

Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la leptospirosis en Cuba

Ana Margarita Obregón,¹ Carmen Fernández,¹ Islay Rodríguez,¹ Yinia Balbis,¹ Beatriz Martínez¹ y José Rodríguez¹

Forma de citar

Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Balbis Y, Martínez B, Rodríguez J. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la leptospirosis en Cuba. Rev Panam Salud Publica. 2004;16(4): 259–65.

RESUMEN

Objetivos. Evaluar la sensibilidad, la especificidad, la reproducibilidad y la estabilidad de cinco sistemas de aglutinación con látex diseñados para detectar anticuerpos contra leptospira en sueros de humanos y de animales, basados en los serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación en Cuba.

Métodos. Se realizó un estudio analítico descriptivo con 706 sueros humanos (65 sueros positivos a anticuerpos contra leptospira mediante microaglutinación (MAT) y hemaglutinación (HA); 156 sueros negativos, según MAT y HA; 485 sueros de 424 pacientes con signos clínicos o epidemiológicos de leptospirosis); y 29 sueros de animales (16 equinos, 6 bovinos, 5 porcinos, 1 canino y 1 ovino). Todas las muestras se evaluaron con cinco conjugados de látex con células enteras de *Leptospira interrogans* de los cuatro serogrupos de mayor circulación en Cuba en el período entre 2002 y 2004. Con las células obtenidas de los cultivos celulares de cepas tipo se obtuvieron cuatro conjugados específicos (látex-*Canicola*, látex-*Icterohaemorrhagiae*, látex-*Pomona* y látex-*Sejroe*) y un conjugado de látex con la mezcla de las células de esos cuatro serogrupos a partes iguales (látex-Pool). Adicionalmente, las muestras se evaluaron con el sistema comercial de aglutinación con látex Lepto Tek Dri Dot (bioMerieux, Francia). La estabilidad y la reproducibilidad de los conjugados de látex se evaluaron mediante controles mensuales durante 6 meses con sueros positivos y negativos.

Resultados. De los sistemas evaluados, la mejor combinación de sensibilidad y especificidad se observó con el conjugado látex-Pool (93,8% y 90,4%, respectivamente). La mejor combinación de valores predictivos positivos y negativos se observó con el conjugado látex-*Sejroe* (90,9% y 95,8%, respectivamente), seguido del conjugado látex-Pool (94,2% y 96,6%, respectivamente). Los valores predictivos positivo y negativo del sistema comercial Lepto Tek Dri Dot fueron 78,5% y 88,4%, respectivamente. De las 137 muestras de pacientes positivas a alguno de los serogrupos estudiados según MAT, los conjugados de látex lograron identificar correctamente 107 (78,1%), mientras que el conjugado látex-Pool detectó como positivos 116 sueros (84,7%). Al evaluar los sueros de animales, el conjugado látex-Pool detectó como positivos el mayor número de sueros y tuvo la mayor coincidencia con MAT (93,1%). Se observó una adecuada estabilidad y reproducibilidad de los conjugados estudiados.

¹ Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Ciudad de La Habana, Cuba. La correspondencia

debe dirigirse a Ana M. Obregón, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Autopista Novia del Mediodía km 6½, La Lisa, Ciudad de La Ha-

bana, Cuba. Correo electrónico: amobregon@ipk.sld.cu

Conclusiones. *Los conjugados de látex con células enteras de leptospira de los serogrupos de mayor circulación en Cuba demostraron un grado de coincidencia con MAT similar o superior al observado con el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot, tanto en sueros de humanos como de animales. Se recomienda extender el uso del conjugado látex-Pool en Cuba para el tamizaje inicial de anticuerpos contra leptospira.*

Palabras clave

Leptospira interrogans, leptospirosis, tests de aglutinación, tests de fijación de látex, Cuba.

