

Evaluación de un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral para la pesquisa de la leptospirosis humana

Evaluation of a lateral flow immunochromatographic system for screening of human leptospirosis

MSc. Yendrys Pérez Elías; Dr.C. Ana Margarita Obregón Fuentes; MSc. Lic. Gilda Lemos Pérez; Dr. Héctor L Machado Morales; MSc. Isabel del Carmen Rodríguez Reyes; Lic. José Rodríguez Silveira

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

RESUMEN

Introducción: la leptospirosis humana es una enfermedad emergente de distribución mundial, a menudo subdiagnosticada por presentar un cuadro clínico inespecífico. Con el propósito de contribuir al diagnóstico rápido y oportuno de esta entidad en Cuba se evaluó un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral de producción nacional.

Métodos: se evaluó un sistema inmunocromatográfico cubano que utiliza membranas de nitrocelulosa a las que se les acopla una mezcla de células completas de leptospirosis unidas a un conjugado anti IgM humana-oro coloidal como sustancia de detección. Para la evaluación de laboratorio se emplearon 215 sueros humanos, divididos en 75 muestras positivas (Grupo I) y 140 muestras negativas (Grupo II). Se empleó como técnica de referencia la Microaglutinación con antígenos vivos (MAT).

Resultados: el sistema evaluado mostró altos valores de sensibilidad (96 %), especificidad (97,1 %) y concordancia (96,7 %) con respecto al sistema de referencia. Los valores predictivos positivo y negativo fueron de 94,74 y 97,84 % respectivamente. La razón de verosimilitud positiva resultó de 33,60 y la negativa de 0,04.

Conclusiones: el sistema inmunocromatográfico de flujo lateral propuesto podría constituir una herramienta útil para la pesquisa rápida de anticuerpos contra

leptospiras. Se recomienda su validación e introducción en la red de laboratorios del Sistema Nacional de Salud en Cuba.

Palabras clave: Leptospirosis; inmunocromatografía de flujo lateral; leptospiras.

ABSTRACT

Introduction: The human leptospirosis is an emergent disease with worldwide distribution, it present a difficult diagnosis because it has not a specific clinical symptom. With the purpose of contributing to the early and opportune diagnosis of this entity in Cuba an immunochromatography system of lateral flow of national production was evaluated.

Methods: A system indigenous was evaluated, that uses an antigen, formed by a mixture of complete cells of leptospiras coupled to nitrocellulose membranes and a conjugated of colloidal gold with anti human IgM, as detection substance. For the evaluation 215 human serums were studied, divided in two groups, 75 positive samples (Group I) and 140 negative samples to leptospirosis (Group II). The Microscopic Agglutination Test (MAT) with living antigens was used as reference method.

Results: The system demonstrated high values of sensibility (96 %), specificity (97,1 %) and agreement (96,7 %) according to the system of reference used. The values positive predictive and negative were of 94,74 and 97,84 % respectively. The reason of positive verisimilitude was of 33,60 and the negative of 0,04.

Discussion: The immunochromatography system of lateral flow to propose could constitute a useful tool for the early investigation of the human leptospirosis. It is recommended its validation and their future introduction in the net of laboratories of the National System of Health in Cuba.

Key words: Leptospirosis; Immunochromatography test of lateral flow; leptospiras.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis humana es una enfermedad zoonótica, que cursa en la mayoría de los casos como una infección sistémica aguda, producida por serovares de leptospiras, incluidas en el complejo patogénico *Leptospira interrogans* sensu lato. Esta entidad tiene amplia distribución mundial, aunque aparece con mayor incidencia en regiones tropicales y subtropicales; la infección por leptospira provoca diversas formas clínicas y a menudo es subdiagnosticada ya que sus síntomas y signos son inespecíficos. Puede presentarse como una enfermedad grave, aunque sensible a tratamiento antimicrobiano específico.^{1,2}

El éxito del diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad, depende de las evidencias epidemiológicas, los criterios clínicos, los métodos de laboratorio y el conocimiento sobre la patogenia de la enfermedad. En particular el período entre la fecha de toma de las muestras clínicas con respecto a la fecha de inicio de

síntomas, es de suma importancia a la hora de interpretar los resultados por los diferentes métodos convencionales o de avanzada.³

Las técnicas serológicas desempeñan un papel importante para confirmar la infección por leptospiras, ya que permiten demostrar en un breve período, la presencia de inmunoglobulinas (IgM o IgG) producidas frente estas bacterias. Los métodos serológicos son sencillos y de bajo costo si se comparan con el cultivo y las técnicas bacteriológicas o moleculares.⁴

La técnica de referencia descrita para el serodiagnóstico de la leptospirosis es la Microaglutinación con antígenos vivos (MAT, siglas en inglés). Este proceder determina los anticuerpos aglutinantes en el suero del paciente mediante la mezcla de varias diluciones de éste con leptospiras vivas. Los anticuerpos antileptospiras presentes en la muestra hacen que estas se peguen unas a otras formando grumos. Este proceso es observado usando microscopía de campo oscuro. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG. Este método posee ventajas, sin embargo, tiene requerimientos especiales y consume más tiempo, si se compara con otros métodos serológicos y el cultivo.^{4,5}

