

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Lepto tek dip stick y lepto tek dri dot, técnicas útiles en el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana

Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes,¹ Dra. Carmen Fernández Molina² y Téc. José Rodríguez³

RESUMEN

Se estudiaron casos graves y grupos de riesgo, todos sospechosos de leptospirosis humana, mediante el uso de los estuches comerciales de diagnóstico rápido de lepto tek dri dot y lepto tek dip stick, en el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Los estuches novedosos se compararon experimentalmente con las técnicas serológicas convencionales hemaglutinación indirecta (HA) y microaglutinación (MAT). El estudio fue realizado en el período de enero a mayo de 2002. De los 40 pacientes graves sospechosos estudiados, 20 fueron positivos por lepto tek dip stick y 10 por HA. Por lepto tek dri dot y MAT, 20 y 9, respectivamente, fueron positivos. Los principales serogrupos encontrados por MAT fueron: *Sejroe* y *Canicola*. La coincidencia entre las técnicas de lepto tek dip stick y HA fue del 72,5 y entre el lepto dri dot y la MAT fue del 70 %. El índice de coincidencia entre el lepto tek dip stick y lepto dri dot fue del 80 % y entre MAT y HA fue del 85,0. Este mismo parámetro, medido entre lepto tek dip stick y MAT, fue del 85,0 y entre lepto tek dri dot y HA fue del 70,0. Con la introducción de los estuches lepto tek dri dot y lepto tek dip stick fueron detectados, en los casos positivos de leptospirosis humana, anticuerpos específicos contra leptospira. De los 485 monosueros procedentes de 424 pacientes de grupo de riesgo, 19 fueron positivos y 44 reactivos por HA. Al emplear MAT, 64 y 172, respectivamente, fueron positivos y reactivos. Lepto tek dri dot detectó 134 casos positivos. El índice de coincidencia entre MAT y lepto tek dri dot fue del 59 %, para un total de 251 casos coincidentes. La introducción de la tecnología de avanzada lepto tek dri dot permitió brindar un resultado rápido y de forma inmediata para la confirmación final de cada caso en estudio.

Palabras clave: Leptospirosis, serología, diagnóstico, lepto tek dip stick y lepto tek dri dot.

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa, emergente, aguda y de amplia distribución mundial. Las leptospiras, como agentes etiológicos, infectan principalmente a animales domésticos y salvajes. El hombre puede sufrir la enfermedad al exponerse al contacto directo con sangre, orina, otros fluidos, tejidos y órganos de animales infectados o a través de la exposición a un ambiente contaminado (aguas y suelos) con dichas bacterias.

El diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana está basado en la realización de técnicas bacteriológicas, serológicas y de biología molecular. Los métodos bacteriológicos empleados en el laboratorio, fundamentalmente el cultivo, realizados a

partir de muestras de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), brindan una prueba irrefutable de la etiología de la enfermedad, ya que son ensayos directos que permiten el aislamiento, identificación y clasificación de este grupo bacteriano. Las técnicas bacteriológicas brindan un diagnóstico confirmativo, pero retrospectivo, de la enfermedad. El prolongado tiempo de ejecución, la obtención de los resultados y la laboriosidad de estos, impiden ofrecer un diagnóstico rápido y temprano.

El diagnóstico de laboratorio depende, principalmente, de la confirmación serológica realizada al aplicar numerosas técnicas indirectas. Estas brindan un diagnóstico confirmativo de la enfermedad y los resultados se obtienen de forma rápida si se comparan con el cultivo bacteriológico.

En Cuba se realiza desde 1981, a escala nacional, el diagnóstico serológico de la leptospirosis humana a través de la técnica de hemaglutinación pasiva (HA, siglas en inglés).

A partir del año 2000 se comercializan 2 estuches para el diagnóstico serológico y rápido de la leptospirosis humana: lepto tek dri dot y lepto tek dip stick, ambos de procedencia holandesa. Las ventajas más relevantes que presentan estos estuches radican en la rapidez con la que se obtienen los resultados, en que no requieren de equipamiento sofisticado para su ejecución, que ambos detectan anticuerpos a leptospiras y que son altamente estables y reproducibles.

Lepto tek dip stick es un ensayo inmunoenzimático cualitativo que sirve para detectar anticuerpos IgM a leptospira biflexa serovar patoc I. Pueden evaluarse en este ensayo diferentes muestras clínicas, entre ellas las más usadas han sido: monosueros, pares de sueros, plasma, sangre total heparinizada, sangre capilar del dedo puncionado, etcétera.

