.

† Por este procedimiento se analizaron las muestras de suero correspondientes a la etapa aguda y convaleciente.

IgM anti *Leptospira* determinado por ELISA. Las láminas se incubaron en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos. Luego se realizaron dos lavados con PBS 1X pH 7.2, con agitación constante durante 5 minutos cada uno y un tercer lavado con agua destilada en agitación por 5 minutos. Se dejaron secar a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de agua. A cada hoyo se agregaron 20 µl de conjugado anti IgM humana obtenido en cabra y marcado con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA®) diluido 1/15 en PBS 1X pH 7.2 de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Luego las láminas se incubaron en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS 1X pH 7.2, con agitación constante durante 5 minutos cada uno y un tercer lavado con agua destilada en agitación constante por 5 minutos.

Se dejaron secar al aire y se montaron colocando unas gotas de glicerol y el cubreobjetos. Las láminas se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon® ECLIPSE 80i, filtro de 495nm) utilizando los objetivos 20X y 40X.

Análisis estadístico

La sensibilidad y especificidad de IF-IgM versus MAT se establecieron utilizando una tabla de doble entrada. Para calcular VPP de la IF-IgM se utilizó el teorema de Bayes y una prevalencia anual estimada de 15 casos de infección/100.000 habitantes.

El grado de concordancia de los resultados obtenidos por dos observadores diferentes (PM, GV) se evaluó utilizando el test de Kappa.

Resultados

De los 161 sueros analizados, 97 correspondieron a pacientes con infección aguda y 64 a personas sin infección. De los 97, 51 mostraron resultados negativos por MAT en la primera muestra y en 46 el título de la primera muestra fue ≥ 400 para uno o más serovares.

Ninguno de los sueros obtenidos de pacientes con

hepatitis por virus B ni con sífilis dio resultado positivo por IF-IgM.

La sensibilidad y especificidad del ensayo de IF-IgM para sueros de fase aguda fue de 79% y 100%, respectivamente (tabla 1). El valor predictivo positivo (VPP) fue de 100%, el valor predictivo negativo (VPN) no se calculó, ya que debido a la baja prevalencia los valores se modifican poco en función de los cambios de la sensibilidad.

La IF-IgM permitió hacer el diagnóstico precoz de infección reciente analizando únicamente la muestra de suero obtenida en la etapa aguda; en 32 (62,7%) de 51 pacientes con infección aguda confirmada, pero resultado de MAT negativo en la primera muestra.

El valor obtenido para el índice Kappa fue de 1.

Discusión

En Uruguay ocurren alrededor de 15 casos de leptospirosis cada 100.000 habitantes por año, afectando principalmente a hombres jóvenes que se desempeñan como trabajadores rurales⁽¹³⁾. El diagnóstico de laboratorio es importante para el manejo inicial de estos pacientes. Desde el año 2000 en nuestro laboratorio se utiliza de forma rutinaria el ensayo de MAT para el diagnóstico de leptospirosis⁽¹³⁾. Sin embargo, con este procedimiento sumamente laborioso se obtienen resultados muchas veces tardíos que no contribuyen al manejo inicial de los pacientes. Requiere, por otra parte, el envío de una segunda muestra en período convaleciente que por motivos diversos (desconocimiento, dificultades de acceso, mejoría clara del paciente) no se remite en más de 50% de los casos.

Varias pruebas diagnósticas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo se han desarrollado; sin embargo, la utilidad en Uruguay de varias de ellas no ha sido determinada^(9,10).

La IF-IgM de elaboración propia mostró una sensibilidad de 79% y una especificidad de 100% cuando se

comparó con la MAT. El valor de sensibilidad fue similar al reportado por Agudelo-Flórez y colaboradores⁽⁵⁾.

Las cifras de especificidad (100%) y VPP también fueron comparables con los datos obtenidos por otros autores^(5,14-16), sugiriendo que la IF-IgM es una prueba útil para definir el diagnóstico y tomar decisiones terapéuticas cuando el resultado es positivo en la primera muestra de suero.

La IF-IgM de diseño propio mostró un índice Kappa de 1, revelando una concordancia perfecta entre las lecturas realizadas por dos observadores diferentes.

La IF-IgM aparece como una herramienta útil para el diagnóstico temprano (etapa aguda, menos de diez días tras el inicio de los síntomas) de pacientes con leptospirosis, sobre todo en aquellos con primera prueba de MAT negativa. No requiere de una infraestructura muy sofisticada, puede realizarse en laboratorios que cuentan con microscopio de luz ultravioleta, las láminas sensibilizadas se pueden conservar hasta tres meses y el resultado está listo en tres a cuatro horas. Quedaría por establecer si la IF-IgM desarrollada presenta ventajas en cuanto a costos y especificidad con respecto a los tests inmunocromatográficos disponibles⁽⁹⁾.

La positividad precoz por IF-IgM de los sueros de 32 de los 51 pacientes que solo fueron positivos por MAT en segundas muestras permite suponer que un porcentaje elevado de los casos IF positivos, de los cuales no se obtiene habitualmente segundo suero para MAT, serían efectivamente personas infectadas.