En la búsqueda de métodos sencillos y rápidos aparecen para el serodiagnóstico de leptospirosis, los sistemas inmunocromatográficos de flujo lateral: Dip-S-Ticks®-IgM (comercializado por la agencia PanBio INDX, Inc) y LEPTO Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow, los que detectan de forma rápida, anticuerpos IgM o IgG, específicos contra leptospiras.^{4,5} Así mismo en el año 2007, la empresa Coreana BIO LINE (SD) Standard Diagnostics, Inc, comercializa el estuche inmunocromatográfico de SD Leptospira-IgM y SD Leptospira IgM-IgG.⁴

Tomando en consideración estos avances internacionales, el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) trabajó en el desarrollo, la aplicación y la evaluación de un nuevo sistema inmunocromatográfico cubano de formulación sencilla, dirigido a la detección de anticuerpos IgM contra leptospiras. De este modo, en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se propuso realizar el diseño del sistema y llevar a cabo el protocolo de evaluación.

Se emplearon 215 sueros humanos, divididos en dos grupos: el grupo I con 75 muestras de casos confirmados de leptospirosis por MAT y el grupo II con 140 muestras de pacientes con serología negativa, de ellas 10 casos de sífilis, cinco de pacientes con meningitis aséptica por enterovirus, 12 casos de dengue, 15 de hepatitis viral (cinco de cada tipo A, B y C) y 98 de individuos supuestamente sanos. Todas las muestras procedían de la seroteca del LNRL, y se encontraban conservadas a -20°C.

El sistema consta de una tirilla de nitrocelulosa marcada en un extremo con un conjugado formado por oro coloidal unido a una anti IgM humana, que difundirá con ayuda del tampón de corrida.^{6,7} Los anticuerpos IgM para leptospira, son reconocidos por la anti IgM conjugada al oro coloidal, que al migrar por la membrana, alcanzan la zona de captura a una distancia de 15 mm del borde inferior, donde se fijó el antígeno formado por una mezcla de células completas de leptospiras, inactivadas con formaldehído: Ballum Castellón 3, Canicola H Utrecht IV, Icterohaemorrhagiae M20, Pomona Pomona, Sejroe M 84.^{4,6} La tirilla, posee además una zona control, ubicada aproximadamente a 20 mm del borde inferior de la membrana de nitrocelulosa, formada poli-L-lisina (Sigma, St Louis, EUA).

Cada determinación se realizó en un pocillo de placa de ELISA de fondo plano en el que se depositaron 130 µl del tampón de corrida. En la parte superior de la membrana microporosa (zona de conjugado); se depositó el volumen de conjugado

correspondiente en cada caso para obtener una concentración de 80 D.O (a 540 nm). Posteriormente se colocaron 10 µl del suero problema, 5 mm por debajo del conjugado (zona de la muestra) y se introdujo la tira perpendicularmente en el pocillo que contenía tampón de corrida. Se esperó 20 min para realizar la lectura visual con iluminación adecuada.^{7,8} Se tomó como resultado positivo la presencia de mancha rosada de forma circular en la zona de captura y como resultado negativo la ausencia de mancha rosada de forma circular en la zona de captura. Se tomó como no válida la prueba, de no aparecer la mancha rosada de forma circular en la zona de control.

Para evaluar el sistema, se utilizó el panel de sueros controles antes descrito y como técnica de referencia la MAT con leptospiras vivas. El procedimiento técnico se realizó según la guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Organización Mundial de la Salud, 2008.⁵

Se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel y los resultados se procesaron mediante el paquete estadístico Epidat versión 3.1 para calcular los porcentajes de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo, el índice de concordancia o validez, así como la razón de verosimilitud, estimándose para un intervalo de confianza (IC) del 95 %.

El 96 % (72/75) de las muestras reactivas a leptospirosis (grupo I) por MAT resultaron positivas por el sistema de inmunocromatografía de flujo lateral desarrollado; mientras que el 97,1 % (136/140) de las muestras sin anticuerpos a leptospiras (grupo II) resultaron negativas por el sistema de inmunocromatográfico. La tabla muestra los valores de los parámetros de desempeño del sistema evaluado, tomando como referencia los resultados obtenidos por la técnica MAT.

Tabla. Indicadores de desempeño del sistema inmunocromatográfico cubano

Parámetros	Valor (%)	IC (95 %)	
Sensibilidad	96,00	90,90	100,00
Especificidad	97,14	94,03	100,00
Índice de validez	96,74	94,14	99,35
Valor predictivo +	94,74	89,06	100,00
Valor predictivo -	97,84	95,07	100,00
LR +	33,60	12,78	88,37
LR -	0,04	0,01	0,12

Técnica tomada como referencia: MAT (Microaglutinación con antígenos vivos).
 +: positivo, - : negativo, LR-: razón de verosimilitud negativa, LR+: razón de verosimilitud positiva, IC: intervalo de confianza del 95 %.

No se obtuvieron reacciones cruzadas al evaluar el sistema inmunocromatográfico utilizando sueros controles, positivos a otras enfermedades infecciosas.