Lepto tek dri dot es un preparado seco de una partícula activada y coloreada de látex unida a un antígeno de leptospira biflexa, el cual es depositado en una tarjeta de aglutinación de fondo blanco. Cuando existen anticuerpos específicos a leptospiras en las muestras empleadas, estos se unen al antígeno que tiene acoplada la partícula de látex coloreada en azul y causan diferentes grados de reacción. Los gránulos finos son equivalentes a una aglutinación específica. Mediante esta prueba se detectan anticuerpos totales producidos por más de 230 serovariantes de leptospiras.

En la presente investigación fueron evaluados los estuches de lepto tek dip stick y lepto tek dri dot, como métodos de diagnóstico rápido en casos con sospecha de leptospirosis humana, y se realizó la comparación experimental de estos con las técnicas convencionales de hemaglutinación indirecta y microaglutinación.¹⁻³

MÉTODOS

Se estudiaron 10 pares de sueros y 30 monosueros, procedentes de 40 pacientes graves sospechosos de leptospirosis. Además fueron estudiados 485 monosueros de 424 trabajadores expuestos al riesgo, todos de Ciudad de La Habana. Las muestras fueron recepcionadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras del IPK, durante el período de enero a mayo de 2002.

Métodos analíticos

Técnica de MAT (gold standard): Se empleó la metodología descrita en los lineamientos para el control, diagnóstico y vigilancia de la leptospirosis humana, editado por la Organización Mundial de la Salud.

La lectura de los resultados se basó en la observación microscópica de la mezcla de antígeno-anticuerpo, y demostró la formación de aglutinaciones específicas. El título a punto final representó la dilución, en la cual se observó el 50 % de leptospiras aglutinadas.

Hemaglutinación pasiva: Se empleó la metodología descrita en los lineamientos para el control, diagnóstico y vigilancia de la leptospirosis humana, editado por la Organización Mundial de la Salud.

Los resultados fueron interpretados como sigue:

- *Suero reactivo:* Aquel donde se observó efecto hemaglutinante en cualquier dilución realizada.
- *Título de suero:* Mayor dilución donde existió efecto hemaglutinante esperado.

Criterio de caso positivo de leptospirosis humana en muestras pareadas:

- Seroconversión entre 2 muestras (negativo a positivo).
- Seroconversión entre 2 muestras positivas, con incremento del título serológico 4 veces del segundo suero con respecto al primero.

En la técnica de lepto tek dip stick se empleó la metodología descrita por *Smiths HL* en el año 2000. De forma breve, el estuche está compuesto por una tirilla que posee 2 bandas horizontales. La banda superior es el control interno y está constituida por un anticuerpo anti-IgM humano. La banda inferior contiene el antígeno de leptospira de amplia reactividad. El ensayo se basa en la unión de los anticuerpos IgM específicos con el antígeno de leptospira, unión específicamente visualizada mediante una tinción con un conjugado anti-IgM humana. Además, presenta al reactivo A (solución reconstituyente); reactivo B (liofilizado formado por un conjugado anti-IgM humana y un colorante; reactivo C (solución para embeber la tirilla del dip stick) y un contenedor con suficientes tirillas y microtubillos, donde se realiza la reacción.

El proceder técnico se describe a continuación: se reconstituyó el reactivo B en el reactivo A. Luego en un microtubo del estuche comercial se añadieron 250 mL de la solución (AB) y 5 mL de suero. Posteriormente, se tomó una tirilla comercial y se embebió en la solución C durante 1 min, se introdujo en el microtubo y se incubó a temperatura ambiente durante 3 h o a 37 °C por 2 h. Pasado este tiempo, se eliminó el reactivo de detección con suficiente agua fresca y se dejó secar la tirilla en la oscuridad a temperatura ambiente. Cuando estuvo seca se realizó a simple vista la lectura e interpretación de los resultados. Finalmente se consideró como:

- *Suero positivo:* Aquel en el que apareció una banda superior roja (de control interno) y otra banda con el antígeno (inferior) teñida de rojo. Que indicaba una

reacción positiva. La intensidad de coloración positiva se consideró desde 2 + y hasta 4 +.

- *Suero negativo*: Aquel donde no hubiera aparecido una banda inferior teñida de rojo y sí la banda superior (control interno).

