

Detección de anticuerpos IgM contra leptospiras por un sistema comercial ELISA-IgM

Detection of IgM antibodies to leptospire by using a commercial ELISA-IgM system

Dra. C. Ana Margarita Obregón Fuentes, Dra. C. Carmen Fernández Molina, Dr. C. Islay Rodríguez González, MSc. Yaindrys Rodríguez Olivera, Téc. Eduardo Echevarría Pérez, Téc. José Rodríguez Silveira, Téc. Yoanna Baños Morales

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la leptospirosis humana es una zoonosis sistémica y transmisible producida por bacterias invasivas del complejo *Leptospira interrogans* sensu lato. Numerosos métodos se utilizan para el serodiagnóstico de esta entidad clínica, dentro de los cuales se encuentra ELISA.

Objetivos: aplicar un nuevo sistema serológico comercial de ELISA, para la pesquisa de anticuerpos IgM contra leptospiras e identificar los serogrupos de leptospiras presentes en los sueros positivos por este sistema.

Métodos: de pacientes sospechosos de leptospirosis se estudiaron 27 y 61 sueros con anticuerpos contra leptospiras y sin estos, respectivamente. La técnica de microaglutinación con antígenos vivos (MAT) se utilizó como método de referencia. Los sistemas comerciales de SD *Leptospira* ELISA-IgM, SD flujo lateral *Leptospira* IgM y la hemoaglutinación indirecta (HAT) fueron comparativamente empleados.

Resultados: 27 sueros con anticuerpos contra leptospiras resultaron positivos por SD *Leptospira* ELISA-IgM, 20 por SD flujo lateral *Leptospira* IgM y 9 por hemoaglutinación indirecta. De 61 sueros sin anticuerpos contra leptospiras, 9 y 8 resultaron positivos, respectivamente, por SD *Leptospira* ELISA-IgM y por SD flujo lateral *Leptospira* IgM. Los serogrupos Ballum y Canicola predominaron en los sueros positivos por el sistema comercial. La coincidencia entre SD *Leptospira* ELISA-IgM y la técnica de microaglutinación con antígenos vivos fue de 89,77 %.

Conclusiones: SD *Leptospira* ELISA-IgM muestra una mayor positividad en los sueros estudiados, lo que avalaría su posible introducción en Cuba. Se confirma la amplia reactividad del antígeno usado en SD *Leptospira* ELISA-IgM, lo cual sugiere

mantener una activa vigilancia de laboratorio sobre los serogrupos de leptospiras, a nivel nacional.

Palabras clave: ELISA-IgM, leptospirosis, detección rápida, anticuerpos IgM.

ABSTRACT

Introduction: human leptospirosis is a communicable systemic zoonosis caused by the invasive bacteria *Leptospira interrogans* sensu lato complex. Numerous methods are used for serodiagnosis of this disease, including the ELISA tests.

Objectives: to implement a new commercial serological ELISA test (SD Leptospira ELISA-IgM, SD Biotline, Korea) for screening of IgM antibodies and for identification of *Leptospira* serogroups in positive sera.

Methods: twenty seven and sixty one sera, with/without IgM antibodies to leptospire, respectively, were studied. They had been taken from patients suspected of having leptospirosis. The microscopic agglutination test with live antigens (MAT) was the reference method. In addition, other commercial systems such as SD Leptospira IgM Lateral Flow and indirect hemagglutination (HAT) tests were comparatively used.

Results: all the 27 sera with antibodies against *Leptospira* were positive according to SD Leptospira ELISA-IgM, 20 sera were found positive by SD Lateral Flow IgM test and 9 sera by the indirect HAT test. Of the 61 sera without antibodies to leptospire, 9 and 8 were positive by SD Leptospira ELISA-IgM and SD Leptospira IgM Lateral Flow test, respectively. Serogroups Canicola and Ballum were predominant in positive sera tested by the commercial system under evaluation. The agreement coefficient between SD Leptospira ELISA-IgM and MAT was 89.77 %.