La leptospirosis es una zoonosis de curso febril agudo de amplia distribución (1). Sin embargo, predomina en las zonas tropicales y subtropicales, donde la incidencia puede ser de hasta 100 personas por cada 100 000 habitantes (2). En Cuba existen condiciones apropiadas para la propagación de esta enfermedad en cualquier época del año debido a sus características climáticas, su relieve y sus numerosos ríos y embalses, así como a los numerosos vectores que pueblan las zonas rurales y urbanas del país. Estos factores hacen que aumente la incidencia de esta enfermedad, especialmente durante los meses de lluvia (3). En Cuba, el comportamiento epidémico de esta enfermedad ha estado enmarcado en tres etapas bien diferenciadas: la primera (entre 1980 y 1990) presentó una tendencia ligeramente ascendente, la segunda (de 1991 a 1994) se caracterizó por un marcado aumento del número de casos, mientras que durante la tercera etapa (de 1995 a 2002) se observó una franca reducción (4).

El diagnóstico de certeza de la leptospirosis se realiza mediante el aislamiento y el cultivo del agente etiológico, pero los resultados de este procedimiento demoran varios días en obtenerse. Por su parte, los ensayos serológicos que pueden detectar anticuerpos específicos de las clases IgM e IgG contra leptospira son más rápidos y se han convertido en los métodos más ampliamente utilizados (5). Entre las técnicas serológicas más empleadas se encuentra la microaglutinación (MAT) de serogrupos, que es la técnica de referencia internacional debido a su elevada especificidad (2, 5).

Desde el año 1981 en Cuba se utiliza la técnica de hemaglutinación indirecta

(HA) en toda la red nacional de microbiología (6). Aunque este método solo detecta anticuerpos de la clase IgM, característicos de pacientes con infección reciente, es una técnica sencilla, no requiere instrumental complejo y los resultados se obtienen en 4 horas o menos, por lo que se emplea ampliamente, especialmente en lugares que no cuentan con las condiciones e infraestructura necesarias para llevar a cabo el diagnóstico microbiológico.

En los últimos años han aparecido en el mercado sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de anticuerpos contra leptospira en pocos minutos o segundos, aunque el costo por determinación es elevado. El sistema de aglutinación con látex Lepto Tek Dri Dot, basado en la detección de anticuerpos específicos para el género *Leptospira*, ha logrado una amplia utilización por su sencillez y rapidez (7).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la sensibilidad, la especificidad, la reproducibilidad y la estabilidad de cinco sistemas de aglutinación diseñados para detectar anticuerpos contra leptospira en sueros de humanos y de animales, mediante conjugados de látex con células enteras de las cepas tipo de los serogrupos de *Leptospira* de mayor circulación en Cuba entre 2002 y 2004.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico descriptivo con 706 sueros de 645 pacientes y 29 sueros de animales, obtenidos durante el período comprendido entre el 1 de enero de 2002 y el 30 de julio de 2004, conservados en el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiro-

sis (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), de Ciudad de La Habana, Cuba. Para su estudio, las muestras fueron divididas en:

Controles positivos: 65 sueros positivos mediante HA. Estos sueros procedían de pacientes con leptospirosis confirmada, según los criterios clínicos y epidemiológicos establecidos en los lineamientos para el diagnóstico, control y vigilancia de esta enfermedad, adoptados por el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2) y la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS) (8). Sesenta y cuatro de estas muestras fueron también positivas por MAT.

Controles negativos: 156 sueros negativos por MAT y HA. De ellos, 78 pertenecían a donantes de sangre del Banco de Sangre Docente de Marianao, Ciudad de La Habana. Además, se emplearon 12 sueros positivos a *Treponema pallidum* según la prueba no treponémica de la reagina plasmática rápida (RPR) y la prueba de hemaglutinación de *T. pallidum* (HATP); 10 sueros positivos a meningoencefalitis aséptica por *Enterovirus*, confirmados por inhibición de la hemaglutinación (IHA); 10 sueros positivos a toxoplasmosis, confirmados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI); 16 sueros con anticuerpos de la clase IgM contra dengue, confirmados por ELISA; 10 sueros positivos al virus de la hepatitis A, 10 al de la hepatitis B y 10 al de la hepatitis C, todos confirmados mediante los sistemas ELISA correspondientes. Todas las muestras se almacenaron en alícuotas a -20°C .

