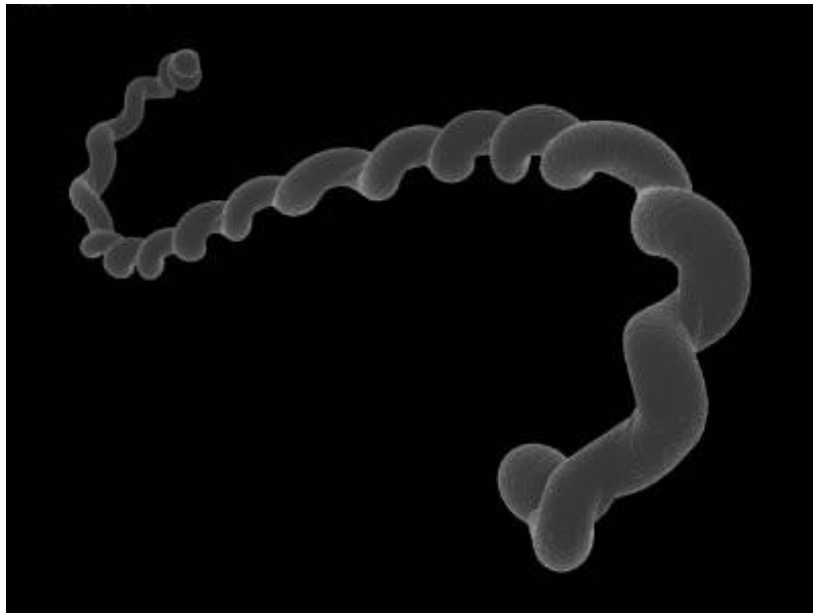


TESINA DE GRADO

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE**  
**LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO**  
**DE LEPTOSPIROSIS HUMANA**

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA



Extraído de <http://www.leptospirosis.org>

Juan Pablo Geymonat Ferreira

Tutor de tesis: Profesor Dr. Felipe Schelotto

Departamento de Bacteriología y Virología

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

UdelaR

**ÍNDICE**

	Página
<b>I. Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>II. Introducción.....</b>	<b>4</b>
a. Agente etiológico.....	4
b. Epidemiología y transmisión.....	16
c. La enfermedad. Patogenia.....	18
d. Inmunidad.....	22
e. Tratamiento.....	24
f. Pronóstico.....	25
g. Prevención y control.....	25
h. Diagnóstico.....	26
i. Situación en Uruguay.....	29
<b>III. Objetivos</b>	
a. Objetivos generales.....	30
b. Objetivos específicos.....	30
<b>IV. Materiales y métodos.....</b>	<b>31</b>
a. Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente.....	32
b. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.....	33
c. Medio de cultivo EMJH.....	34
d. Tests estadísticos.....	35
<b>V. Resultados.....</b>	<b>36</b>
<b>VI. Discusión y conclusión.....</b>	<b>41</b>
<b>VII. Agradecimientos.....</b>	<b>44</b>
<b>VIII. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>45</b>

## **RESUMEN**

La leptospirosis es una enfermedad causada por espiroquetas del género *Leptospira* y presenta manifestaciones clínicas comunes a varias dolencias febriles como gripe, hantaviriosis, dengue. Esto determina que su diagnóstico clínico y de laboratorio resulte difícil. La confirmación de la enfermedad o de la infección está basada en tests serológicos que demuestran el aumento de anticuerpos séricos en muestras pareadas o el aislamiento de la bacteria a partir de muestras clínicas. Los objetivos de este trabajo son el desarrollo y evaluación de dos pruebas rápidas de diagnóstico para la leptospirosis humana. Se desarrolló y evaluó una reacción de aglutinación en lámina utilizando un antígeno termorresistente preparado a partir de las cepas de leptospirosis patogénicas de mayor circulación regional. También se desarrolló y evaluó una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) sensibilizada con un antígeno preparado a partir de las cepas de mayor distribución local. Dichas pruebas se ejecutaron sobre sueros que llegaron para su confirmación por la técnica de aglutinación macroscópica (MAT) en el servicio de Leptospirosis del Departamento de Bacteriología y Virología y sobre sueros de pacientes con otras patologías. Se determinó la sensibilidad (95%) y especificidad (95,83%) de la prueba de ELISA, así como también la sensibilidad (67,72%) y especificidad (85,38%) de la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente. Como conclusión los resultados obtenidos indican que la prueba de ELISA puede ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis y la prueba de aglutinación macroscópica puede ser de utilidad como prueba de tamizaje para situaciones donde se deba manejar gran cantidad de muestras.

**Palabras clave:** Leptospirosis; macroaglutinación; ELISA; antígeno termorresistente.

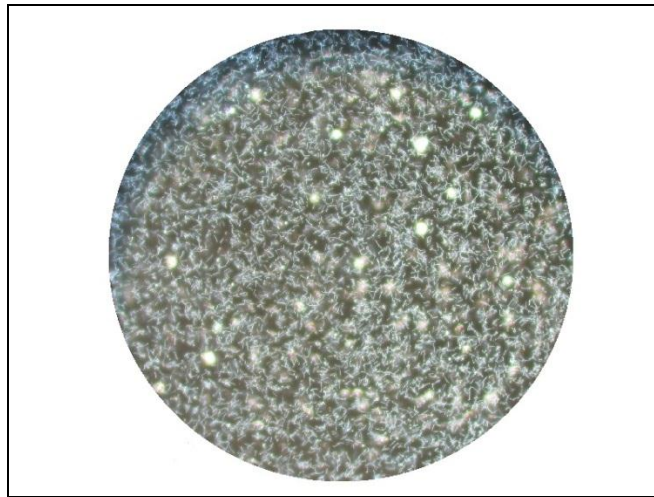
## **INTRODUCCIÓN**

La leptospirosis humana es una enfermedad estacional, re-emergente, con alta prevalencia en países con clima cálido o templado y alto índice de humedad (1). Es considerada una de las zoonosis con mayor distribución mundial (2). La infección se puede presentar de forma asintomática, dar lugar a una enfermedad sub-clínica con manifestaciones leves, o puede ser de forma muy grave con alta letalidad (1). Fue primariamente descrita por Weil en 1886, del cual lleva su nombre la forma icterica grave. En 1907 Stimpson pudo visualizar el microorganismo en un corte de tejido renal, al cual luego de aislarlo lo nombró “Spirocheta interrogans” por su forma de signo de interrogación. No obstante, recién en la segunda década del siglo XX, Inada e Ido en Japón reconocieron a las leptospiras como el agente causal (3).

## **EL AGENTE ETIOLÓGICO**

Los microorganismos causales son especies patogénicas pertenecientes al género *Leptospira*, del griego *leptos*: delgado; y del latín *spira*: espiral (Phylum *Spirochaetes*, Clase *Spirochaetes*, Orden *Spirochaetales*, Familia *Leptospiraceae*). Estas bacterias son de forma espirilar, Gram negativas, móviles. Poseen un diámetro de 0,1µm y una longitud de 6 a 20µm lo cual hace prácticamente imposible su correcta visualización al microscopio de campo claro. Son observables con tinciones de Giemsa, argénticas, negativas e inmunotinciones. No se colorean bien con la tinción de Gram. Debido a su gran parecido morfológico, no se puede discriminar entre las distintas especies de leptospiras (1).

El método habitual de observación de las leptospiras emplea el microscopio de campo oscuro, el cual posee un mejor poder de resolución que el microscopio de campo claro permitiendo la visualización de las células bacterianas extremadamente delgadas (Ilustración 1). La diferencia consiste en que posee un condensador que admite solamente el pasaje de la luz reflejada y oblicua hacia el sistema de espejos, excluyendo la luz transmitida. El objetivo recibe la luz refractada o dispersada por la muestra. Los microorganismos se observan brillantes sobre un fondo oscuro, impidiendo la visualización estructural interna de los mismos (4).



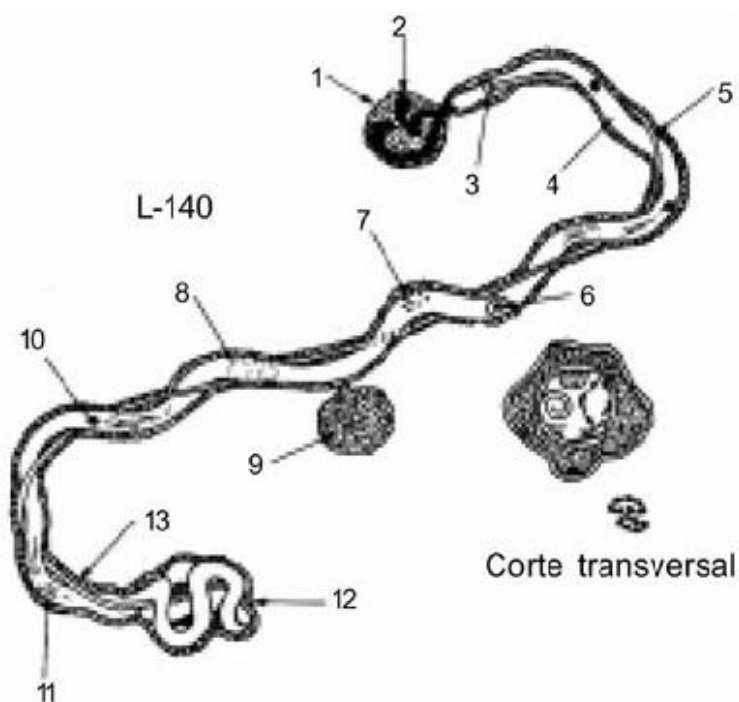
**Ilustración 1.-** Observación de leptospiras con microscopio de campo oscuro. Aumento de 200x.