Conclusions: SD Leptospira ELISA-IgM showed higher positivity rate than the other systems in the studied sera; this aspect would support its possible introduction in Cuba. The great reactivity of the antigen used in the system was confirmed, which indicates that active laboratory surveillance of leptospiral serogroups should be kept nationwide.

Key words: ELISA-IgM, leptospirosis, quick detection, IgM antibodies.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis humana catalogada en la actualidad como una enfermedad olvidada o desatendida, es una entidad clínica ubicada entre las enfermedades zoonóticas, identificada como una infección sistémica, aguda y transmisible, producida por un gran número de bacterias helicoidales invasivas, incluidas en el complejo patogénico denominado *Leptospira interrogans* sensu lato. Esta zoonosis es una de las más conocidas en el mundo, y se clasifica como una enfermedad emergente, por el número elevado de brotes epidémicos que ocasionan las múltiples serovariedades de leptospiras que circulan en países tropicales y subtropicales (Hartskeerl RA. Leptospirosis: a prototype neglected infectious disease. [disertación]. Citado en: II Congreso Internacional Espiroquetas Habana 2012. Palacio de Convenciones. Ciudad de La Habana. Cuba. 2012).¹

La respuesta humoral basada en la producción de anticuerpos es típica de la leptospirosis humana. Tanto en sueros de animales como en los de los humanos, aparecen más tempranamente los anticuerpos de la clase IgM, los que identifican la infección aguda. La presencia y concentración de estos anticuerpos IgM no siempre es de igual manera detectada por los diferentes métodos serológicos.²

El éxito del diagnóstico serológico de la leptospirosis humana depende del momento ideal estimado para la toma de muestra, con respecto a la fecha de inicio de los síntomas clínicos en el paciente.²

Numerosos son los métodos utilizados para el serodiagnóstico de la leptospirosis humana. Hasta el presente la técnica MAT (*microagglutination test*) es la de referencia internacional, porque con ella es posible detectar el "serovar o serogrupo" causante de la infección, aunque de manera indirecta. Sin embargo, si se compara únicamente con el cultivo y aislamiento de leptospiras, existen diversos sistemas serológicos que han mostrado bondades para la pesquisa rápida de anticuerpos IgM; dentro de estos están los ensayos inmunoenzimáticos como el ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*).^{1,2}

Las pruebas de ELISA son populares y no solo se reportan los sistemas que se producen "en casa", sino también los que ya están disponibles comercialmente. Estas técnicas utilizan antígenos género-específico que permiten detectar anticuerpos de las clases IgM, producidos contra la mayoría de las cepas de leptospiras. El punto de corte que diferencia un suero positivo de otro negativo, se estima considerando la prevalencia de la enfermedad en las diferentes regiones geográficas. Se ha demostrado que el ELISA como prueba género específica tiende a ser positiva más tempranamente que la MAT, en el caso de la leptospirosis humana.¹

Desde la década de los noventa del siglo pasado, el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) investiga sobre el desarrollo, la introducción, la aplicación y la evaluación de nuevas técnicas de laboratorio que garanticen la pesquisa rápida de anticuerpos IGM o IgG contra leptospiras, sobre todo en sueros que procedan de pacientes graves, o de aquellos asociados con brotes epidémicos o eventos epidemiológicos. En 2011 en Cuba se da a conocer la existencia de un sistema indirecto comercial de SD Leptospira ELISA-IgM, para la detección de anticuerpos de la clase IgM en sueros de pacientes sospechosos de leptospirosis. En el presente trabajo se trazan como objetivos aplicar un nuevo sistema serológico comercial SD Leptospira ELISA-IgM, para la pesquisa de anticuerpos IgM contra leptospiras, en sueros de pacientes sospechosos de leptospirosis en Cuba, e identificar los serogrupos de leptospiras presentes en los sueros positivos por este sistema serológico comercial.

MÉTODOS

Tipo de estudio

La presente investigación descriptiva y analítica abarcó el período comprendido desde enero y hasta agosto de 2012.

