

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Diagnóstico serológico de la leptospirosis humana mediante 3 variantes de la técnica de hemaglutinación pasiva

Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes¹ y Dra. Magalys Martell²

RESUMEN

Se realizó un estudio serológico para evaluar 3 variantes de la técnica de hemaglutinación pasiva (HA), con la utilización de eritrocitos de carneros frescos y formalinizados (HC) y glóbulos rojos humanos grupo O Rh negativo formalinizados (HH), no se detectaron diferencias estadísticas significativas de los resultados de la HA y la HC y entre la HC y la HH. Sólo se presentó reacción inespecífica en 2 de los 200 sueros estudiados empleando la HH y la HC. Se observaron anticuerpos heterófilos solamente en el 2,5 % de los sueros estudiados por HH y en el 100 % mediante HC. Se determinaron los parámetros cualitativos para las variantes empleadas y así se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad de la variante más útil.

Descriptor DeCS: SERODIAGNOSTICO/métodos; TESTS DE HEMAGLUTINACION/métodos; LEPTOSPIROSIS/sangre.

En Cuba, la técnica más utilizada para el diagnóstico serológico de la leptospirosis humana, es la hemaglutinación pasiva (HA), la cual ha sido aplicada hasta el nivel de centro provincial de higiene y epidemiología (CPHE) desde 1981. En numerosos estudios realizados se ha prestado gran atención a la preparación de los eritrocitos procedentes de diferentes especies de animales, los que han sido sensibilizados con diferentes antígenos mediante diferentes métodos. Es entonces que aparecen descritas numerosas sustancias para ser acopladas a estos eritrocitos, y facilitar así su aglutinación, entre estas sustancias se encuentran: formaldehído, glutaraldehído, aldehído pirúvico y acetato crómico.¹⁻³

La primera y exitosa experiencia en este sentido se obtuvo cuando los eritrocitos fueron tratados con formaldehído, lo cual le confirió más estabilidad al sistema.

En la ejecución de la técnica de HA, diferentes investigadores han utilizado sangre de carnero, caballo, rata, pollo, mono y eritrocitos humanos pertenecientes al

grupo O Rh negativo. Estos últimos constituyen los más indicados cuando se pretende titular anticuerpos en sueros de humanos, ya que se evitan reacciones inespecíficas que sí ocurren cuando se utilizan eritrocitos heterólogos. En caso de emplearse estos últimos es imprescindible realizarle al suero una adsorción previa.⁴

Los estudios que emplean como indicadores eritrocitos formalinizados se justifican por la estabilidad que éstos brindan al sistema y porque posibilitan la sensibilización previa al ensayo lo que disminuye el tiempo de realización de éste.

Por lo tanto, considerando la necesidad de utilizar la técnica de HA en el diagnóstico de la leptospirosis humana, es que en el presente trabajo se evalúan 3 variantes de HA para elegir la más útil como alternativa de trabajo en el caso de escasear los hematíes de carneros.

DESARROLLO

Se estudiaron 3 grupos de sueros divididos según la procedencia de éstos, un primer grupo integra-

¹ Investigadora Auxiliar.

² Especialista de I Grado en Microbiología.

do por 50 pares de sueros obtenidos de pacientes con leptospirosis confirmada según lo establecido en los lineamientos para el control y prevención de la enfermedad editado por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).¹ En el segundo grupo fueron estudiados otros 50 sueros (15 pertenecientes a pacientes con hepatitis, 15 a otros con sífilis venérea, 5 sueros de sarampión y 5 de rubéola, y 10 sueros de pacientes con meningitis aséptica a enterovirus). En el último grupo se utilizaron 50 sueros procedentes de donantes de sangre supuestamente sanos.

Se utilizó el antígeno ESS (sustancia sensibilizante de eritrocitos) común para las 3 variantes. Éste fue elaborado según lo descrito en los lineamientos para el control de la enfermedad.¹

Todos los sueros fueron diluidos 1/10 en PBS (solución fosfatada alcalina) e inactivados a 56 °C durante 30 min. Se preparó suficiente cantidad de eritrocitos sensibilizados con el antígeno y sin sensibilizar (utilizado para el control de heterófilos). Fueron mezclados los sueros con los hematíes y colocados a 37 °C durante 1 h agitando la solución cada 15 min. Se utilizaron placas de microtitulación en donde se dispensó 50 µL del suero y se realizaron diluciones al doble desde 1/10 hasta 1/640 a las cuales después se les adicionó 50 µL de hematíes sensibilizados. Se incubó la reacción durante 1 h a 30 °C. En la misma placa fueron punteando para cada suero problema, su control de heterófilos con hematíes sin sensibilizar. Al realizar la lectura final se tomó en consideración la reacción de hemaglutinación como positiva y como título la mayor dilución a la cual existió efecto hemaglutinante.⁵

Realizando la misma metodología se procedió al montaje de la prueba con los eritrocitos de carneros formalinizados (HC) y los hematíes humanos O Rh negativos formalinizados (HH).