En un principio *Leptospira* se clasificaba en dos especies según propiedades fenotípicas, relaciones serológicas y patogenicidad. Las cepas patogénicas pertenecían a la especie *Leptospira interrogans* y las cepas saprófitas de vida libre a la especie *Leptospira biflexa*. Ambas especies eran divididas en serovares según procedimientos serológicos de aglutinaciones con sueros hiperinmunes. Sobre esta base se clasificaron más de 65 serovares (organizados en 38 serogrupos) en la especie *L. biflexa* y más de 250 serovares (organizados en 25 serogrupos) en la especie *L. interrogans*. A su vez los

serovares que estaban relacionados antigénicamente se agrupaban en serogrupos (4-6). Si bien se supone que las leptospiras saprófitas no causan enfermedad, esporádicamente es posible aislarlas de cultivos provenientes de materiales clínicos, siendo discutible el significado de su presencia (7).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares se introdujo la clasificación genómica del género, basada en la homología del ADN. El método de referencia para dicha clasificación es la hibridación cuantitativa ADN-ADN. Una genespecie es un grupo de serovares cuyos ADNs están relacionados (tienen homología) en 70% o más a una temperatura de re-asociación óptima de 55°C, están relacionados 60% o más a una temperatura de re-asociación rigurosa de 70°C, y en la cual los ADNs exhiben 5% o menos de divergencia (8, 9). En base a esta clasificación se han descrito al menos 21 genespecies, sin tener en cuenta su patogenicidad. Debido a que un mismo serovar presenta heterogeneidad genética, puede estar presente en más de una genespecie, por lo que ambos sistemas de clasificación no coinciden, lo cual da lugar a confusiones. Desde el punto de vista epidemiológico y clínico el concepto de serovar sigue siendo el más útil (1, 3).

Presentan una membrana externa también llamada envoltura, compuesta de 3-5 capas, la cual puede ser removida con relativa facilidad incluso con el manejo de los cultivos, por ejemplo el repique de cultivos y agitaciones leves. Está compuesta de lípidos, proteínas y lipopolisacárido (LPS). Por dentro de la envoltura se encuentra el cilindro protoplásmico helicoidal, recubierto con una fina capa de peptidoglicano y una membrana citoplasmática. El contenido citoplasmático incluye material genético, mesosomas, ribosomas y cuerpos de inclusión. La superficie expuesta de la célula posee una carga neta negativa (7, 10).

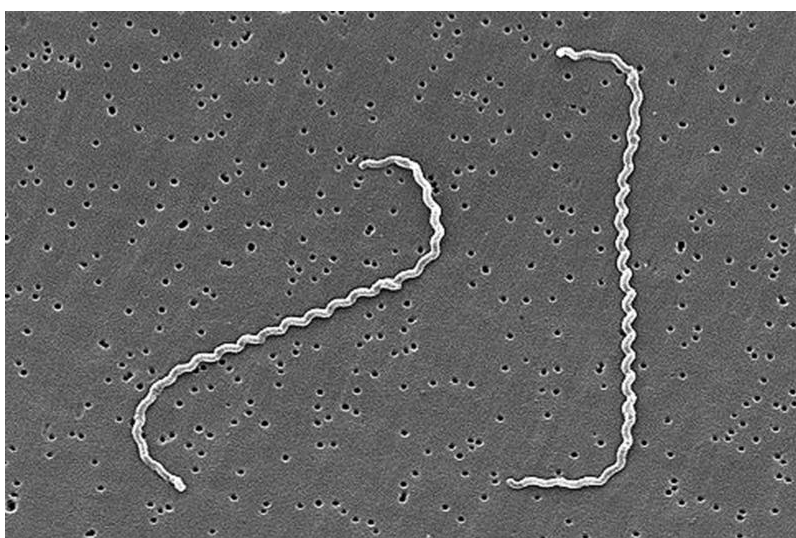


**Ilustración 2.-** Esquema ultraestructural de *Leptospira*: Formación terminal (1), apéndices terminales (2), gránulo basal (3), cilindro citoplasmático (4), filamentos axiales (5), estructura lamelar (6), inclusiones electrondensas (7 y 10), inclusiones electrondifusas (8), formaciones globosas (9), nucleoide-ADN (11), quiste (12) y membrana externa (13). Corte transversal en marco. Tomado de: De Katz KN, Ananhin, VV. *Leptospirosis humana y animal*. Moscú: Ed. Medicina; 1971.

Tienen dos filamentos periplásmicos axiales (también llamados fibrillas axiales, endoflagelos o flagelos) insertados uno en cada zona subterminal de los extremos. Se encuentran extendidos hacia el centro del cuerpo celular pero no se superponen (Ilustración 2). El ancho de los endoflagelos es aproximadamente 15-18 nm y el largo es variable, en promedio la mitad del cuerpo celular. Son química y estructuralmente similares a los flagelos de las bacterias bacilares, salvo que no poseen contacto con el medio externo. El motor flagelar es impulsado por una fuerza protón-motriz (11, 12). FlaA es la proteína de envoltura del endoflagelo y FlaB es la proteína del core flagelar.

El cuerpo celular helicoidal tiene un giro hacia la derecha; sus extremos pueden tener forma de gancho o espiral (12-14). La forma general de espiral finamente enrollado

parece ser principalmente atribuida a la capa de peptidoglicano más que al flagelo (15). Cuando la bacteria está fijada, muerta o en reposo ambos extremos tienen forma de gancho o de espiral (Ilustración 3). La rotación del endoflagelo induce distorsiones y la contra-rotación del cuerpo bacteriano, las cuales originan el impulso del movimiento. Si una espiroqueta se está trasladando el extremo anterior tiene forma de espiral y el extremo posterior, de gancho. La rotación del flagelo anterior causa la formación de una ola giratoria con forma de espiral. El cuerpo celular dextrógiro concomitantemente gira en torno a los filamentos en el sentido contrario, lo que permite que la célula se desplace como enroscándose. Las células cambian rápidamente de dirección deteniéndose un momento, en el cual los extremos alternan formas (12-14). La forma celular característica y su aparato de movilidad, le otorgan una propiedad extra para lograr una infección efectiva (15).



**Ilustración 3.-** *Leptospira interrogans* cepa RGA, vista al microscopio electrónico de barrido. Se observa el cuerpo celular dextrógiro y los extremos con forma de gancho.

En medios líquidos, giran sobre su eje longitudinal rápidamente y pueden moverse para un lado y otro en ambas direcciones con movimientos de traslación, en línea recta o amplios arcos. En medios comunes y a temperatura ambiente pueden trasladarse



rápidamente alrededor de 20µm en 2-3 segundos. La movilidad parece ser mayor en cultivos recién aislados crecidos a 37°C que en cultivos adaptados en el laboratorio a 30°C. Presentan quimiotaxis hacia la hemoglobina (7).

La división celular se produce cuando la célula bacteriana crece hasta su máxima longitud, momento en el cual aparece una constricción en el cilindro protoplásmico que se extiende hasta cerrar los nuevos extremos de cada célula hija (7).

Las leptospiras saprófitas pueden crecer a 11-13°C, siendo su temperatura óptima de desarrollo 28-30°C. Las patógenas no pueden crecer a 11-13°C, tienen la misma temperatura óptima de crecimiento que las saprófitas y pueden crecer a 37°C. El tiempo de duplicación es de 6-8 horas (7).

Es probable que la amplia distribución de especies de leptospiras refleje la capacidad de sobrevivir en diversas condiciones ambientales, en combinación con la adaptación genética, que se refleja en la plasticidad del genoma (16).

Comúnmente los cultivos de uso rutinario se realizan en tubos con medios líquidos; para el aislamiento y mantenimiento de las cepas se utilizan medios semisólidos con agar. Los medios de cultivos líquidos de uso más habitual son Stuart, EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) o Korthoff, y el semisólido Fletcher.

Al cabo de unos días se pueden observar uno o varios discos finos de crecimiento (llamados anillos de *Dinger*) justo por debajo de la superficie (7). Se ha reportado un caso en el cual se han recuperado leptospiras viables desde un cultivo en medio semisólido de 8 años de antigüedad. Los cultivos para respaldo del cepario y para usar en la MAT se mantienen en oscuridad.

Las bacterias del género *Leptospira* son aerobias estrictas, con un pH óptimo de crecimiento entre 7,2 y 7,6 (5). Desde el punto de vista fisiológico son quimioheterótrofas (15). Crecen en medios líquidos o semi-sólidos con agregado de suero de conejo o albúmina bovina, vitaminas B2 y B12, además de ácidos grasos insaturados de cadena larga, los cuales son su principal fuente de carbono y energía. Generan ATP a través de fosforilación oxidativa. Debido a la toxicidad de los ácidos grasos, éstos deben suministrarse unidos a albúmina o en una forma esterificada no tóxica. Pueden utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno. Los carbohidratos no son una fuente adecuada de energía, y los aminoácidos no son utilizados como fuente de nitrógeno. Ya que *Leptospira* tampoco puede utilizar los carbohidratos como una fuente de carbono, las reacciones anapleróticas son fundamentales para la gluconeogénesis. Pueden llevar a cabo la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, ya que poseen los genes que codifican completamente estos sistemas metabólicos (7, 10, 15, 17). Tanto el dióxido de carbono como el piruvato pueden suministrarse en bajas concentraciones para favorecer el inicio del crecimiento de algunos serovares. Utilizan bases purínicas exógenas, pero no pirimidínicas para incorporar en sus ácidos nucleicos. Esto último se aprovecha en la utilización del antibacteriano 5-fluorouracilo, análogo de pirimidinas, para el aislamiento en medios selectivos a partir de muestras contaminadas (7, 10, 17). Esto es posible ya que los microorganismos contaminantes incorporan el 5-fluorouracilo, el cual bloquea la síntesis de los distintos tipos de moléculas de ARN e induce finalmente la muerte celular. Son catalasa, oxidasa y peroxidasa positivas (18).

Fuera del huésped la supervivencia se beneficia por humedad adecuada, temperaturas de 22°C, pH neutro o levemente alcalino, concentración salina apropiada, baja incidencia de radiación ultravioleta, escasa flora competitiva y oxígeno. Poseen susceptibilidad a la

mayoría de los agentes antibióticos, antisépticos y detergentes. No sobreviven en condiciones de pH ácido, de desecación y altas temperaturas (1).