Contexto de la investigación

El LNRL, perteneciente al Departamento de Bacteriología-Micología de la Vicedirección de Microbiología del IPK, sirvió de contexto para esta investigación. Ese laboratorio es de alcance internacional y posee el equipamiento tecnológico necesario para brindar servicios especializados, y enfrentar las contingencias sobre la leptospirosis humana y otras enfermedades producidas por espiroquetas que se presenten en Cuba.

Muestras

Se estudiaron 27 y 61 sueros con anticuerpos contra leptospiras y sin estos, respectivamente. Las muestras de sueros procedían de pacientes sospechosos de leptospirosis, y se recibieron en el LNRL, del IPK, para el realizar los estudios de confirmación. La determinación de los anticuerpos contra leptospiras se realizó mediante la técnica de MAT, considerada como método de referencia internacional para el serodiagnóstico de la enfermedad. Además se utilizaron dos sueros controles incluidos en el estuche comercial, uno de ellos positivo, con anticuerpos IgM contra leptospiras, y el otro negativo procedente de un donante de sangre "supuestamente sano" sin anticuerpos contra leptospiras.

Procedimiento

Componentes del estuche comercial SD Leptospira ELISA-IgM, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana:³

1. Miroplacas de fondo plano, fijadas con el antígeno de leptospira género-específico, a una concentración de $0,4 \pm 0,08 \mu\text{g/pocillo}$.
2. Conjugado de anticuerpos anti IgM humana unido con la enzima peroxidasa.
3. Diluyente conjugado: formado por el tampón fosfato alcalino, con albúmina bovina fracción V (BSA) y el timerosal.
4. Diluyente del suero: formado por el tampón fosfato alcalino, con BSA y ácido sódica.
5. Suero control positivo: suero con anticuerpos anti-leptospira IgM a 0,1 %.
6. Suero control negativo: suero sin anticuerpos anti-leptospira IgM a 0,1 %.
7. Sustrato A: tetrametil bencidina (TMB), en acetato de sodio, con peróxido de hidrógeno y gentamicina.
8. Sustrato B: tetrametil bencidina (TMB), en ácido clorhídrico (HCl) y penicilina.
9. Solución de lavado (concentrada 20X): integrada por el tampón fosfato alcalino, con Tween 20 y con el preservo (proclín 300).
10. Reactivo de detección: constituido por el ácido sulfúrico al 1,6 N.

Predilución del suero

- Diluir los sueros 1/100 (10 μL suero + 990 μL de diluyente del suero) en tubos de serología de 100x13.

Pasos técnicos

- Sacar del estuche la placa con el antígeno fijado y los restantes componentes y colocarlos a temperatura de laboratorio.
- Realizar esquema de trabajo y la leyenda de los sueros, incluyendo los dos controles del estuche, ubicando tres pocillos de la placa para el suero control negativo y otros dos pocillos para el suero control positivo. Todos los sueros problemas deben trabajarse por duplicado.

- Adicionar 100 μ L de cada suero en su pocillo correspondiente.
- Cubrir la placa con papel adhesivo.
- Incubar la placa durante 30 min a 37 °C.
- Realizar 5 lavados con un volumen de 350 μ L de buffer de lavado/pocillo, dejando transcurrir al menos 10 segundos entre cada lavado. Aspirar cuidadosamente el líquido remanente del último lavado.
- Adicionar 100 μ L del conjugado por pocillo.
- Cubrir la placa con papel adhesivo.
- Incubar la placa durante 30 min a 37 °C.
- Realizar 5 lavados con un volumen de 350 μ L de *buffer* de lavado/pocillo, dejando transcurrir al menos 10 s entre cada lavado. Aspirar cuidadosamente el líquido remanente del último lavado.
- Mezclar en tubo de ensayo una parte del sustrato A con una parte del sustrato B. Posteriormente adicionar de la mezcla de los sustratos 100 μ L por pocillo.
- Incubar 10 min a temperatura de laboratorio (15-30 °C). Un color azul es desarrollado.
- Adicionar 100 μ L del reactivo de detección por pocillo.
- Leer la absorbancia de los pocillos en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 450 nm usando otra de referencia de 620 nm. Realizar la lectura final después de transcurrida 1 h de finalizado el ensayo.