Técnica leptotek dri dot: Se empleó la metodología descrita por *Smiths HL* en el año 2000. Con la precaución de rotular cada tarjeta, se adicionó dentro del área marcada por círculo 10 mL de suero. Con el uso de una espátula se homogenizó el suero con el antígeno, se rotó la tarjeta durante 30 segundos y al cabo de este tiempo se clasificó la reacción en positiva, débil positiva y negativa. El grado de aglutinación dependió de la cantidad de antígeno y anticuerpo reaccionante. Las aglutinaciones muy fuertes y bien visibles a los 30 segundos se consideraron pertenecientes a casos con una infección reciente. La confirmación final del caso se analizó tomando en consideración la clínica, la epidemiología y otro examen de laboratorio, además del leptotek dri dot:

- *Resultado fuerte positivo*: Cuando se visualizó una aglutinación de grumos gruesos de color azul en el fondo a los 30 segundos.
- *Resultado débil positivo*: Cuando se visualizó una aglutinación de grumos muy finos de color azul en el fondo en un tiempo igual a 30 segundos.
- *Resultado negativo*: Cuando no existió ninguna reacción de aglutinación después de 30 segundos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lepto tek dip stick ha sido un método validado internacionalmente. En 1999, *Sehgal SC* publicó sus resultados relacionados con la aplicación de este método en la India. En este sentido estudió pacientes con la enfermedad en fase aguda y demostró la utilidad del sistema.

Smiths HL reportó en Holanda el primer estudio multicéntrico realizado con la participación de 12 países con diferentes grados de endemicidad y diferentes sistemas de vigilancia de 5 continentes, que fueron los evaluadores del sistema en el diagnóstico de la enfermedad. Particularmente en este segundo estudio se demostró que el método de leptotek dip stick es muy útil como herramienta de diagnóstico de leptospirosis, y además que presenta una aceptable aplicación en países donde esta enfermedad es endémica, con posibilidad de aplicarse en estudios de terrenos con condiciones mínimas de equipamiento.

Lepto tek dip stick detectó 20 casos positivos dentro de los 40 en estudio, para un 50 %. Por HA se detectaron 10 casos positivos para un 25 %. De los 10 pares de sueros en estudio, 2 fueron positivos y 8 negativos por HA. Por leptotek dip stick se encontraron 8 francamente positivos y 2 negativos. La diferencia presente entre los 2 métodos puede sugerir que el estuche comercial presenta una mayor sensibilidad que la reportada por el método convencional HA.

El comportamiento de los 30 monosueros estudiados al utilizar los 2 métodos anteriormente citados fue el siguiente: 8 monosueros fueron reactivos por HA y 12 francamente positivos por leptotek dip stick, mientras un total de 22 monosueros fueron no reactivos por HA y 18 negativos por leptotek dip stick.

Al utilizar el estuche comercial lepto tek dip stick se han detectado más casos positivos que por HA, a pesar de que ambas técnicas detectan niveles de inmunoglobulinas de la clase IgM.

En 1999, *Smiths HL* estudió 2 665 muestras de sueros procedentes de 2 057 pacientes sospechosos de leptospirosis. De un total de 485 casos, el 87,4 % fue positivo por lepto tek dip stick. De 1 513 personas supuestamente sanas, solamente 7,2 fueron positivas mediante el uso del estuche comercial.

La sensibilidad del lepto tek dip stick resultó ser de un 60,1 % al estudiar los sueros correspondientes a la fase aguda de la enfermedad y de un 87,4 al estudiar las muestras séricas de la fase convaleciente. La especificidad en estos 2 grupos fueron de un 94,1 y un 92,7 % respectivamente.

Al utilizar la MAT en los 10 pares de sueros, 6 fueron positivos (seroconvirtieron de negativo a positivo), 2 pares presentaron aumento del título serológico al doble, y el último resultó negativo al seroconvertir de reactivo a no reactivo.

Lepto tek dri dot detectó 9 pares de sueros positivos y 1 negativo, de los 10 estudiados. De 30 monosueros, 5 fueron reactivos por MAT y 11 positivos por lepto tek dri dot, mientras 25 monosueros fueron no reactivos por MAT y 19 negativos por lepto tek dri dot.

La técnica de MAT como *gold standard* para el diagnóstico de la leptospirosis humana ha sido utilizada recientemente por algunos investigadores. Por ejemplo, en 1997 *Gusseenhoven G* comparó MAT con lepto tek dri dot. En este estudio todos los sueros con reactividad al lepto tek dri dot resultaron positivos por MAT.

De los 40 casos estudiados, 20 fueron positivos por lepto tek dri dot y 9 por MAT. Existieron 11 casos positivos por lepto tek dri dot que no lo fueron por MAT. Lepto tek dri dot presentó una mayor sensibilidad al detectar un mayor número de casos. Ambos métodos: lepto tek dri dot y MAT detectan anticuerpos totales a leptospiras. Estos anticuerpos pueden aparecer en la etapa temprana de la enfermedad y persistir durante la convalecencia. Lepto tek dri dot aventaja a MAT ya que es un método muy rápido y simple de realizar, y es capaz de reconocer en 30 segundos al anticuerpo específico producido contra cualquier serovar de leptospira.