El genoma de *Leptospira interrogans*, de 4.691.184 pares de bases, (4.768 genes aproximadamente), está compuesto por dos cromosomas circulares, uno mayor llamado CI (4.332.241 pb.) y otro menor llamado CII (358.943 pb.). Tiene 4.727 secuencias codificadoras de proteínas, distribuidas 4.360 en CI y 367 en CII. La mayoría de los genes necesarios para el crecimiento y viabilidad están localizados en CI, pero algunos genes esenciales están en CII, lo que indicaría que este último no se originó por transferencia lateral. Poseen copias de más de 30 elementos repetitivos de ADN, incluyendo miembros de la familia de secuencias de inserción IS1500 e IS1501. Contienen 37 genes para ARNs de transferencia, dos genes para ARN ribosomal 16S, uno para ARN ribosomal 5S (la especie saprofita - según la definición clásica - *Leptospira biflexa* tiene dos) y dos para ARN ribosomal 23S (19).

El género *Leptospira* posee un contenido de Guanina más Citosina (G+C) de 35-41 mol%, dependiendo de la especie. Se cree que las leptospirosis se desarrollaron muy temprano en la evolución de las espiroquetas, permitiendo un largo período de tiempo para su continua adaptación y cambio (7). Se cree en la posibilidad de que la transferencia génica lateral, operando en paralelo con eventos estándares de evolución génica, hayan contribuido a la emergencia de un importante patógeno humano desde una bacteria ambiental. Se han atribuido funciones biológicas a cerca del 44% de las secuencias codificadoras de proteínas, mientras que un 15% codifican proteínas de función desconocida o son similares a secuencias sin asignar en otros organismos y un 41% no presentan homología con genes codificantes de proteínas en otros organismos (15).

El lipopolisacárido (LPS) del género *Leptospira* es una estructura única de relativa baja toxicidad, que activa a los macrófagos de una manera particular (15). Es el principal antígeno de superficie y de protección, siendo el componente carbohidrato del mismo el que confiere -a través de la respuesta inmune adquirida- la protección específica de serovar. También dicho componente carbohidrato es la base de la clasificación serológica en serovares. Los azúcares que han sido encontrados como parte de él son arabinosa, xilosa, ramnosa, fucosa, ribosa, glucosa, galactosa, manosa, galactosamina, glucosamina, manosamina, glucosa-6-fosfato, n-acetil glucosamina. La distribución y proporción de éstos en el total del contenido glucídico varían entre los serovares. La estructura básica (lípidos A, polisacárido core y antígeno O) del LPS de *Leptospira* es similar a la de otras bacterias Gram negativas. Sin embargo, existen diferencias químicas en sus constituyentes con los de otras bacterias, así como diferencias bioquímicas, físicas y biológicas (7). La peculiaridad de este LPS es que además de necesitar la proteína CD14, usa TLR2 (en lugar de TLR4 como otras bacterias Gram negativas) para estimular la producción del factor de necrosis tumoral (TNF). TLR2 es un receptor transmembrana de lipoproteínas. El lípidos A presenta un esqueleto disacárido hexa-acetilado (20). El LPS de *Leptospira* tiene sustituidos los ácidos mirísticos y 3-hidroxi-mirístico por ácido pentadecanoico. Este último está posiblemente implicado en la especificidad de las interacciones entre el LPS y los TLR celulares (17).

Todos los azúcares que se incorporan al LPS deben ser sintetizados *de novo*. El peso del LPS es un 3-5% del peso seco total celular. Su composición química general es aproximadamente 5,4% proteína, 33,3% lípidos, 32% pentosas, 12% hexosas, 4,5% heptosas, 1% aminoazúcares, 0,45% ácido 2-ceto-3-deoxiónico y 0,4% fósforo. El tratamiento del LPS con ácido sulfúrico 0,2M produce la liberación del lípidos A. Los ácidos 3-hidroxi-dodecanoico (3-hidroxi-laúrico), hexadecanoico (palmítico), y

octadecanoico (oleico) son los principales ácidos grasos del lípido A. Los ácidos mirístico y 3-hidroximirístico no se encuentran (21). En la observación de la ultraestructura al microscopio electrónico se puede ver el LPS en forma de cintas. Presenta un pico de absorción en el ultravioleta a 192nm (22). Es de 12 a 20 veces menos tóxico que el LPS de otros Gram negativos. Es altamente inmunogénico, y en ratones se observó que es un inductor de la proliferación de linfocitos B, pero no de T o NK (17).

El peptidoglicano es una capa rígida por debajo de la membrana externa. Su función es mantener la estructura y forma bacteriana. Se encuentra formado por aminoazúcares N-acetilglucosamina, N-acetilmurámico y 4-O-metilmanosa, y por aminoácidos tales como L-alanina, D-alanina, D-glutámico, lisina o ácido meso-diaminopimélico. El peptidoglicano es responsable de la rigidez de la pared celular. Dicha rigidez está dada por los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que unen los aminoazúcares entre sí en las cadenas del glicano, y a través del entrecruzamiento por péptidos que ligan las cadenas de aminoazúcares (7, 17, 23). Bajas concentraciones de etanol, detergentes o proteasas como la tripsina, remueven rápidamente la membrana exterior, hasta desenrollar gradualmente la hélice, lo cual revela un tubo plano y vacío, que retiene varios antígenos y contiene ácido murámico. El aminoácido involucrado en el entrecruzamiento es el ácido diaminopimélico (7). La estructura del peptidoglicano es del tipo pimélico A<sub>2</sub> (23). Es capaz de activar el complemento humano a muy bajas concentraciones, comparado a otros microorganismos, pero debido a que las leptospiras son resistentes al complemento, la activación del mismo actuaría como un factor indirecto en la estimulación de células fagocíticas. También se ha observado una estimulación directa de células polimorfonucleares (PMN), monocitos y producción de citoquinas, así como un efecto mitógeno en células mononucleares periféricas. Estos

estímulos directos e indirectos en los leucocitos podrían amplificar el proceso de fagocitosis. Es capaz de disparar un efecto proadhesivo en células endoteliales hacia los PMN, sugiriendo que estaría involucrado también en la vasculitis generalizada (24).

Las leptospiras poseen una baja densidad de proteínas de membrana externa (OMPs) comparado con otras bacterias Gram negativas, lo cual parece correlacionarse con la virulencia. Estas proteínas podrían participar en la patogenia en diferentes modalidades: actuando como adhesinas, porinas, receptores para moléculas solubles, blancos de inmunoglobulinas o de sustancias bactericidas (17). Las OMPs se encuentran ancladas a la membrana externa a través de motivos lipídicos en el extremo N-terminal. Al subconjunto de proteínas de membrana externa, expuestas en la superficie de una célula bacteriana se le llama *surfaceome*. La expresión diferencial de algunas OMPs varía dependiendo de diferentes condiciones, probablemente debido a la adaptación del microorganismo al ambiente (1, 16, 25).

Las OMPs leptospíricas fueron divididas en tres clases. La primera clase está compuesta por las lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL36, LipL48 y LipL41. LipL32 es una proteína de 32KDa con actividad hemolisina. Las proteínas LipL41, LipL21 y LipL32 son expresadas tanto *in vivo* como *in vitro*, pero solamente detectadas en serovares patógenos. LipL36 está anclada en la cara interna de la membrana externa y solamente se expresa *in vitro* a 30°C, no en tejidos infectados ni en cultivos incubados a 37°C. La segunda clase está compuesta por la proteína transmembrana OmpL1 y la tercera clase por la proteína periférica LipL45. Esta última aprovecha la vía de secreción de lipoproteínas para lanzarse a sí misma hacia la membrana interna y externa (1, 16, 25). Recientemente fue descrita una cuarta clase de proteínas de membranas, constituida por la familia Lig (“leptospiral Ig-like proteins”).

Las tres principales proteínas expuestas, en orden de relativa abundancia son LipL32, LipL21 y LipL41. LipL32 es una de las más expresadas y su secuencia aminoacídica es muy conservada. A pesar de su gran exposición en la superficie se cree que es de difícil acceso a moléculas grandes, tales como anticuerpos. Esto se debe a que los epítopes de LipL32 se encuentran ocultos estéricamente por las cadenas laterales de carbohidratos del LPS. Las lipoproteínas pueden hallarse tanto en la membrana citoplasmática como en la membrana externa o en ambas (26, 27).

Una familia de proteínas superficiales de las leptospiras presenta varios dominios del tipo inmunoglobulina, por lo cual se les llama proteínas Lig. Los principales miembros de esta familia son LigA y LigB. Se cree que estas lipoproteínas están ancladas en la membrana externa a través de un residuo N-terminal de cisteína que se adhiere a los ácidos grasos, y no a través de un dominio transmembrana. La pérdida tanto de las proteínas Lig, como de la expresión del transcripto ARN *lig*, está relacionada con la pérdida de virulencia durante la atenuación en cultivo de cepas patogénicas (27, 28). Sus principales funciones son de adhesión e invasión celular. Pertenecen a la superfamilia Big (“Bacterial immunoglobulin-like”) (28).

OmpL1 es un oligómero que se encuentra expuesto en la superficie y tiene una función termomodificable de porina. Junto con LipL32 y LipL41 son los antígenos más importantes en la respuesta inmune de anticuerpos (25, 27).

Las adhesinas presentes en las superficies bacterianas son proteínas, glicoconjugados y lípidos que inician la colonización a través de la unión de las bacterias a las superficies de las células del hospedero, logrando que las defensas físicas de éste no puedan removerlas (27).