Sueros de pacientes: 485 sueros de 424 pacientes con signos clínicos o epide-

miológicos de leptospirosis. Estos sueros procedían de diferentes centros provinciales cubanos de higiene, epidemiología y microbiología y de hospitales clínico-quirúrgicos y especializados de Ciudad de La Habana.

Sueros de animales: 29 sueros de animales (16 equinos, 6 bovinos, 5 porcinos, 1 canino y 1 ovino) sin confirmación de infección por leptospirosis. Estos sueros procedían del Laboratorio Provincial de Diagnóstico Veterinario de la provincia de Cienfuegos, Cuba.

Microaglutinación con antígenos vivos

El diagnóstico de la leptospirosis humana y animal se realizó mediante MAT con antígenos vivos (2) y diluciones seriadas de los sueros de pacientes en solución salina de fosfato (PBS) entre 1:10 y 1:1 280. Los sueros de animales se estudiaron a partir de una dilución inicial de 1:50. Como antígenos fueron utilizadas células enteras de cepas de *Leptospira interrogans* de los serogrupos de mayor circulación en Cuba (cuadro 1).

Estas cepas fueron cultivadas durante 7–10 días a 30 °C en medio de Ellinghausen y Mc Cullough modificado por Johnson y Harris (EMJH) y enriquecido con suplemento de sales, albúmina y vitaminas, y con Tween 80 (SAVAT). Los cultivos se ajustaron a una concentración de 200–400 microorganismos/campo mediante microscopía de campo oscuro, técnica empleada también para realizar la lectura de los resultados. Como título final del suero se consideró la mayor dilución a la cual se observó la aglutinación de 50% de las células. La interpretación de los resultados se realizó según los siguientes criterios:

Sueros de personas. Se consideraron positivas las muestras con título $\geq 1:160$. Los sueros con título $< 1:160$ se consideraron reactivos. Se clasificaron como no reactivos los sueros en los que no se observó aglutinación.

Sueros de animales. Se consideraron positivas las muestras de origen equino en las que se observó aglutinación en una dilución $\geq 1:400$ antes de 2 minutos. En el resto de las especies estudiadas, se consideraron positivas las muestras que reaccionaron en una dilución de $\geq 1:100$ antes de 2 minutos, con excepción del serogrupo Hebdomadis en bovinos, para el cual el criterio de positividad fue presentar aglutinación en una dilución $\geq 1:400$ antes de 2 minutos.

Hemaglutinación indirecta

Para la hemaglutinación indirecta en sueros de personas se siguió la metodología descrita en los lineamientos para el control y la prevención de la leptospirosis (7). Se consideraron positivas las muestras con título $\geq 1:80$. Los sueros con título inferior se consideraron reactivos. Se clasificaron como no reactivos los sueros en los que no se observó aglutinación alguna.

Técnica Lepto Tek Dri Dot

Se utilizó el estuche comercial Lepto Tek Dri Dot (bioMérieux, Francia)

según las instrucciones del fabricante (9). Se consideraron como positivos fuertes los sueros que presentaron una aglutinación franca antes de 30 segundos. Cuando la aglutinación observada a los 30 segundos era fina, la muestra se consideró positiva débil. Cuando no se observó ninguna reacción de aglutinación después de 30 segundos, la muestra se consideró negativa.

Agglutinación con cepas autóctonas

Para la obtención de sistemas de aglutinación con conjugados de látex se utilizaron las cepas tipo de los serogrupos de *Leptospira interrogans* de mayor circulación en Cuba en el período entre 2002 y 2004 (cuadro 2).

Las cepas tipo se cultivaron en 500 mL del medio EMJH enriquecido con SAVAT durante 10–15 días a 30 °C. Después de comprobar la pureza del cultivo, se ajustó la concentración celular aproximadamente a 200 microorganismos/campo mediante microscopía de campo oscuro.