Interpretación de los resultados

- Se realizó la suma de las densidades ópticas (en duplicado) del suero positivo y las triplicadas del negativo, se estimó una media final para cada uno. De igual manera se hizo el cálculo de los promedios de las densidades ópticas de los sueros problemas.

Cálculo del valor de corte

- Se realizó sumando el valor del promedio de la densidad óptica (DO) del control negativo, y adicionándole la constante de 0,700.

Basado en este criterio las muestras se clasificaron como sigue:

- Muestra negativa: aquella muestra que presentó un valor de densidad óptica (DO) inferior al valor de corte.
- Muestra positiva: aquella muestra que presentó un valor de densidad óptica (DO) superior o igual al valor de corte.

Otros métodos serológicos

La técnica de MAT utilizada para determinar la presencia de anticuerpos (IgM o IgG) contra leptospiras y además para identificar el serogrupo presente en cada suero positivo por el SD Leptospira ELISA-IgM, junto con las técnicas de SD Flujo Lateral Leptospira IgM y la HAT (detección de anticuerpos IgM), aparecen reportadas en el *Manual de Operaciones y Procederes para el diagnóstico de la leptospirosis humana* del LNRL del IPK y en los instructivos disponibles de los sistemas comerciales.^{2,3}

A todos los casos con muestras negativas por MAT y ELISA se les recomendó realizar la toma de un segundo suero, con un intervalo de 7 a 10 días de haber tomado la primera muestra (suero).

RESULTADOS

El sistema SD Leptospira ELISA-IgM detectó el mayor porcentaje de sueros con anticuerpos contra leptospiras, comparativamente con el SD Flujo Lateral Leptospira IgM y la HAT. De los 27 sueros con anticuerpos contra leptospiras determinados por MAT, 100 % (27/27) resultó positivo por SD Leptospira ELISA-IgM, 74,07 % (20/27) por SD Flujo Lateral Leptospira IgM y 33,33 % (9/27) por HAT. Dentro de los 9 sueros con anticuerpos contra leptospiras detectados por HAT, y positivos por MAT y SD Leptospira ELISA-IgM, 7 (77,77 %) mostraron títulos desde 20 y hasta 40; mientras que, 2 (22,22 %) presentaron títulos iguales o superiores a 160. Estos últimos se consideraron positivos a leptospiras según el criterio establecido en esta metodología.

De los 61 sueros sin anticuerpos contra leptospiras mediante MAT, 85,24 % (52/61) resultó negativo y 14,75 % (9/61) positivo por SD Leptospira ELISA-IgM. Dentro de los 9 sueros positivos por SD Leptospira ELISA-IgM, 8 (88,88 %) resultaron positivos por SD Flujo Lateral Leptospira IgM.

La coincidencia manifiesta entre SD Leptospira ELISA-IgM y MAT fue de 89,77 %, mientras que para SD Leptospira ELISA-IgM y SD Flujo Lateral Leptospira IgM, resultó de 81,81 % y entre SD Leptospira ELISA-IgM y HAT de 69,31 %.

El reconocimiento por MAT de los serogrupos de leptospiras presentes en los sueros positivos por SD Leptospira ELISA-IgM, fue el siguiente: en 2 sueros se detectó el serogrupo Pyrogenes para 7,40 %, en otros 3 sueros se reconocieron los serogrupos Pomona e Icterohamorrhagiae separadamente para 11,11 %. El serogrupo Patoc fue reconocido en 5 sueros para 18,51 %. Los serogrupos Ballum y Canicola estuvieron presentes en 7 sueros, respectivamente, para 25,92 %.