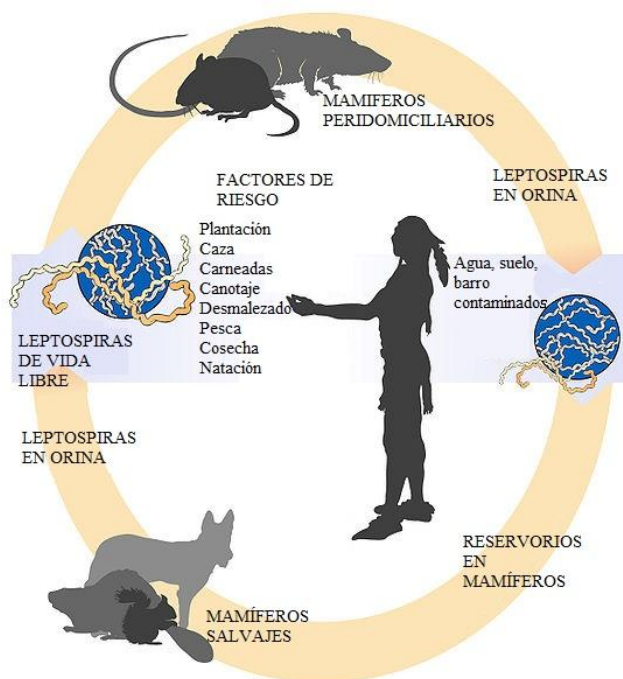
Las OMPs tienen un rol principal en la activación de la respuesta inmune innata, vía el receptor CD14 y el receptor de tipo Toll 2 (TLR2). La inflamación tisular en los sitios de infección es una característica común en la manifestación de enfermedades causadas por espiroquetas. Dicha inflamación es debida tanto a la respuesta inmune innata como a la adquirida. La respuesta inmune innata proporciona una respuesta rápida a la variedad de productos bacterianos (LPS, lipoproteínas, peptidoglicano, y ADN) (27).

Estas bacterias presentan fosfolipasas, lipasas, hemolisinas las cuales son exotoxinas, enzimas citolíticas o proteínas que se unen a receptores, que alteran la función o producen citotoxicidad en células eucariotas. Algunas cepas patogénicas secretan esfingomielinasas tipo C y hemolisinas formadoras de poros (28, 29).

## **EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN**

El hombre es un huésped accidental e incidental (terminal, no crónico) que incorpora la bacteria en forma indirecta a través de agua contaminada, suelos, vegetación o lodo en un ambiente húmedo, o por infección directa con orina, carcasas frescas u órganos contaminados de animales. También se puede contraer la infección luego de la ingesta de alimentos y agua contaminada (Ilustración 4) (3, 30).





**Ilustración 4.-** Vías de transmisión de la leptospirosis

Algunos nombres atribuidos a la enfermedad que reflejan el sitio y condiciones de la infección han sido: fiebre de los campos de arroz, enfermedad de los cortadores de caña, enfermedad de la porqueriza, fiebre del tambo, fiebre del barro (3).

El reservorio está constituido por animales salvajes o domésticos infectados crónicamente (huéspedes naturales, especialmente roedores, bovinos, cerdos, equinos, perros), en los cuales las bacterias se alojan principalmente en los túbulos renales proximales. Desde los riñones las leptospiras son excretadas en la orina contaminando suelos, lodo y arroyos (1, 3, 7, 31).

Las infecciones pueden ser adquiridas a través de actividades laborales, profesionales o de recreación (3, 5). Tamberos, trabajadores rurales en general, veterinarios, carniceros, lecheros, trabajadores en frigoríficos, hurgadores y cazadores son personas en riesgo de contraerla (32). Se han reportado muy pocos casos de transmisión entre humanos (3, 31). La incidencia está influida por factores ambientales, socioculturales, ocupacionales

y conductuales, afectando principalmente zonas tropicales y subtropicales con bajos recursos. Se estima que alrededor de 500.000 casos de leptospirosis ocurren anualmente en el mundo (30).

El pico de incidencia ocurre en las temporadas de lluvia en zonas de clima tropical y en el verano y principios de otoño en zonas de clima templado. Los brotes epidémicos se observan generalmente después de inundaciones o lluvias intensas (32).

### **LA ENFERMEDAD. PATOGENIA.**

El pequeño diámetro de *Leptospira* y su gran movilidad les permiten entrar a través de pequeñas abrasiones, de piel humedecida, de conjuntiva, por ingestión a través de las mucosas, o por inhalación de aerosoles de orina. Se diseminan de manera inmediata desde el sitio de entrada, vía linfáticos hacia la sangre, donde circulan a todos los tejidos y órganos. Las leptospiras que son avirulentas y no patogénicas son eliminadas rápidamente en los minutos siguientes por la fagocitosis del sistema fagocítico-mononuclear. Se encuentran primero sobre todo en los pulmones, luego en el hígado y el bazo (7).

El período de incubación habitual es de 5 a 14 días, pudiendo ser tan corto como de 2 días y tan largo como 30 días. La mayoría de las infecciones transcurren de manera subclínica o leve con manifestaciones inespecíficas y comienzo repentino, como fiebre aguda (38-39°C), tos, hiperemia conjuntival, escalofríos, dolor abdominal, astenia, mialgias, cefaleas intensas, náuseas, vómitos, diarrea, fotofobia (Ilustración 5) (3, 7, 31, 32). En esta fase, debido a que los síntomas son inespecíficos de la enfermedad,

generalmente no se realiza el diagnóstico de leptospirosis, lo que contribuye a una subestimación de la enfermedad (33).



**Ilustración 5.-** Síntomas de la leptospirosis

En la forma leve los síntomas iniciales son seguidos por una remisión transitoria de 3 a 5 días, que puede infrecuentemente desencadenar en una exacerbación e incluir meningitis aséptica (caracterizada por la rigidez de nuca), falla renal, dolor abdominal y torácico. Los síntomas iniciales coinciden con la fase septicémica o leptospirémica, que dura de uno a varios días. Luego el paciente se siente mejor, y la recuperación es usualmente completa en 3 a 6 semanas pero puede persistir debilidad, cansancio y cambios neuropsiquiátricos (cambio de humor, parestias, parálisis, cefaleas y depresión) por semanas o meses (3, 7).

En las formas más severas (también llamada enfermedad de Weil), la fase inicial es más prolongada y bifásica. La fiebre desaparece luego de 4 a 7 días, seguida de 1 a 3 días de aparente recuperación, sin fiebre ni síntomas. Entonces la fiebre retorna, en la fase inmune, alcanzando 40°C, acompañada de cefaleas más intensas, rigores, escalofríos y postración. La distinción entre ambas fases es a veces no tan clara, fundiéndose en una

única y continua etapa. Se suman a los dolores en el cuello, abdomen y miembros, severos dolores musculares, especialmente en pantorrillas, muslos y espalda. Se producen sangrados nasales. Aparecen síntomas y signos de fallo renal y hepático, conduciendo a diferentes grados de uremia, ictericia y sangrados externos e internos. Las hemorragias pueden ocurrir casi en cualquier lado. La hepatomegalia y esplenomegalia son poco comunes: menos del 10% de los pacientes las desarrollan. Pueden ocurrir vómitos y tanto diarrea como constipación, dolor de garganta y tos seca. La hemoptisis, la afectación respiratoria, así como la meningitis aséptica también pueden ser vistas. La enfermedad varía en severidad dependiendo del serovar infectante y del estado de salud general del paciente (3, 7, 32).

Los pacientes que sobreviven a la falla renal y del miocardio, usualmente se recuperan completamente en 6 a 12 semanas. Los casos fatales se deben principalmente a falla renal severa, y en los que la superan, a la falla miocárdica irreversible (3, 7).

En el momento de establecimiento de la enfermedad no es posible determinar si se trata de leptospirosis leve o severa. La gran cantidad de casos seropositivos que desconocieron tener la enfermedad en poblaciones con alta prevalencia demuestra que las infecciones subclínicas e inaparentes son comunes.

La leptospirosis puede conducir a una Infección Respiratoria Aguda Grave (IRAG), y por lo tanto se debe realizar el diagnóstico diferencial con dengue, hantavirosis y gripe entre otros, ya que las manifestaciones clínicas pueden ser muy similares, aunque el manejo individual y colectivo es muy diferente.

Los seres humanos no son nunca portadores crónicos, pero sufren de infecciones agudas a veces con secuelas de larga duración. En animales que no mueren de leptospirosis, las leptospiras pueden sobrevivir aún después del *clearance* sanguíneo en sitios

inmunológicamente privilegiados, como los túbulos renales proximales, cerebro y cámara anterior de los ojos. Pueden ocurrir uveítis o iridociclítis como presentaciones tardías de la enfermedad (3). En los túbulos renales proximales pueden persistir por semanas hasta años, a veces por el resto de la vida del animal portador, ocasionando que la orina excretada esté contaminada de forma continua o intermitente (7).

Aunque los mecanismos por los cuales las leptospiras causan daño no están completamente estudiados, los factores de virulencia potenciales incluyen mecanismos inmunes, producción de toxinas, adhesinas y otras proteínas de superficie. La susceptibilidad humana puede estar relacionada con el bajo nivel de reconocimiento del LPS por parte del sistema inmune innato. El principal daño es el causado al endotelio de los vasos sanguíneos pequeños por las toxinas hemolíticas (que actúan como esfingomielinasas, fosfolipasas y proteínas formadoras de poros). El efecto inmediato es el debilitamiento de las uniones intercelulares, permitiendo que los fluidos y las leptospiras migren en el espacio extravascular, seguidos por eritrocitos. Los efectos secundarios son isquemia, anoxia y aumento de la presión en los tejidos, resultando en desintegración funcional celular y muerte. Toda esta cadena de sucesos produce la pérdida de la integridad funcional y estructural de tejidos y órganos, con las manifestaciones clínicas correspondientes y los cambios macroscópicos, microscópicos y químicos asociados (7, 32).

Se observan lesiones en riñones, pulmones, hígado, cerebro, placenta y músculos, las cuales dan lugar a falla renal, hemorragia pulmonar, hemoptisis y síndrome de distrés respiratorio, falla hepática e ictericia, encefalopatía y meningitis, óbito o parto prematuro, miocarditis y debilidad muscular aguda respectivamente (3, 7, 17).

En el laboratorio se pueden encontrar niveles elevados de velocidad de eritrosedimentación, trombocitopenia, leucocitosis, hiperbilirrubinemia, y tasas elevadas de creatinina sérica, creatina fosfoquinasa y amilasa sérica (3).

La leptospirosis en las embarazadas puede afectar al feto sea por su efecto patológico y febril en la madre o por infección primaria del feto (leptospirosis congénita) con invasión de leptospiras desde la circulación materna y tejidos. En el primer caso los efectos no son específicos y pueden conducir a retardo, isquemia fetal, de la placenta o muerte. En el segundo caso los efectos patológicos son similares a los de los adultos (3, 7).