Fueron determinados los parámetros de sensibilidad, especificidad, valores predictivos para una prueba positiva y una negativa, reproducibilidad y repetibilidad.⁶

Se calculó la media aritmética (\bar{x}), la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).

El estudio serológico efectuado en los 50 pares de sueros de pacientes con leptospirosis confirmada mediante las 3 variantes estudiadas, dio como resultado 45 sueros positivos por HA, para un 90 % de sensibilidad, 42 sueros positivos por HH para un 84 % y 33 positivos por HC para un 66 %.

Al determinar la coincidencia entre las 3 variantes, se demostró que 33 sueros fueron positivos cuando fueron estudiados por HA y HH, 30 por HA y HC, y 28 por HH y HC. En el estudio estadístico efectuado no se observaron diferencias estadísticas significativamente entre HH y la HC, y la HA y HC.

Utilizando la HH 2 sueros pertenecientes a pacientes con sífilis fueron positivos; sin embargo, cuando se empleó la HC un suero de un paciente con sífilis y otro de un donante de sangre supuestamente sano resultaron positivos. Cinco sueros presentaron reacción heterófila imposible de eliminar después de 2 tratamientos realizados.

El número de reacciones heterófilas detectados al usar la HH fue del 2,5 % (5 de 200 sueros estudiados). Empleando la variante HC, se encontraron anticuerpos heterófilos en el 100 % de los sueros. Estos resultados se explican por la presencia de anticuerpos inespecíficos en los sueros de humanos, que son detectados cuando se utilizan como indicadores eritrocitos de otras especies diferentes.

Como resultado se obtuvo para la HH una sensibilidad del 84 %, una especificidad del 98 %, un valor predictivo para una prueba positiva del 95,15 % y una negativa de 92,15 %. Con la variante HC los parámetros fueron del 66, 97, 94 y 84,5 %, respectivamente. Con el método convencional de HA empleado como técnica de referencia los valores fueron de 92, 95, 90 y 96 %, de forma respectiva.

Fueron obtenidos buenos resultados con el empleo de la HH, no así con la HC, con la cual se detectó una merma significativa en la sensibilidad.

En esta fase de la investigación se decidió evaluar solamente la reproducibilidad y repetibilidad de la HH, se consideró no útil para el diagnóstico la variante HC. Los estudios de estos parámetros fueron evaluados estadísticamente y resultaron ser muy satisfactorios para la variante HH, por lo que se demostró su buena repetibilidad y reproducibilidad.

Las ventajas fundamentales de utilizar la HH como variante en el diagnóstico de la entidad, se pueden resumir de la siguiente manera: se encuentran unidos en un solo biológico el antígeno y los hematíes formalinizados, lo que se puede ofrecer al usuario de forma tal que le garantice un producto estable, lo que posibilita que se acorte el tiempo de ejecución de la marcha técnica a 2 h, proceso que se demora 4 o más tiempo cuando se realiza a través del método original. Esta variante puede ser utilizada en aquella unidad asistencial con condiciones creadas y a la cual el centro de referencia suministre y garantice la calidad y estabilidad del biológico elaborado.

SUMMARY

A serological study was conducted to evaluate 3 variants of the positive hemagglutination technique (HA) with the use of formalized erythrocytes of fresh lamb (HC) and of formalized Type O, Rh-negative human red blood cells (HH). No significant statistical difference were found between the results of HA and HC and between HC and HH. Unspecific reaction was only observed

in 2 of the 200 sera studied by HH and HC. Heterophil antibodies were just observed in 2.5 % of the sera studied by HH, and in 100 % of the sera studied by HC. The qualitative parameters were determined for the variants used, and this way the repetition and reproducibility of the most useful variant was evaluated.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faine S. Guidelines for the control and prevention of leptospirosis, Geneva: 1-145,1982 (WHO OFF SET PUBLICATION; No. 67).
2. Sakamoto N. Detection of antibodies to leptospiral genus specific in human and animal sera by a purified genus specific protein antigen. *Zbi Bacteriol Hyg* 1985;259:548-56.
3. Sakamoto N. Characterization of a partially purified leptospiral genus specific protein antigen. *Zbi Bacteriol Hyg* 1985;259:507-19.
4. Suizer CR. Leptospirosis: methods in laboratory diagnosis. Atlanta: Centers of Disease Control, Dept. of Health Education and Welfare, 1978.
5. _____. Evaluation of a Indirect Haemagglutination Test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1975;2(3):218-21.
6. Manual de Sensibilidad y Especificidad: valores predictivos. *Bol Of Sanit Panam* 1991;(6):1-6.

Recibido: 12 de junio de 1997. Aprobado: 24 de febrero de 1998.
 Lic. *Ana Margarita Obregón Fuentes*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.
 E.mail: ciipk@infomed.sld.cu