DISCUSIÓN

El método de ELISA es usado internacionalmente como una prueba adicional en el serodiagnóstico de la leptospirosis humana.¹ Este método es el más usado para detectar la infección de desarrollo agudo, si se utiliza un conjugado anti-IgM, porque los anticuerpos de esta clase son los primeros que se producen durante la respuesta primaria frente a la infección por leptospiras. Sin embargo, como método rápido, comparativamente con el cultivo y el aislamiento, se establece que los resultados por esta técnica deben siempre confirmarse por MAT como única técnica de referencia internacional.^{2,4-6}

El estuche comercial usado en esta investigación está integrado por reactivos que presentan como estabilidad demostrada (según el productor), que alcanzan hasta los 3 meses, bajo las condiciones de almacenamiento específicas descritas por el productor.³

No se encontraron reportes en la literatura científica internacional que utilicen el sistema comercial de SD Leptospira ELISA-IgM, empleado en esta investigación. Sin embargo, sí existen publicaciones donde emplean los sistemas ELISA-IgM "caseros" para el serodiagnóstico de la leptospirosis humana. La mayoría de estos trabajos evalúan los sistemas ELISA-IgM, determinando los valores de sensibilidad, especificidad y otros indicadores de desempeño, al utilizar sueros controles

negativos y positivos. En estos trabajos no aparecen los resultados de la aplicación del sistema al diagnóstico y la vigilancia continua de la enfermedad.⁴⁻⁶

Con el sistema SD Leptospira ELISA-IgM se detectó el mayor porcentaje de sueros con anticuerpos contra leptospiras, comparativamente con el SD Flujo Lateral Leptospira IgM y la HAT. Los hallazgos de la presente investigación demuestran la alta sensibilidad del sistema SD Leptospira ELISA-IgM aplicado, si se compara con los resultados por la HAT, en la que se reportó el porcentaje más bajo (2/9) de positividad. Este aspecto debe tomarse en consideración para la toma de decisiones futuras en cuanto a la descentralización de nuevos sistemas más sensibles y específicos, como es el caso de este sistema SD Leptospira ELISA-IgM, útil para la vigilancia de la leptospirosis humana a nivel nacional.

El sistema SD Leptospira ELISA-IgM mostró una adecuada especificidad a pesar de haber encontrado 14,75 % de sueros positivos dentro de la muestra trabajada, en particular los sueros sin anticuerpos contra leptospiras, determinados por MAT.

No se puede afirmar que 14,75 % (9/61) de sueros positivos encontrados por el sistema comercial de SD Leptospira ELISA-IgM se puedan clasificar como falsos positivos, porque 8 (88,88 %) de ellos coincidieron también como positivos por el sistema comercial de SD Flujo Lateral Leptospira IgM. En estos casos resultaría interesante haber realizado un cultivo de leptospiras, evidencia irrefutable para la confirmación de la enfermedad. Sin embargo, con esta información serológica ofrecida por dos sistemas comerciales que detectan anticuerpos IgM contra leptospiras, se pudiera plantear que sí pertenecen a casos con infección activa de leptospirosis. Algunos aspectos se pueden adjudicar a este fenómeno encontrado. Particularmente el sistema SD Leptospira ELISA-IgM es más sensible, al detectar los anticuerpos IgM producidos entre los 6 y 8 días después de la aparición de los primeros signos clínicos con respecto a otros sistemas serológicos, incluida la MAT.¹ Se ha demostrado que con la técnica MAT se detectan más tardíamente los anticuerpos IgM contra leptospiras, pero tiene ventajas adicionales (que no las presentan los sistemas comerciales de SD Leptospira ELISA-IgM y el SD Flujo Lateral Leptospira IgM aplicados en esta investigación). MAT es una metodología que detecta no solo los anticuerpos IgM sino detecta también los anticuerpos IgG, indicadores de la infección pasada por leptospirosis y, por otra parte, constituye el único método que determina el posible serogrupo de leptospira causante de la infección.¹

En este reporte ha sido demostrado el alto grado de coincidencia entre los resultados por los sistemas comerciales de SD Leptospira ELISA-IgM y el SD Flujo Lateral Leptospira IgM, lo que permite inferir que de cada 10 casos que se estudien por ambos métodos, en 8 de ellos, los resultados serían similares.