## **INMUNIDAD**

El mecanismo primordial de inmunidad es el humoral. Niveles muy bajos de anticuerpos son protectores. Dicha inmunidad es específica y protectora del serovar, o en serovares con antígenos aglutinantes muy parecidos, pero no contra serovares no relacionados. No ocurren reinfecciones con el mismo serovar: las segundas infecciones se producen con diferentes serovares. Se han reportado infecciones simultáneas con varios serovares (3, 7).

El LPS es el antígeno leptospírico más importante contra el cual se monta la respuesta inmune, más específicamente la porción polisacáridica del mismo. Los anticuerpos contra esta porción del LPS median la resistencia a una reinfección en pacientes y animales que han sido infectados o inmunizados. Los anticuerpos maternos son pasados de forma pasiva al feto: IgG transplacentaria e IgA del calostro (7).

La resistencia a una primoinfección en un hospedero está mediada por mecanismos no específicos y por inmunoglobulinas. La inmunidad puede ser artificialmente conferida por antisuero o por anticuerpos monoclonales adecuados (7).

Los anticuerpos se desarrollan dentro de los 2 a 10 días de la infección, dependiendo de la especie, del estado inmunológico y del tamaño del inóculo (7). Los anticuerpos IgM pueden detectarse por meses, inclusive años aunque con bajos títulos. Generalmente son responsables de las reacciones cruzadas observadas con frecuencia en la fase inicial de la enfermedad; sin embargo con el proceso de “maduración” de la respuesta inmune, tienden a desaparecer gradualmente (3).

Las leptospiras son patógenos extracelulares, que son sólo observadas transitoriamente en el interior celular durante la translocación de las barreras celulares epiteliales. El *clearance* inmunológico es mediado por el sistema del complemento y los anticuerpos, los cuales directamente matan las espiroquetas o las señalizan para la opsonización. La presencia de antígenos superficiales causa la estimulación e identificación por parte del sistema inmune, logrando una respuesta protectora humoral. Sin embargo se ha planteado que durante la infección se produce en la bacteria una regulación hacia abajo de la expresión de los determinantes antigénicos (27).

Las vacunas humanas no aportan una protección de largo plazo y no proveen de una inmunidad cruzada con otros serovares que no estén presentes en dicha vacuna. Se usan principalmente con fines preventivos para disminuir el riesgo de las exposiciones ocupacionales (30). Están compuestas por una suspensión de leptospiras muertas (3).

## **TRATAMIENTO**

En la leptospirosis leve el tratamiento es sintomático, según la naturaleza y severidad de las manifestaciones. La forma severa requiere de cuidados intensivos y tratamiento sintomático urgente (7).

Nunca se debe esperar al resultado confirmatorio del laboratorio para empezar con el tratamiento, debido a que el lapso para que sean positivas las pruebas puede ser demasiado largo (3).

Las leptospiras son sensibles a la mayoría de los antibióticos, salvo a cloranfenicol, vancomicina, rifampicina y metronidazol. El tratamiento con penicilina o equivalente es exitoso y debe ser empezado tan temprano como sea posible en la infección. Un tratamiento antibiótico efectivo debe ser establecido generalmente dentro de los 7 a 10 días después de la infección. El tratamiento oral con amoxicilina, ampicilina, doxiciclina, o eritromicina es adecuado para los casos leves, así como con cefalosporinas de tercera generación y quinolonas. Altas dosis de bencilpenicilina, intramuscular son recomendadas para los casos severos. Varios estudios indican que el tratamiento antibiótico reduce la severidad y duración de los síntomas, aún si fue instaurado tardíamente (3, 7).

Muchas veces en los casos severos es necesaria la admisión hospitalaria con tratamiento de apoyo y cuidados de soporte, prestando atención especial al balance de líquidos y electrolitos. En caso de falla renal es indicado hacer diálisis peritoneal o hemodiálisis (3).



## **PRONÓSTICO**

La mayoría de los enfermos se recupera en 2 a 6 semanas si no tiene ictericia, pero puede no estar en forma para volver a una vida normal durante 4 semanas más. El porcentaje de muertes en pacientes ictericos puede ser muy bajo, si el tratamiento con penicilina es comenzado de forma temprana y si la falla renal y hepática pudieron tratarse con éxito (7).

## **PREVENCIÓN Y CONTROL**

Los controles deben dirigirse a: 1) la fuente de infección; 2) la vía de transmisión; o 3) la infección o enfermedad en el ser humano (3).

Generalmente se alcanza evitando las exposiciones de alto riesgo, adoptando medidas de prevención adecuadas (uso de guantes, calzado, etc.), inmunización y quimioprofilaxis (32). También es importante el lavado y limpieza de las lesiones de la piel, así como la cobertura con ropa impermeable, el consumo de agua potable, el mantenimiento de los lugares de trabajo y vivienda limpios y desinfectados (3).

## DIAGNÓSTICO

Es muy importante el apoyo del laboratorio en el diagnóstico confirmatorio de la leptospirosis, debido a que ésta es difícil de diferenciar de otras enfermedades desde el punto de vista clínico.

El diagnóstico confirmatorio se realiza a través del aislamiento del microorganismo o por visualización directa en muestras clínicas. El aislamiento tiene como desventajas el prolongado tiempo requerido (conduciendo a un resultado retrospectivo), la limitada confiabilidad y el bajo rendimiento. La visualización directa tiene como ventaja la rapidez, pero las desventajas que posee son la infrecuente obtención de una muestra clínica adecuada y dificultades técnicas como las posibles malas interpretaciones de las observaciones. Esta última posee tanto una sensibilidad (40,2%) como una especificidad (61,5%) bajas (3, 32).

Como consecuencia se prefiere el diagnóstico indirecto, utilizando técnicas serológicas de las cuales la MAT es considerada la *gold standard*. Esta prueba presenta una alta sensibilidad y especificidad. Se basa en reacciones antígeno-anticuerpo, donde se enfrenta al suero del paciente una batería de serovares (vivos o muertos) con amplia circulación local (Ilustración 6). Se considera una muestra positiva cuando hay títulos de 400 para uno o varios serovares o se evidencia un aumento de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos (detecta IgM e IgG). Para demostrar esta seroconversión es necesario el procesamiento de una muestra en la fase aguda de la enfermedad y otra en la fase convaleciente, lo que implica que en muchos casos también se obtenga un resultado retrospectivo cuando el paciente se haya recuperado o haya progresado a formas severas. En alrededor del 10% de los pacientes no se puede demostrar una seroconversión, ya que ésta puede retrasarse hasta 30 días después del establecimiento

de la infección (7, 32). En estos casos es de gran valor el procesamiento de una tercera muestra.

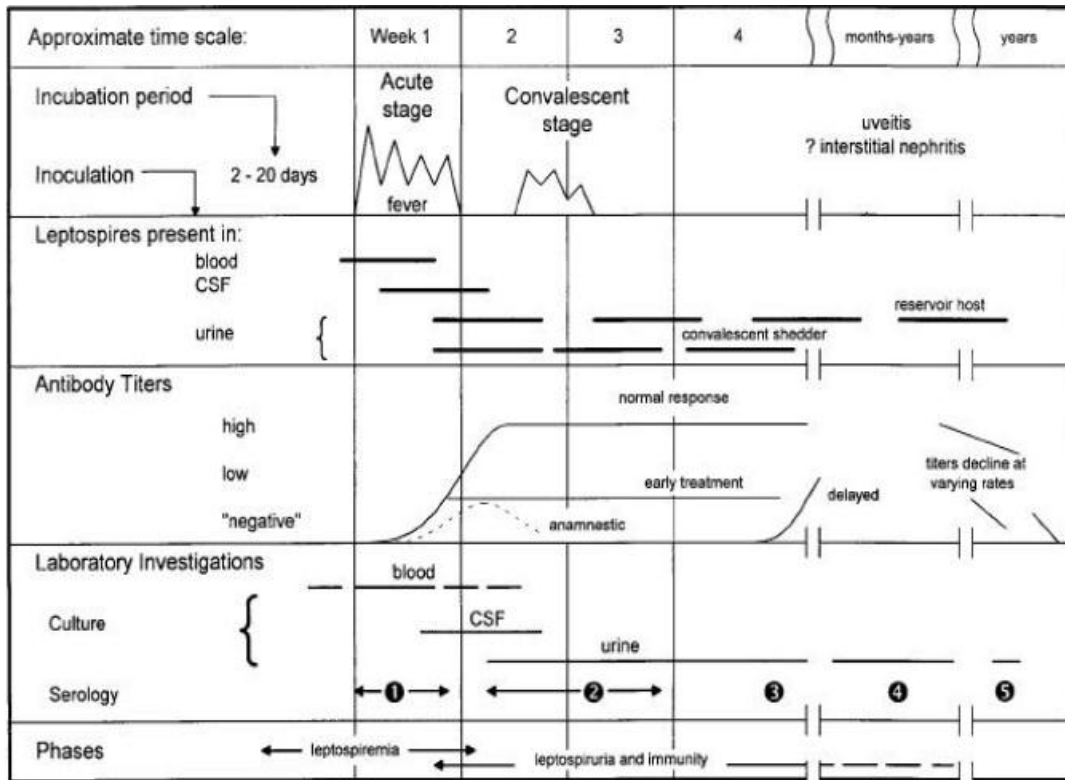


**Ilustración 6.-** Fotomicrografía de MAT con antígeno vivo, usando la microscopía de campo oscuro. Se observan leptospiras libres y grumos de aglutinación.

Dentro de las desventajas de la MAT está la posibilidad de obtener reacciones cruzadas entre otras con anticuerpos para sífilis, enfermedad de Lyme, hepatitis virales, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), enfermedades autoinmunes (32). También la necesidad de un panel de leptospiras vivas, con la consecuente dificultad de estandarización, de contar con técnicos capacitados, con disponibilidad de tiempo y dedicación (3).