En cuanto a las desventajas, como ocurre con la MAT, la IF no identifica los serovares involucrados y un resultado negativo no descarta la infección. Teniendo en cuenta esto último, para descartar o confirmar la infección se requiere analizar por MAT una segunda muestra de suero obtenida a los 10-20 días de la primera.

Abstract

Introduction: leptospirosis is a severe febrile disease, with a variety of clinical presentations. This results in the delay of clinical diagnosis, or in difficulties achieving it, so having the appropriate laboratory tests may deem useful to guide the initial care of these patients.

Objective: to evaluate a self-made immunofluorescence technique for the detection of IgM antibodies (IF-IgM) in the early diagnosis of leptospirosis.

Method: serum samples obtained from patients with a clinical suspicion of leptospirosis were analysed by IF-IgM antibodies and the microagglutination test (MAT). Sensitivity and specificity of IF-IgM versus MAT were determined using a double entry table. Agreement between two observers was determined by the Kappa test.

Results: out of one hundred and sixty one early

samples analysed, 97 serum samples corresponded to patients with a confirmed acute infection by MAT and 64 evidenced no infection. Sensitivity and specificity of IF-IgM assays in the acute phase were 79% and 100% respectively. The Kappa value was 1.

Conclusions: IF-IgM seems to be a useful tool for the early diagnosis of patients with leptospirosis. It does not need viable bacteria to be handled; it may be applied in laboratories equipped with ultraviolet light microscopes, a single serum sample is needed and the result is seen three to four hours later. As to its disadvantages, it fails to identify the involved serovars and a negative result does not discard infection. Bearing the latter into account, the MAT test is mandatory in a second serum sample obtained 10-20 days after the first one, to either discard or confirm the disease.

Resumo

Introdução: a leptospirose é uma doença febril, aguda, com diferentes manifestações clínicas o que dificulta ou atrasa o diagnóstico clínico. Por essa razão é importante contar com métodos de laboratório adequados para orientar o manejo inicial dos pacientes.

Objetivo: avaliar uma técnica de imunofluorescência para detectar IgM (IF-IgM) para o diagnóstico precoce de leptospirose.

Material e método: foram analisados por IF-IgM e microaglutinação (MAT) (usada como padrão de referência) soros de pacientes com suspeita clínica de leptospirose. A sensibilidade e a especificidade da IF-IgM comparada com MAT foi determinada usando uma tabela de dupla entrada. A concordância entre dois observadores foi determinada usando o teste Kappa.

Resultados: Cento sessenta e uma amostras da fase precoce foram analisadas, sendo 97 de pacientes com infecção aguda confirmada por MAT e 64 sem infecção. A sensibilidade e a especificidade da IF-IgM com soros obtidos na fase aguda foram 79% e 100%, respectivamente. O índice Kappa foi igual a 1.

Conclusões: a técnica IF-IgM que desenvolvemos, pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce de pacientes com leptospirose. Não é necessário manipular bactérias viáveis, pode ser realizada em laboratórios que tenham microscópio com luz ultravioleta, somente é necessária uma amostra de soro e o resultado está disponível em três-quatro horas. Com relação às desvantagens, esta técnica não identifica os serovares e um resultado negativo não descarta a presença de infecção. Considerando estas desvantagens, é obrigatório analisar por MAT uma segunda amostra de soro obtida 10 a 20 dias depois da primeira para descartar ou confirmar a infecção.

Bibliografía

1. **Cerqueira GM, Picardeau M.** A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 2009; 9(5):760-8.
2. **Adler B, de la Peña Moctezuma A.** *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010; 140(3-4):287-96.
3. **McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI.** Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18(5):376-86.
4. **Levett PN.** Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2):296-326.
5. **Agudelo Flórez P, Restrepo M, Lotero MA.** Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Biomédica* 2006; 26(2):216-23.
6. **Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF, et al.** Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4):1363-5.
7. **Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** *Leptospira* and leptospirosis. 2 ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.
8. **Levett PN.** Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2003; 36(4):447-52.
9. **Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gasem MH, Yersin C, et al.** Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8(1):166-9.
10. **Hull-Jackson C, Glass MB, Ari MD, Bragg SL, Branch SL, Whittington CU, et al.** Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5):1853-5.
11. **Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW.** Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 1):45-9.
12. **Aricapa HJ, Pérez JE, Cabrera IC, Rivera K.** Valoración de la respuesta de anticuerpos tipo IgM e IgG frente a leptospira en bovinos. *Biosalud* 2008; 7(1): 29-39.
13. **Schelotto F, Hernández E, González S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, et al.** Diez años de seguimiento de la leptospirosis humana en Uruguay: un problema de salud no resuelto. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2012; 54(2): 69-75.
14. **Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J.** Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52(4):340-3.
15. **Joshi S, Bal A, Bharadwaj R, Kumbhar R, Kagal A, Arjunwadkar V.** Role of IgM specific indirect immunofluorescence assay in diagnosing an outbreak of leptospirosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2002; 45(1):75-7.
16. **Pradutkanchana S, Pradutkanchana J, Khuntikij P.** Detection of IgM specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Med Assoc Thai* 2003; 86(7):641-6.