Los cultivos se centrifugaron a 20 000 g durante 2 horas a 4 °C. El sedimento celular obtenido se lavó en solución amortiguadora de glicina salina (pH 8,2) durante 1 hora bajo las

CUADRO 1. Cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas para la realización de la técnica de microaglutinación

Serogrupo	Serovariedad	Cepa
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M 20
Canicola	canicola	Hond Utrech
Ballum	arborea	Arborea
Pomona	mozdok	5 621
Sejroe	sejroe	M 84

CUADRO 2. Cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas para la conjugación con las partículas de látex

Serogrupo	Serovariedad	Cepa
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M 20
Canicola	canicola	Hond Utrech
Pomona	mozdok	5 621
Sejroe	sejroe	M 84

mismas condiciones de centrifugación. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el menor volumen posible de solución amortiguadora de glicina salina. Las células se inactivaron con formaldehído (concentración final de 0,5%) durante 30 minutos en reposo a temperatura ambiental. Transcurrido ese tiempo se comprobó mediante examen microscópico directo en campo oscuro la presencia de células de leptospira intactas o en forma de botones sin su motilidad característica. Se ajustó la concentración celular hasta alcanzar valores de transmitancia de 25–35% por fotocolorimetría (Ciba-Corning, Francia) con un filtro de 420 nm (10). Las células se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su conjugación.

Las células se conjugaron con partículas de látex azul (SIGMA®, EUA) de 0,8 µm de diámetro, a una concentración final de 10% (peso/volumen) según los procedimientos descritos por Severin (10) y Newman (11).

Se obtuvieron conjugados de látex con los cuatro serogrupos de *L. interrogans* estudiados (látex-Canicola, látex-Icterohaemorrhagiae, látex-Pomona y látex-Sejroe), así como un conjugado de látex con la mezcla de las células de esos cuatro serogrupos a partes iguales (látex-Pool).

La reactividad de los conjugados de látex se evaluó mediante su capacidad de aglutinar los sueros de control positivos y negativos. Para ello se homogenizaron 10 µL del conjugado de látex con la misma cantidad del suero en láminas excavadas. Los sueros que produjeron aglutinación visible antes de 3 minutos se consideraron positivos. Se consideraron negativos los sueros que en 3 minutos no produjeron aglutinación visible.

Estabilidad y reproducibilidad

Se estudiaron la estabilidad y la reproducibilidad de los conjugados de látex con cepas autóctonas cubanas. Para ello se ensayaron sueros positivos con títulos serológicos entre 1:40 y 1:1 280 seleccionados aleatoriamente. Estos sueros se distribuyeron en alí-

cuotas de 100 µL en viales estériles y se congelaron a –20 °C hasta su uso. Los residuos de las alícuotas de suero se descartaron una vez descongeladas.

El estudio de estabilidad se realizó durante 6 meses. Mensualmente se evaluó la intensidad de la reacción entre los conjugados de látex y 10 sueros de control positivos y 10 sueros de control negativos.

La reproducibilidad se estudió durante 6 meses. Cinco operadores entrenados previamente en la técnica de aglutinación con látex evaluaron mensualmente los cinco conjugados de látex frente a cinco sueros de control (tres positivos y dos negativos). Se evaluó el porcentaje de coincidencia de los resultados por operador.

Métodos estadísticos empleados

Los resultados de las pruebas se compararon mediante el método paramétrico para muestras independientes de Mac-Nemar y el programa Epi Info versión 5.0. Se calcularon la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo para cada sistema. Se escogió un nivel de significación de $P < 0,05$.

RESULTADOS

De los 65 sueros positivos, los conjugados de látex para los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Sejroe reconocieron como positivos 62 (95,4%), 62 (95,4%), 61 (93,8%) y 58 (89,2%) sueros, respectivamente, mientras que el conjugado látex-Pool reconoció 61 (93,8%) sueros positivos. El sistema comercial Lepto Tek Dri Dot detectó solo 56 (86,2%) de los sueros positivos. Se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el conjugado látex-Sejroe y HA ($P < 0,05$) y entre los obtenidos con el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot y los obtenidos mediante las técnicas convencionales MAT y HA ($P < 0,05$).