La MAT es una técnica serogrupo-específica, por lo tanto no debe usarse para tratar de identificar el serovar causante. La aplicación diagnóstica de la MAT está limitada por su baja sensibilidad en las muestras de fase aguda. La detección de IgM se puede realizar a partir del quinto día de enfermedad aproximadamente; dichas IgM son responsables de la reactividad cruzada en las muestras de suero en fase aguda, cuando son positivas (32).

Los datos de la serología son importantes en el diagnóstico, pero deben ser considerados en conjunto con la presentación clínica y los datos epidemiológicos. El aislamiento de leptospiras patógenas es la prueba directa y definitiva de infección (3).



**Ilustración 7.-** Distribución de leptospiras, producción de anticuerpos y pruebas laboratoriales aplicables en las diferentes fases de la enfermedad. Tomado de: *Levett P.N. (34)*

Se han ensayado otras técnicas de diagnóstico indirecto (detectan anticuerpos en sangre, LCR, orina, humor acuoso, leche) como por ejemplo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o *test* de aglutinación macroscópica, *test* de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR), aglutinación en microcápsula, aglutinación de látex, pruebas inmunocromatográficas y prueba de hemoaglutinación indirecta. También técnicas de diagnóstico directo tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), inoculación

de animales de experimentación, coloración, microscopía de campo oscuro y cultivo (Ilustración 7) (3).

## **SITUACIÓN EN URUGUAY**

La leptospirosis en Uruguay está muy difundida, pero poco reconocida por los profesionales de la salud. La gran actividad agropecuaria, donde los trabajadores rurales entran en contacto con animales y ambientes contaminados con falta de medidas de prevención, sin dejar de considerar los hurgadores urbanos, son los principales afectados. El rango etario prevalente comprende especialmente desde los 20 a los 40 años; son mayoritariamente hombres del Interior del país. La prevalencia en Uruguay en 2010 según el Ministerio de Salud Pública (MSP) es de 2,99 cada 100.000 habitantes y según el laboratorio universitario del Instituto de Higiene la prevalencia de esta infección puede ser de hasta 15 cada 100.000 habitantes (35). Hay que considerar que muchas veces se recibe una sola muestra para analizar por MAT, la cual es sospechosa o negativa, y al no recibir una segunda muestra no se puede confirmar el caso como verdadero positivo. Otro punto a destacar es el importante daño económico que ocasiona la enfermedad en animales, afectando la producción de leche, produciendo abortos en rebaños enteros (“tormentas de abortos”), infertilidad, problemas de crecimiento y debilidad.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES**

- Proveer técnicas rápidas de laboratorio, actualizadas para el estudio de leptospirosis humana, que sean de fácil ejecución e interpretación y no posean el riesgo de trabajar con bacterias vivas.
- Contribuir al conocimiento de la leptospirosis en nuestro país.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Valorar el rendimiento diagnóstico como test serológico rápido de un procedimiento de aglutinación macroscópica en lámina, utilizando un antígeno termorresistente preparado localmente.
- Evaluar el rendimiento diagnóstico como test serológico rápido de un ELISA, sensibilizado con antígenos leptospíricos preparados localmente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se analizaron por Macroaglutinación (técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente) y por ELISA sueros tomados de pacientes con sospecha clínica de leptospirosis, que llegaron enviados para el diagnóstico por MAT al Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina (UdelaR).

Se estudiaron por Macroaglutinación 298 primeras muestras: 127 que fueron positivas también por MAT en primera o segunda muestra, y 171 con doble MAT negativa. Por ELISA se ensayaron 44 primeros sueros de pares que fueron siempre negativos en primera muestra examinada por MAT, y luego positivos (20) o negativos (24) en segundo suero ensayado por MAT.

Las muestras examinadas son las mismas que se emplearon para el diagnóstico por MAT, enviadas en tubos secos estériles y refrigerados. El procedimiento seguido para la realización de la MAT fue el descrito por Faine (10) con algunas modificaciones. Se solicitó rutinariamente una segunda muestra a los diez días aproximadamente de la muestra tomada en fase aguda, para detectar la eventual seroconversión. Las cepas de leptospiras que se utilizaron pertenecen al cepario de la sección *Leptospira* del mismo Departamento.

En muchas oportunidades el primer suero vino acompañado de sangre con anticoagulante (excepto citrato) para un eventual aislamiento del microorganismo infectante, el cual puede aportar información epidemiológica importante.

## **TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN MACROSCÓPICA CON ANTÍGENO TERMORRESISTENTE**

Para la obtención del antígeno se utilizaron las cepas de *Leptospira interrogans* (en definición clásica) con mayor circulación regional. Estas pertenecen a los serogrupos Pomona (serovar pomona, cepa Pomona), Pyrogenes (serovar pyrogenes, cepa Salinem), Australis (serovar bratislava, cepa Jez bratislava), Canicola (serovar canicola, cepa Hond Utrecht IV) e Icterohaemorrhagiae (serovar copenhageni, cepa M20). Para la preparación del antígeno se partió de cultivos puros de cada una de las cepas en medio EMJH. Para esto se realizaron repiques en 10mL de EMJH, los cuales se dejaron en incubación a 30°C por 4 días. Después se trasvasaron estos cultivos crecidos a 90mL de medio EMJH y se dejaron a 30°C durante 10 días. Luego se realizó un *pool* mezclando los diferentes cultivos, los cuales se inactivaron con formol a una dilución final de 0,2%, y se dejaron reposar por dos horas. Posteriormente se realizaron varias etapas de centrifugación y lavado con PBS. El antígeno se resuspendió en PBS formolado al 0,2% y se mezcló en *vortex*. Se colocó a baño María con agitación, 30 minutos a 100°C. Se ajustó al nivel 2x10 de la escala Mc Farland. Se le agregó Tween 80 (concentración 0,1mg/mL) y se guardó en heladera a 4°C, agitándolo diariamente para estabilizarlo. Para realizar el test de macroaglutinación se mezclaron partes iguales (30µL) del antígeno (previamente homogeneizado) con el suero del paciente sobre una placa de vidrio cuadrículado. La lectura se ejecutó a simple vista dentro de los 4 minutos. La formación de grumos gruesos se interpretó como un resultado positivo según criterios descritos por Faine (10). En cada ensayo se incluyó un suero control positivo y un suero control negativo, así como un control de la suspensión antigénica. También se ensayaron sueros de pacientes con otras enfermedades para comprobar si existen reacciones cruzadas.



## ELISA

Para la obtención del antígeno “crudo” utilizado como reactivo de captura, se siguió la metodología de Adler *et al* (36) con algunas modificaciones. Se utilizaron cepas de *Leptospira interrogans* (en su definición amplia) de los serogrupos Australis (serovar bratislava, cepa Jez bratislava), Icterohaemorrhagiae (serovar copenhageni, cepa M20), Sejroe (serovar hardjo, cepa Hardjoprajitno), Ballum (serovar castellonis, cepa Castellon 3), Pyrogenes (serovar pyrogenes, cepa Salinem) y Pomona (serovar pomona, cepa Pomona). Estas fueron cultivadas individualmente en medio EMJH a 28°C durante 20 a 25 días hasta que cada una alcanzó una concentración de  $5 \times 10^9$  cel./ml. A continuación se conservaron a una temperatura de -20°C durante 7 días. Luego se realizaron tres pasos de centrifugación a 10000g durante 30 minutos y lavados con PBS (0,02M pH 7,2). Posteriormente se procedió a la lisis celular por sonicación (pulsos de 20KHz, durante 3 minutos, en hielo) siguiendo la metodología de Silva *et al* (37) con algunas modificaciones. Se repartieron en crio-viales, conservándolos a -70°C. A continuación se determinó la concentración proteica de cada antígeno usando el método del ácido bicinonínico (SIGMA™). Se preparó un *pool* de antígenos homogéneo y se estableció la concentración de proteínas (7µg/ml) óptima que permitió diferenciar entre sueros negativos y positivos conocidos.

Luego de preparado el antígeno se sensibilizaron con 100µL de antígeno (concentración 7µg/ml) las placas con 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp de NUNC™); se dejaron en incubación 24 horas a 4°C. Se realizaron seis lavados con solución de lavado (PBS, 0,05% Tween 20), después se bloqueó con 200µL de solución de bloqueo (PBS, 0,05% Tween 20, 5% leche descremada). Se dejó en incubación durante 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente 6 veces con solución de lavado. Se diluyeron los sueros de los pacientes 1:5000 en tampón de incubación (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, pH 7,3, 2% BSA) y se

colocaron 100µL de dichas diluciones en cada pocillo. Esto se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C y luego se ejecutaron seis lavados con solución de lavado. Se adicionó 100µL de un anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas conjugado a una enzima (anticuerpo de cabra conjugado a peroxidasa, anti IgG+IgA+IgM humanas de INVITROGEN™) diluido 1:5000 en tampón de incubación; se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se lavó 6 veces con solución de lavado. Se agregaron 100µL de sustrato cromogénico (OPD) de la enzima. Se dejó incubando durante 15 minutos a 37°C en oscuridad. Luego fue detenida la reacción enzimática adicionando 50µL de solución de parada ( $H_2SO_{4(aq)}$  2N). La lectura se realizó en un lector de microplacas a una longitud de onda de 492nm. En cada ensayo se analizaron paralelamente un control positivo, uno negativo y sueros positivos para otras enfermedades.

### **MEDIO DE CULTIVO EMJH (ELLINGHAUSEN-MCCULLOUGH-JOHNSON-HARRIS)**

El medio que se utilizó para el crecimiento de las leptospiras fue el EMJH, adicionado con 10% de enriquecimiento de *Leptospira* EMJH (ambos de Difco-BD®, Becton, Dickinson and Co. Sparks, MD 21152, USA). El medio base contiene cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, y tiamina, un factor de crecimiento. El fosfato de sodio dibásico y el fosfato de potasio monobásico son amortiguadores del pH. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico de la fórmula. El enriquecimiento de *Leptospira* EMJH contiene albúmina, polisorbato 80, y factores de crecimiento adicionales para *Leptospira*.

## TESTS ESTADÍSTICOS

Para determinar la sensibilidad, especificidad y demás parámetros se utilizó el *software* de procesamiento de datos tabulados EPIDAT 3.1, de libre distribución (38). En el caso de la sensibilidad y la especificidad también se determinó (con el mismo *software*) el intervalo de confianza 95%. Para calcular el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) se aplicó el Teorema de Bayes.