Como ya se ha expresado, los sistemas ELISA-IgM dan una respuesta positiva con valor diagnóstico, más tempranamente que las restantes pruebas serológicas descritas para el diagnóstico de la leptospirosis humana. Pero también que el ELISA-IgM puede ser negativo más rápido con respecto a la MAT, aunque pueden detectarse en muy pocos sueros bajos niveles de IgM específica.¹ Es posible sugerir entonces realizar estudios futuros que permitan determinar cómo influyen el momento de la toma de muestra con respecto a los diferentes intervalos, y las respuestas obtenidas por los diferentes ensayos serológicos. Así se demostraría el intervalo ideal para la toma de muestra y la consiguiente aplicación del método de laboratorio correcto, para la determinación de anticuerpos IgM o IgG contra leptospiras.^{1,4-6}

Para muchos investigadores tiene importancia la interpretación correcta de los resultados serológicos de cualquier método de laboratorio, incluidos los obtenidos a través de los sistemas ELISA. Para ellos se debe considerar si el método es comercial o no, el origen y la reactividad del antígeno utilizado (serogrupo de leptospira), la fecha de toma de las muestras con respecto a la fecha de inicio de síntomas en el paciente, etc. Por esta razón, un formulario epidemiológico completo y los datos clínicos de los pacientes deben ser remitidos al laboratorio especializado donde se estudien los casos sospechosos (Hartskeerl RA. Leptospirosis: a prototype neglected infectious disease [disertación]. Citado en: II Congreso Internacional Espiroquetas Habana 2012. Palacio de Convenciones. Ciudad de La Habana. Cuba. 2012).

El sistema comercial de SD Leptospira ELISA-IgM para la detección de anticuerpos en casos sospechosos de leptospirosis, ha mostrado con los resultados de este estudio que es un sistema útil para la pesquisa rápida de anticuerpos contra leptospirosis, si se compara con el cultivo y aislamiento del agente etiológico, lo que fortalece el diagnóstico de la enfermedad, en las condiciones cubanas.

El grado de concordancia reportada por el productor entre el SD Leptospira ELISA-IgM con respecto a la técnica de MAT fue de 90 %, y los valores de sensibilidad y especificidad de 97,2 % y 99,1 %, respectivamente.³ Estos valores favorecen el uso del método para la detección de los anticuerpos IgM, en los casos sospechosos de leptospirosis. En esta investigación se obtuvo un alto grado de coincidencia entre el SD Leptospira ELISA-IgM y la MAT, que favorece así el diagnóstico de la enfermedad.

Han sido reconocidos en los sueros positivos diversos serogrupos de leptospirosis, por el sistema comercial de SD Leptospira ELISA-IgM. Esto demuestra la amplia reactividad genérica del antígeno (serogrupo-serovar-cepa) acoplado al sistema comercial, lo que constituye una ventaja demostrada de ese sistema. A partir de estos hallazgos se sugiere mantener una vigilancia activa de laboratorio sobre la circulación de estos y otros serogrupos en Cuba, con vistas a futuros estudios epidemiológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 1-150.
2. Fernández C, Obregón AM, Rodríguez I, Rodríguez Y, Mondeja B, Noda A, et al. Manual de operaciones y procedimientos de la leptospirosis. La Habana/Panamá: Ediciones DAMPSA; 2012. ISBN: 978-9962-9000-0-9.
3. BIO LINE Standard Diagnostics INC. Corea del Sur. SD Leptospira ELISA-IgM y SD flujo lateral Leptospira IgM. II Congreso Internacional Espiroquetas Habana 2012 [citado Abril 2012]. Disponible en: <http://www.standardia.com>
4. Céspedes ZM, Glenney AM, Vidal Felices A, Balda JL, Suárez MV. Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de la leptospirosis humana. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2002; 19(1):54-62.

5. Polanco J, de Aguirre L, Marcano E, Pantoja A. Diagnóstico de la leptospirosis humana mediante el uso de la técnica DOT-ELISA. *Vet Trop.* 1997;22(1):65-75.
6. 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 Pública.* 2007;21(6):388-95.

Recibido: 13 de julio de 2012.

Aprobado: 30 de noviembre de 2012.

Ana Margarita Obregón Fuentes. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba. AP 601. Marianao 13. Habana, Cuba. Correo electrónico: amobregon@ipk.sld.cu