Este es el primer trabajo que evalúa un sistema basado en la inmunocromatografía de flujo lateral para la pesquisa rápida de leptospirosis humana, desarrollado en Cuba. Existen antecedentes cubanos para otras enfermedades infecciosas, como el de Mainet et al., quienes desarrollaron una prueba inmunocromatográfica con

avidina-biotina para la detección de anticuerpos contra el antígeno e de hepatitis B en plasma humano.⁸

El sistema evaluado obtuvo valores de sensibilidad y especificidad elevados, comparable a sistemas similares comerciales.⁹⁻¹³ Esto lo convierte en una posible herramienta, para la pesquisa de leptospirosis. Los valores predictivos positivo VPP y negativo VPN en el sistema evaluado, superan el 90 %, estos muestran la probabilidad de que un individuo para el que se haya obtenido un resultado positivo, sea efectivamente un enfermo (VPP) y la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo esté efectivamente libre de la enfermedad (VPN). Hallazgos similares se describen en la literatura consultada.⁸⁻¹³

La razón de verosimilitud negativa (RV-) debe ser cercana a cero por lo que el resultado del sistema evaluado (0,04) se considera satisfactorio. Obregón et al., en el 2011 reportan valores de RV- de 0,08; 0,13 y 0,12; para los sistemas inmunocromatográficos importados: Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow y SD Leptospira IgM/IgG, respectivamente.⁴

En el estudio publicado por Obregón et al., en el 2011 se obtienen valores de razón de verosimilitud positiva (RV+) de 9,29; 5,93 y 6,70 respectivamente para los sistemas inmunocromatográficos: Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow y SD Leptospira IgM/IgG.⁴ Todos los valores fueron inferiores al obtenido en este estudio para el sistema de flujo lateral evaluado.

El porcentaje de reacciones cruzadas descritas para estos sistemas serológicos rápidos suele ser bajo. Los trabajos revisados, identifican la presencia de reacciones cruzadas en los sueros obtenidos de algunos pacientes con sífilis, hepatitis B, HIV, así como en individuos con hantaviriosis y la enfermedad de Lyme. Estos hallazgos se describen en estudios realizados en poblaciones de diferentes regiones geográficas.⁹⁻¹³ El número de casos controles, fue inferior a los empleados en estudios precedentes.

El sistema propuesto podría constituir una herramienta útil para la pesquisa rápida de anticuerpos contra leptospirosis. Los indicadores de desempeño obtenidos son satisfactorios por lo que se recomienda continuar el proceso de evaluación con un mayor número de muestras para su futura validación e introducción en la red de laboratorios del Sistema Nacional de Salud en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 736-47.
2. Adler B, De la Peña A. Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology.* 2010; 140: 287-96.
3. Dassanayake DL, Wimalaratna H, Agampodi SB, Liyanapathirana VC, Piyarathna TA, Goonapienuwala BL. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis.* 2009; 9: 48-54.

4. Obregón AM, Fernández C, Martínez I, Llop A, Rodríguez I, Rodríguez J, et al. Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2011;63(3):239-45.
5. OMS. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Organización Mundial de la Salud;2008.
6. Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B, Balbis Y. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de leptospirosis en Cuba. Pan J Public Health. 2004;16(4):259-65.
7. 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 Immun. 2001;8:166-69.
8. Mainet GD, Galván CJA, Sorell GL, Torres CMB, Abdo CA, Castellano-Gutiérrez R, et al. Evaluación preliminar de un inmunoanálisis de un solo paso, cualitativo y rápido de troponina I cardiaca en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio. Invest Clin. 2004;45(3):221-41.
9. Gussenhoven GC, van der Hoorn AWG, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J Clin Microbiol. 1997;35:92-7.
10. Cohen AL, Dowell SF, Nisalak A, Mammen MP, Petkanchanapong W, Fisk TL. Rapid diagnostic tests for dengue and leptospirosis: antibody detection is insensitive at presentation. Trop Med Int Health. 2007;12:47-51.
11. Silpasakorn S, Waywa D, Hoontrakul S, Suttinont C, Losuwanaluk K, Suputtamongkol Y. Performance of *Leptospira* immunoglobulin M ELISA and rapid immunoglobulin G immunochromatographic assays for the diagnosis of leptospirosis. J Med Assoc Thai. 2011;94(1):203-6.
12. Dohe VB, Pol SS, Karmarkar AP, Bharadwaj RS. Two test strategy for diagnosis of Leptospirosis. Bombay Hosp J. 2009;51:18-21.
13. Goris MG, Leeflang MG, Loden M, Wagenaar JF, Klatser PR, Hartskeerl RA, et al. Prospective Evaluation of Three Rapid Diagnostic Tests for Diagnosis of Human Leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis 2013;7(7):2290.

Recibido: 14 de diciembre de 2014.

Aprobado: 20 de enero de 2015.

Dra. MSc. Yendrys Pérez Elías. Dirección: Calle 138 # 4504-A entre 45 y 47. San José de las Lajas. Mayabeque. Correo electrónico: cicdc@infomed.sld.cu