**RESULTADOS:****Técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente****Tabla 1.-** Resultado comparativo de la técnica de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente y MAT.

Aglutinación macroscópica con TR	Diagnóstico por MAT		Total
	Infectado	No infectado	
Positivo	86	25	111
Negativo	41	146	187
Total	127	171	298

En los resultados de la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno TR se observó concordancia con la MAT en 86 muestras positivas de 127 (50 muestras ya positivas por MAT + 77 muestras que tuvieron un primer resultado negativo por MAT pero una segunda muestra con resultado positivo por MAT) y 146 muestras negativas de 171 confirmadas como negativas por MAT en 2 muestras. Se consideraron 41 muestras como falsos negativos y 25 muestras como falsos positivos (Tabla 1).

La sensibilidad de la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno TR aplicada a una primera muestra de suero fue de 67,72% (intervalo de confianza 95%: 59,19 – 76,24) mientras que la especificidad de la prueba fue 85,38% (intervalo de confianza 95%: 79,79 – 90,97).

La razón de verosimilitud para resultados positivos ( $RV_+$ ) fue de 4,63 y la razón de verosimilitud para resultados negativos ( $RV_-$ ) fue de 0,38. El Índice de Youden (IY) fue 0,53.

Utilizando el valor de prevalencia estimado por el MSP en 2010 (2,99 infectados cada 100.000 habitantes), se determinó que el VPP fue de 0,125 y el VPN fue de 0,999.

Cuando se utilizó el valor de prevalencia estimado por el Departamento de Bacteriología y Virología de Facultad de Medicina (15 infectados cada 100.000 habitantes) el VPP fue de 0,450 y el VPN de 0,9375.

También se estimó la capacidad de la prueba de aglutinación macroscópica con TR para detectar precozmente infecciones que tuvieron primera muestra con resultado negativo por MAT y segunda muestra con resultado positivo por MAT (Tabla 2).

**Tabla 2.-** Resultado comparativo entre la MAT y la técnica de aglutinación macroscópica con TR para primeros sueros negativos por MAT de pacientes que fueron positivos en segunda instancia.

Aglutinación macroscópica con TR	Diagnóstico por MAT		Total
	Infectado	No infectado	
Positivo	45	25	70
Negativo	32	146	178
Total	77	171	248

Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta prueba fue positiva en 58,44% de 77 pacientes cuya primera muestra por MAT fue negativa (siendo la segunda muestra por MAT positiva).

## ELISA

A partir de las concentraciones originales de cada antígeno se realizó un *pool* de antígenos (Tabla 3). Luego, al probar distintas concentraciones de antígenos, se encontró la concentración de proteína más adecuada para sensibilizar la microplaca de

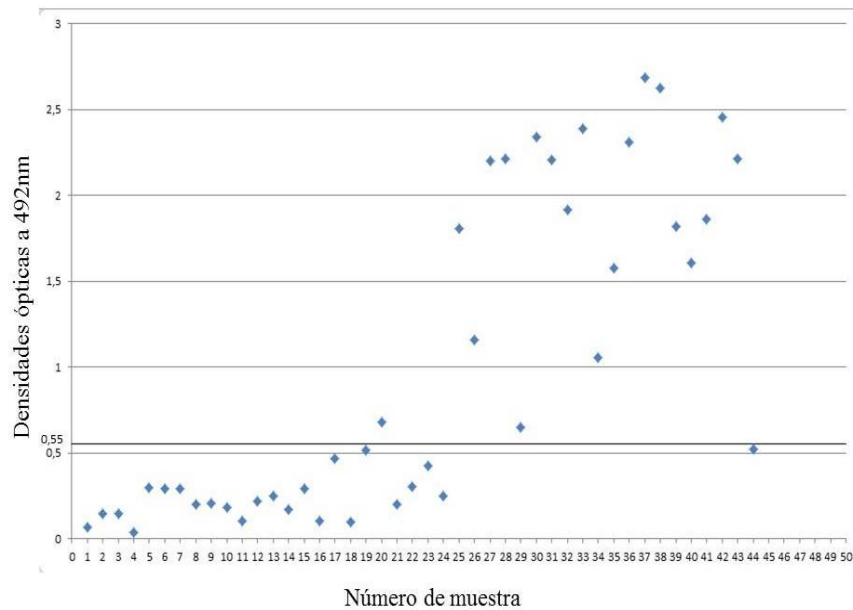
ELISA. Dicha concentración fue de 7µg/ml, la cual permitió observar una buena discriminación entre muestras positivas y negativas.

**Tabla 3.-** Concentraciones proteicas de los antígenos leptospíricos obtenidas por el método del ácido bicinconínico.

Serogrupo	Concentración proteica (µg/ml)
Australis (serovar bratislava)	438,5
Icterohaemorrhagiae (serovar copenhageni)	461,7
Sejroe (serovar hardjo)	291,0
Ballum (serovar castellanis)	269,1
Pyrogenes (serovar pyrogenes)	392,8
Pomona (serovar pomona)	228,5

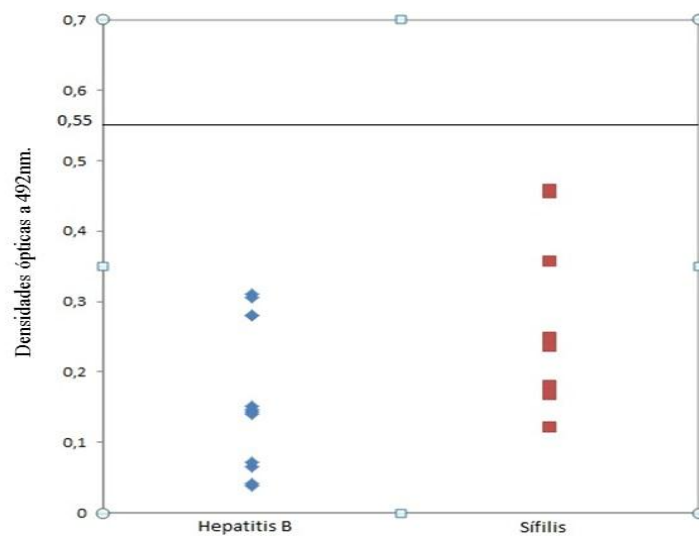
Se determinó también la dilución más apropiada de sueros y de anticuerpo conjugado a enzima a utilizar, probando distintas diluciones de los mismos. La dilución utilizada de los sueros y del anticuerpo conjugado a enzima fue de 1:5000 en ambos casos.

La prueba de ELISA indirecta fue aplicada en primera instancia al primer suero de pacientes que tuvieron dos muestras negativas por MAT, con un intervalo entre ellas de 10 días aproximadamente. Esto permitió establecer el punto de corte (*cutoff*), estimado como la media de los negativos más dos desviaciones estándar. La media  $A_{492nm}$  del grupo control negativo fue de  $0,25 \pm 0,15$ . El punto de corte estimado fue de 0,55; lo que permitió establecer el límite de reactividad. Los sueros de pacientes positivos por MAT tuvieron una media de  $1,88 \pm 0,61$  (Ilustración 8).



**Ilustración 8.-** Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en sueros positivos y negativos con respecto al valor de corte. De la muestra #1 hasta la #24, muestras negativas por MAT; de la muestra #25 hasta la #44 muestras positivas por MAT.

La absorbancia de los sueros de pacientes con otras enfermedades (Hepatitis B y Sífilis) cayó por debajo del punto de corte, con una media de  $0,21 \pm 0,12$ . No se observó reacción cruzada con sueros de pacientes con Sífilis o Hepatitis B (Ilustración 9).



**Ilustración 9.-** Valores de absorbancia obtenidos por ELISA en sueros de pacientes con otras enfermedades.

Los resultados de la prueba ELISA fueron coincidentes con la prueba MAT en 19 muestras positivas de 20 y 23 muestras negativas de 24. Una muestra positiva no fue detectada por el ELISA y una muestra fue considerada como falso positivo (Tabla 3).

**Tabla 3.-** Resultado comparativo de la prueba ELISA y MAT.

ELISA	MAT		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	19	1	20
Negativo	1	23	24
Total	20	24	44

La sensibilidad de la prueba ELISA fue de 95% (intervalo de confianza 95%: 82,95 – 100) mientras que la especificidad de la prueba fue 95,83% (intervalo de confianza 95%: 85,76 - 100).

La razón de verosimilitud para resultados positivos ( $RV_+$ ) fue de 22,62 y la razón de verosimilitud para resultados negativos ( $RV_-$ ) fue de 0,05. El Índice de Youden (IY) fue 0,91.

Utilizando el valor de prevalencia estimado por el MSP en 2010 (2,99 infectados cada 100.000 habitantes), se determinó que el VPP fue de 0,412 y el VPN fue de 0,999. Cuando se utilizó el valor de prevalencia estimado por el Departamento de Bacteriología y Virología de Facultad de Medicina (15 infectados cada 100.000 habitantes), el VPP fue de 0,8008 y el VPN fue de 0,9908.



## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN**

El diagnóstico de leptospirosis es muy complejo. Los métodos tradicionales incluyen el cultivo en medios semisólidos y la detección de anticuerpos por MAT. Ambos procedimientos tienen limitaciones. El cultivo es lento, produce resultados retrospectivos y tiene baja sensibilidad, puesto que se logran aislamientos en menos de la mitad de los casos; si las muestras para cultivo no se obtienen en el momento adecuado de la enfermedad, su sensibilidad es aún inferior. La MAT demanda gran experiencia para su ejecución e interpretación, y es de poca utilidad para guiar el manejo clínico temprano de la enfermedad, puesto que los títulos de anticuerpos detectados por esta técnica aumentan más tarde que los determinados por otros métodos, y además debe transcurrir cierto tiempo antes de poder detectar la seroconversión entre muestras de fase aguda y de convalecencia. Los títulos de anticuerpos dirigidos contra las leptospiras comienzan a ser detectables en sangre entre 5 y 10 días luego de la aparición de los síntomas de la enfermedad; los anticuerpos de tipo IgM generalmente aparecen antes que los de tipo IgG.