La mayor especificidad se logró con el conjugado látex-Sejroe y con el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot (96,2% y 95,5%, respectivamente; $P >$

0,05). Los valores de especificidad de los conjugados látex-Pool (90,4%), látex-Canicola (87,8%), látex-Pomona (87,2%) y látex-Icterohaemorrhagiae (84,6%) resultaron significativamente menores ($P < 0,05$) que los obtenidos con las técnicas convencionales (MAT y HA) y con el sistema látex comercial Lepto Tek Dri Dot.

De los sistemas evaluados, la mejor combinación de sensibilidad y especificidad se observó con el conjugado látex-Pool (93,8% y 90,4%, respectivamente), mientras que con el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot se alcanzó una especificidad de 95,9%, pero su sensibilidad solo fue de 86,2%.

La mejor combinación de valores predictivos positivo y negativo se observó con el conjugado látex-Pool (94,2% y 96,6%, respectivamente), seguido del conjugado látex-Sejroe (90,9% y 95,8%, respectivamente). Los valores predictivos positivo y negativo del sistema comercial Lepto Tek Dri Dot fueron 78,5% y 88,4%, respectivamente.

El porcentaje de coincidencia con respecto a MAT fue mayor cuando se emplearon los conjugados látex-Sejroe (94,2%) y látex-Pool (90,2%); mientras que para los conjugados específicos para los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pomona dichos porcentajes fueron de 89,2%, 86,7% y 84,4%, respectivamente.

Muestras de pacientes

De los 424 presuntos casos de leptospirosis humana, 172 fueron positivos y 64 resultaron reactivos por MAT. Por la técnica de HA, que solo detecta anticuerpos de la clase IgM, fueron positivos 44 y reactivos 19, mientras que 134 fueron positivos por el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot. Con los conjugados de látex estudiados, el mayor número de resultados positivos se obtuvo con el látex-Pool (148), mientras que con los conjugados de látex para los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona y Sejroe se detectaron 146, 140, 128 y 103, respectivamente. Al aplicar el estadígrafo de Mac Nemar no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obte-

nidos por MAT y los obtenidos con el conjugado látex-Pool.

El porcentaje de coincidencia entre HA y MAT fue de 53,5% (227 casos) y el de Lepto Tek Dri Dot con MAT fue de 59,2% (251 casos), mientras que los porcentajes de coincidencia entre los resultados por MAT y los obtenidos con los conjugados de látex para los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroe y el Pool fueron de 62,7% (266 casos), 60,4% (256 casos), 59,7% (253 casos), 58,3% (247 casos) y 59,2% (251 casos) respectivamente.

En general, de 137 sueros de pacientes positivos a alguno de los serogrupos estudiados según MAT, los conjugados de látex lograron identificar correctamente 107 (78,1%), mientras que el conjugado látex-Pool detectó como positivos 116 sueros (84,7%) (cuadro 3). No se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el conjugado látex-Pool y los obtenidos con los conjugados específicos correspondientes a cada serogrupo ($P > 0,05$).

Sueros de animales

De los 29 sueros de animales, 27 (93,1%) fueron positivos por la técnica de MAT, 12 (41,4%) por el sistema Lepto Tek Dri Dot y 24 (82,8%), 5 (17,2%), 27 (93,1%), 26 (89,7%) y 29 (100%) por los conjugados látex-Canicola, látex-Icterohaemorrhagiae, látex-Pomona, látex-Sejroe y látex-Pool, respectivamente.

La mayor coincidencia con los resultados de MAT se observó con el látex-Pool (93,1%). El porcentaje de coincidencia de los resultados obtenidos con

los conjugados de látex específicos para los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Sejroe fueron 88,9%, 25,9%, 92,6% y 88,9%, respectivamente. El porcentaje de coincidencia del sistema comercial Lepto Tek Dri Dot con MAT fue de 51,9%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por MAT y los sistemas Lepto Tek Dri Dot y látex-Icterohaemorrhagiae ($P < 0,05$).

Los conjugados de látex para los diferentes serogrupos identificaron correctamente todos los sueros de animales positivos a los serogrupos correspondientes según los resultados de MAT, mientras que el conjugado látex-Pool detectó el 100% de las muestras. Además, el conjugado látex-Pool detectó 1, 2 y 16 sueros que eran positivos a los serogrupos Tarassovi, Hebdomadis y Australis, respectivamente.

Estudio de estabilidad y reproducibilidad

Todos los sistemas se mantuvieron estables durante los 6 meses que duró el estudio. La reactividad serológica de los diferentes conjugados no disminuyó al enfrentarse a los sueros de control seleccionados.

Los resultados de los ensayos de reproducibilidad coincidieron en los meses de junio, julio y septiembre, con aglutinación visible entre 30 segundos y 1 minuto, y en los meses de agosto, octubre y noviembre con reacción visible antes de 30 segundos. La coincidencia entre los cinco operadores durante los 6 meses de investigación fue de 100%.

DISCUSIÓN

En los países en vías de desarrollo, los laboratorios de diagnóstico carecen con frecuencia de recursos suficientes para adquirir sistemas de diagnóstico costosos, por lo que los sistemas de aglutinación con látex resultan de gran utilidad por su sencillez, rapidez y bajo costo.

Los resultados obtenidos confirman que el empleo de sistemas autóctonos basados en conjugados de látex con células enteras de los serogrupos de leptospira de mayor circulación en un país o región permite lograr resultados similares a los obtenidos con los métodos más aceptados —entre ellos MAT, que es la técnica de referencia internacional— y similares o superiores a los conseguidos con sistemas comerciales de gran demanda. La disponibilidad de estos sistemas sencillos y económicos permite perfeccionar la vigilancia de laboratorio de esta enfermedad y ampliar el tamizaje de la leptospirosis en humanos y en animales.

En Cuba, según lo establecido en el Programa Nacional de Control y Prevención de Leptospirosis del Ministerio de Salud Pública, los casos presuntos de leptospirosis se deben confirmar serológicamente mediante HA y MAT, con muestras pareadas. La primera muestra debe obtenerse cuando el paciente se presenta en el área de atención primaria antes de administrar cualquier antibiótico, y la segunda entre 7 y 10 días después de tomada la primera muestra. Las técnicas de MAT y HA detectan la seroconversión en la mayoría de los pacientes, lo que permite confirmar serológicamente el diagnóstico.

La infección por bacterias del género *Leptospira* tiene un curso similar al observado en la mayoría de las enfermedades infecciosas. Después de la infección a través de la piel o de alguna mucosa escoriada, se desencadena la respuesta inmunológica con la producción de inmunoglobulinas de la clase IgM detectables por algunos métodos serológicos a partir del quinto día de la infección. La concentración de IgM en la sangre se mantiene estable aproximadamente durante 10 días. Después

CUADRO 3. Evaluación de muestras positivas a determinados serogrupos según MAT, con los conjugados de látex específicos correspondientes y el conjugado látex Pool

Positividad de la muestra	MAT	Látex específicos		Látex-Pool	
		No.	Coincidencia (%)	No.	Coincidencia (%)
Canicola	26	23	88,5	22	84,6
Icterohaemorrhagiae	35	22	62,9	23	65,7
Pomona	57	49	86,0	56	98,2
Sejroe	19	13	68,4	15	78,9
Total	137	107	78,1	116	84,7

MAT: Técnica de microaglutinación con antígenos vivos.

comienza a disminuir a medida que se incrementa la síntesis de anticuerpos de la clase IgG, que se mantienen en menores concentraciones que la IgM, pero durante un tiempo mayor (entre 6 meses y 20 años después).

El sistema comercial Lepto Tek Dri Dot detecta anticuerpos totales (IgM e IgG) contra leptospiras en el suero de los pacientes (9). Se deben realizar investigaciones específicas dirigidas a determinar la clase de anticuerpos que detectan los conjugados estudiados aquí, lo que ayudará a conocer la utilidad diagnóstica de estos sistemas en las diferentes etapas de la infección leptospirósica (12, 13).