La prueba de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente es de utilidad para el diagnóstico rápido de leptospirosis en centros de baja complejidad o ante situaciones epidemiológicas que involucren poblaciones numerosas; pero deben confrontarse los resultados con la técnica de aglutinación microscópica (MAT) y no tiene aplicación en encuestas epidemiológicas o estudios de prevalencia. Es útil para evitar el manejo y mantenimiento de cultivos vivos de leptospiras, es de fácil ejecución, bajo costo y gran rendimiento la producción del antígeno. No requiere de equipos ni de reactivos especiales, tampoco de entrenamiento del personal técnico. Es una técnica cuantitativa y no cualitativa, ya que detecta inmunoglobulinas M.

La macroaglutinación es menos sensible que la MAT pero puede producir una reacción positiva de forma más temprana. La evaluación de esta técnica, indica que fue capaz de detectar cerca de 70% de las infecciones luego confirmadas por MAT, lo cual significa que posee una sensibilidad valiosa para el diagnóstico. Al utilizar sueros que obtuvieron un resultado negativo o con bajos títulos por MAT en la primera muestra y en la segunda muestra obtuvieron un resultado positivo o un aumento en 4 veces los títulos por MAT, se evaluó la capacidad de la técnica para indicar la enfermedad en muestras de fase aguda (detectar IgM). Aplicada sobre la primera muestra de suero, esta técnica fue capaz de detectar 58,44% de 77 pacientes cuya primera muestra por MAT fue negativa (siendo la segunda positiva). Esto último hace pensar que en muchos casos al obtener una sola muestra de suero con resultado negativo por MAT, se está perdiendo de identificar sujetos verdaderos positivos que han contraído la infección, lo que contribuye a la subestimación de su prevalencia.

La buena especificidad lograda (85,38%) está respaldada por el hecho de que no se obtuvieron reacciones cruzadas para los sueros de pacientes con otras enfermedades. Los altos valores de VPN obtenidos, señalan que al obtener un resultado negativo por medio de esta prueba, existe elevada probabilidad de que realmente se trate de un paciente no infectado. Si bien los valores de VPP son aceptables, se podrían optimizar al aumentar la especificidad de la prueba, para lo cual podríamos por ejemplo, mejorar la pureza del antígeno obtenido.

La sensibilidad del ELISA desarrollado (95%) fue muy elevada, lo cual sugiere que un resultado positivo en esta prueba, incluso si la MAT es aún negativa, puede ser de gran utilidad diagnóstica, a la espera de confirmación por esta última prueba en etapas posteriores de la enfermedad. Esto sumado a la alta especificidad del ensayo (95,83%) frente a muestras de pacientes con otras enfermedades, y el alto Índice de Youden

respaldan su utilidad. En laboratorios donde no se dispone de los equipos y de la destreza necesarios para la realización de la MAT, el resultado del ELISA puede adelantar el diagnóstico presuntivo hasta tanto se pueda derivar la muestra a un laboratorio de referencia para confirmación por la prueba *gold standard*. Esto también constituye una gran ventaja de este ELISA respecto a la otra prueba de *screening* que se desarrolló y evaluó, la aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, que proporciona mayor cantidad de falsos resultados negativos.

El ELISA se considera claramente más sensible que MAT en etapas tempranas de la infección, es fácil de estandarizar, los antígenos se pueden almacenar por mucho tiempo, no tiene casi ningún riesgo para el personal técnico y presenta pocas reacciones cruzadas. La prueba de ELISA normalizado resulta de gran utilidad en el *screening* ante focos de leptospirosis por sus ventajas en cuanto a sensibilidad, posibilidad de automatización y de procesar gran número de muestras simultáneamente y en corto tiempo.

Sin embargo, se debe seguir trabajando para instalar pruebas de mayor sensibilidad en etapas iniciales, mediante la detección de anticuerpos o de antígenos leptospíricos o su ADN, que permitan un diagnóstico de la enfermedad en la primera etapa, donde el tratamiento es más eficaz, para mejorar así las posibilidades de curación del paciente.

Como conclusión se puede decir que se desarrollaron dos métodos de laboratorio de fácil ejecución para el diagnóstico indirecto de la leptospirosis humana, los cuales presentan adecuada *performance* y pueden ser utilizados como complemento para la MAT.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a mi familia que me apoyó, me transmitió tranquilidad, brindó fuerzas y me encaminó a terminar una de las etapas de la vida.

A mis amigos que me estimularon para finalizar con este proyecto, me aconsejaron y contuvieron.

A mi tutor de tesis, Prof. Dr. Felipe Schelotto por su experiencia, colaboración constante y dedicación en la tutoría y corrección del presente trabajo.

Una especial muestra de profunda gratitud a la Téc. Elba Hernández por su apoyo, confianza, sugerencias y conocimientos sobre la temática abordada.

Al Dr. Gustavo Varela a quien consulté en reiteradas ocasiones, el cual cedió su tiempo y consejos.

Al MSc. Gustavo Mourglia por sus oportunas y acertadas observaciones sobre el ELISA.

A todo el equipo de cátedra del Laboratorio de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina por los momentos compartidos. La experiencia y conocimientos adquiridos durante el transcurso de mi pasantía han despertado mi interés y ansias de profundizar en la Bacteriología.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República donde realicé mis cursos de grado, que sirvieron de base para la realización del trabajo.

A la Facultad de Medicina de la Universidad de la República por brindarme un lugar y los recursos para realizar esta pasantía.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1. González S, del Monte A. *Leptospira*. In: FEFMUR, editor. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3 ed. Montevideo 2008. p. 485-506.
2. BCCDC. Leptospirosis. [updated February 4, 2011]; Available from: <http://www.bccdc.ca/dis-cond/a-z/1/Leptospirosis/overview/Leptospirosis.htm>.
3. OMS-ILS. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro 2008. 127 p.
4. Murray PR, Rosenthal K, Pfaller MA. *Treponema, Borrelia y Leptospira*. Microbiología Médica. 5 ed. España: Elsevier; 2006. p. 427-42.
5. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Leptospira and Leptonema*. Manual of Clinical Microbiology. 8 ed: American Society for Microbiology; 2003. p. 929-36.
6. WHO, RMRC. Leptospirosis Laboratory Manual 2007. Available from: [203.90.70.117/PDS\\_DOCS/B2147.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/micro/pdfs/203.90.70.117/PDS_DOCS/B2147.pdf)
7. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2 ed: MediSci, Melbourne, Australia; 1999 September, 1999. 272 p.
8. Kaufmann A, Sulzer K, Steigerwalt A. Available from: [http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Genospecies\\_Def.html](http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Genospecies_Def.html).
9. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999;49(2):839-58.
10. WHO. Guidelines for the control of Leptospirosis. England 1982. 171 p.
11. Prescott, Harley, Klein. Microbiology. p. 415-36.
12. Bromley DB, Charon NW. Axial Filament Involvement in the Motility of *Leptospira interrogans*. Journal of Bacteriology. 1979;137(3):1406 - 12.
13. Goldstein SF, Buttle KF, Charon NW. Structural Analysis of the *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by High-Voltage Electron Microscopy. Journal of Bacteriology. 1996;178(22):6539 - 45.
14. Kan W, Wolgemuth CW. The Shape and Dynamics of the *Leptospiraceae*. Biophysical Journal. 2007;93:54 - 61.
15. Ren S-X, Fu G, Jiang X-G, Zeng R, Miao Y-G, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2003;422(6934):888-93.
16. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. Infection and Immunity. 2000;68(4):2276-85.
17. Ifrán S. Patogenia de leptospirosis que afectan al hombre. Trabajo especial I. Montevideo: Universidad de la República; 2005.
18. Carrada-Bravo T. Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. Revista Mexicana de Patología Clínica. 2005 Octubre - Diciembre, 2005:246 - 56.
19. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. PLoS ONE. 2008;3(2):e1607.
20. Werts C. Leptospirosis: A Toll Road from B Lymphocytes. Chang Gung Medical Journal. 2010;33:591 - 601.
21. Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and Chemical Composition of Lipopolysaccharide Extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. Journal of General Microbiology. 1986;132(1):103 - 9.
22. Vinh T, Shi M-H, Adler B, Faine S. Characterization and Taxonomic Significance of Lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* Serovar *hardjo*. Journal of General Microbiology. 1989;135:2663 - 73.

23. Yanagihara Y, Kamisango K, Yasuda S, Kobayashi S, Mifuchi I, Azuma I, et al. Chemical compositions of cell walls and polysaccharide fractions of spirochetes. *Microbiology and Immunology*. 1984;28(5):535 - 44.
24. Cinco M, Perticarari S, Presani G, Dobrina A, Liut F. Biological activity of a peptidoglycan extracted from *Leptospira interrogans*: *in vitro* studies. *Journal of General Microbiology*. 1993;139(12):2959 - 64.
25. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*. 2003;71(5):2414 - 21.
26. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity*. 2005;73(8):4853-63.
27. Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004;28(3):291 - 318.
28. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*. 2003;49(4):929 - 46.
29. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. *Infection and Immunity*. 2002;70(1):315 - 22.
30. WHO. Leptospirosis: an emerging public health problem. *Weekly epidemiological record*. 2011 4 February 2011:45 - 52.
31. WHO. Water-related Diseases. 2001; Available from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/leptospirosis/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/leptospirosis/en/index.html).
32. Levett PN, Haake DA. *Leptospira* species (Leptospirosis). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010. p. 4320.
33. Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;36:S5-S7.
34. Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14:296-326.
35. MSP. 2010; Available from: <http://www.msp.gub.uy/andocasociado.aspx?5169,20818>.
36. Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S. Detection of Specific Anti-Leptospiral Immunoglobulins M and G in Human Serum by Solid-Phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1980;11(5):452-7.
37. da Silva MV, Camargo ED, Vaz AJ, Souza AMC, Ueda M, Sakata EE. Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgM na leptospirose humana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1980;30(2):95-100.
38. OPS. EPIDAT. Available from: <http://www.paho.org/spanish/sha/epidat.htm>.