Teniendo en cuenta que la leptospirosis es una enfermedad aguda y transmisible, pero curable en la mayoría de los casos, los resultados positivos falsos no entrañan traumatismos psicológicos o económicos para los pacientes. Sin embargo, un resultado negativo falso puede comprometer la salud y la vida de los pacientes. Por lo tanto, el criterio fundamental para escoger una técnica de diagnóstico para la leptospirosis debe ser su alta sensibilidad. Los resultados obtenidos indican que es posible utilizar el conjugado látex-Pool para la detección de anticuerpos contra leptospiras, ya que permitió detectar un elevado porcentaje de casos positivos (93,8%) con una aceptable especificidad (90,4%), com-

binación superior a la informada para otros sistemas similares (14–16).

El porcentaje de coincidencia entre las diferentes técnicas evaluadas con relación a la técnica de referencia internacional (MAT) se basa en la proporción de resultados coincidentes (positivos y negativos) en relación con la totalidad de las muestras estudiadas. Los valores predictivos pueden variar en dependencia de la prevalencia, de la endemia y del curso clínico de la enfermedad (14). Los valores predictivos (positivo y negativo) obtenidos con los conjugados látex-Sejroe y látex-Pool fueron superiores a los informados para otros sistemas similares (14–16).

Los resultados del estudio de reproducibilidad confirman la facilidad, sencillez y buena reproducibilidad de esta técnica. Por otra parte, los conjugados de látex conservados a 4 °C fueron estables durante los 6 meses que duró esta investigación. Otros investigadores (15) han encontrado que los conjugados de látex son estables hasta 2 años después de elaborados y se pueden conservar deshidratados, en refrigeración o a temperatura ambiente en países tropicales.

La confirmación serológica de la leptospirosis animal en las diferentes especies afectadas se realiza generalmente mediante MAT, pues con HA se obtiene un elevado número de resultados positivos falsos. Esto subraya la

necesidad de evaluar y aplicar nuevas técnicas rápidas, sencillas, sensibles y confiables, capaces de ofrecer un diagnóstico certero en el menor tiempo posible.

En este trabajo se investigó por primera vez la presencia de anticuerpos contra leptospiras en sueros de animales mediante sistemas de aglutinación con látex. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con las diferentes técnicas convencionales y con los conjugados de látex. Los conjugados de látex evaluados con sueros de animales con signos clínicos de leptospirosis, excepto el conjugado látex-Icterohaemorrhagiae, fueron más sensibles que el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot ($P \leq 0,05$) y de una sensibilidad similar a la de MAT. El mayor porcentaje de muestras positivas se obtuvo con el conjugado látex-Pool (100%).

Los sistemas de conjugados de látex con células enteras de los serogrupos de leptospiras de mayor circulación en Cuba demostraron un mayor grado de coincidencia con MAT que el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot, tanto en sueros humanos como de animales. Estos sistemas tuvieron buena reproducibilidad y estabilidad durante seis meses. Se recomienda extender el uso del conjugado látex-Pool en Cuba para el tamizaje inicial de anticuerpos contra leptospiras.

REFERENCIAS

- World Health Organization. Leptospirosis world wide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec.* 1999; 74:237–42.
- Terpstra WJ, Adler B, Ananyina J, André-Fontaine G, Ansdell V, Ashford DA, et al. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: World Health Organization, International Leptospirosis Society; 2001.
- Martínez R, Pérez A, Baró M, Álvarez AM, Menéndez J, Díaz M, et al. Evaluación de la efectividad de una nueva vacuna contra la leptospirosis humana en grupos en riesgo. *Rev Panam Salud Publica.* 2000;8(6):385–92.
- Cruz R. Estrategia cubana para el control y prevención de la leptospirosis en Cuba. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002;44(Supl.):SD5.
- Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol.* 2001; 14(2):296–326.
- World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of Leptospirosis. Geneva: WHO; 1982. (WHO Off Set Publication No. 67).
- Smiths HL, Vander Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human Leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1272–5.
- World Health Organization, International Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO, ILS; 2003.
- Organon Teknika. Lepto Dri Dot: a leptospira specific immunoassay for use on human serum samples. August 2000. Hallado en: http://www.kit.nl/biomedical_research/assets/images/Lepto_dridot_protocol.doc. Acceso el 9 de septiembre de 2004.
- Severin WP. Latex agglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis. *J Clin Path.* 1972;25:1079–82.
- Newman BR, Stevens WR, Gaafar AH. Latex agglutination test for the diagnosis of *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Lab Clin Med.* 1970;79(1):107–13.
- Suárez Miranda CJ, Cruz Oramas G, Alfonso Berrio L. Evaluación del Programa de Control Sanitario Internacional en el Municipio Playa en el período de enero a diciembre de 2001. *Bol IPK.* 2002;12(30):240.

13. Hartskeerl R, Smits H, Kover H, Terpstra WJ. International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Amsterdam: Royal Tropical Institute; 2001.
14. Ramadass P, Samuel B, Nachimuthu K. A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies. *Vet Microbiol.* 1999; 70(1-2):137-40.
15. Smiths HL, Howard DC, Eapen CK, Kurialose M, Sugatham S, Hussein M, et al. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Trop Med Internat Health.* 2001;6(2):114-8.
16. Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, Sasaki DM. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1464-9.

Manuscrito recibido el 4 de noviembre de 2003. Aceptado para publicación, tras revisión, el 1 de junio de 2004.

ABSTRACT

Latex agglutination system for the rapid diagnosis of leptospirosis in Cuba

Objectives. To assess the sensitivity, specificity, reproducibility, and stability of five latex agglutination systems for detecting antibodies against leptospira in human and animal sera, by using the *Leptospira* serotypes that are most widely prevalent in Cuba.

Methods. We performed an analytic and descriptive study with 706 human sera (65 tested positive for antibodies against leptospira with microagglutination (MAT) and hemagglutination (HA) techniques; 156 sera that tested negative with MAT and HA); 485 sera from 424 patients who had clinical or epidemiologic signs of leptospirosis; and 29 animal sera (16 from equines, 6 from bovines, 5 from porcines, 1 from a canine, and 1 from an ovine). All of the samples were tested with five latex conjugates made from whole cells of *Leptospira interrogans*, specifically the four serogroups that circulated most widely in Cuba from 2002 to 2004. The cells obtained from cultured cell lines yielded four specific conjugates (latex-canicola, latex-icterohemorrhagiae, latex-pomona, and latex-sejroe), as well as one latex conjugate made from a combination of all four serogroups in equal quantities (latex-pool). In addition, samples were tested with the commercial latex agglutination Lepto Tek Tri Dot (bioMeriux, France) kit. The stability and reproducibility of the latex conjugates were assessed through monthly controls over a period of 6 months with positive and negative sera.

Results. Of the systems that were assessed, the best combination of sensitivity and specificity was obtained with the latex-Pool conjugate (93,8% and 90,4%, respectively). The best combination of positive and negative predictive values was seen with the latex-Sejroe conjugate (90,9% and 95,8%), respectively, followed by the latex-Pool conjugate (94.2% and 96.6%, respectively). The positive and negative predictive values of the Lepto Tek Dri Dot commercial system were 78.5% and 88.4%, respectively. Among the 137 patient samples that tested positive for one of the serotypes when MAT was used, latex conjugates succeeded in correctly identifying 107 (78.1%), whereas the latex-Pool conjugate detected 116 (84.7%) positive sera. When animal sera were tested, the latex-Pool conjugate detected the greatest number of positive serum samples and showed the greatest concordance with MAT (93.1%). The conjugates studied showed good stability and reproducibility.

Conclusions. Latex conjugates made from whole cells of the most widely circulating leptospira in Cuba showed a degree of concordance with MAT that was similar to or better than that seen with the Lepto Tek Dri Dot commercial system, both in human and animal sera. We recommend more widespread use of the latex-Pool conjugate in Cuba in the initial screening for antibodies against leptospira.