Los serogrupos más frecuentes encontrados al aplicar MAT fueron: *Sejroe*, *Canicola*, *Íctero* y *Ballum*. Los títulos obtenidos fluctúan desde 1:40 hasta 1:1280 (tabla 1).

Tabla 1. Principales serogrupos leptospirales encontrados al realizar el MAT en 10 pacientes estudiados con sospecha de leptospirosis humana

No.	<i>Sejroe</i>	<i>Canicola</i>	<i>Pomona</i>	<i>Íctero</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>Ballum</i>	<i>Gripp</i>	<i>Autumnales</i>	<i>Bataviae</i>
2						-			
3	1:80	-	-	-	-	-	-	-	-
44						-			
45	-	1:40	-	-	-	-	-	-	-
64	1:40	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	1:40	-	-	-
67	1:160	-	-	-	-	-	-	-	-

70	-								
73	-	1:1280	-	-	-	-	-	-	-
75	-								
91	-	1:320	-	-	-	-	-	-	-
121	-	1:80	-	-	-	-	-	-	-
151	-	1:320	-	-	-	-	-	-	-
129	1:320	-	-	-	-	-	-	-	-
219	-	-	-	1:1280	-	-	-	-	-

Ictero: Icterohaemorrhagiae; Gripp: Grippytyphosa.

Martínez B, al aplicar en 2002 MAT en un estudio comparativo con lepto tek lateral flow, en 9 casos positivos encontró como los sergrupos más frecuentes: *Ictero* y *Canicola*. Aparecieron 3 casos de los estudiados correspondientes a *Pomona*, *Ballum* y *Sejroe*.

En la tabla 2 se muestran los resultados del estudio comparativo entre las 4 técnicas en estudio. De los 40 casos, 20 fueron positivos por lepto tek dip stick y lepto tek dri dot, mientras 10 y 9 lo fueron por HA y MAT, respectivamente.

Tabla 2. Resultados del estudio comparativo entre las técnicas de lepto tek dip stick, HA, lepto tek dri dot y MAT en los 40 pacientes sospechosos de leptospirosis

	Lepto dip stick	%	HA	%	Lepto dri dot	%	MAT	%
Positivos/reactivos	20	50	10	25	20	50	9	22,5
Negativos/no reactivos	20	50	30	75	20	50	31	77,5
Total	40	100	40	100	40	100	40	100

Como se observa, los estuches serológicos usados detectaron un mayor número de casos positivos que los métodos convencionales de HA y MAT. A pesar de que el lepto tek dip stick detecta anticuerpos IgM y el lepto tek dri dot detecta anticuerpos totales, fueron capaces de detectar 10 y 11 casos, respectivamente, por encima de HA y MAT.

El índice encontrado entre lepto tek dip stick y HA fue de un 72,5 %; entre lepto tek dri dot y MAT de un 70,0; entre MAT y lepto tek dri dot de un 70,0; entre lepto tek dri dot y lepto tek dip stick de un 80,0; entre MAT y HA de un 85,0; entre lepto tek dip stick y MAT del 85,0 y entre lepto tek dri dot y HA de un 70,0.

Smiths HL encontró en 1999 un índice de coincidencia entre el lepto tek dip stick y ELISA de un 93,2 %, con un valor de kappa de 0,76.

Martínez B encontró en el año 2002 un índice de coincidencia del 73 % entre el estuche de lepto lateral flow y HA y del 89 % entre el estuche de lepto tek lateral flow y MAT. Estos 2 estuches han permitido realizar, de forma rápida, el diagnóstico de leptospirosis humana en los casos graves con indefinición diagnóstica. El uso oportuno de ambos

permitió ofrecer, de forma confiable y segura, una respuesta rápida a las autoridades ministeriales.

No existen precedentes reportados en América Latina que indiquen el uso del leptotek dri dot en el diagnóstico de esta entidad. Los reportes que existen son sobre el uso de leptotek dip stick y todos coinciden en que es un método muy valioso y útil.

Se debe tener presente que el leptotek dip stick no mide respuesta IgG. Por lo tanto, aquí la sensibilidad definitiva radica sobre el MAT. Solo 7 casos fueron positivos por leptotek dip stick y la MAT, o sea, esta última fue capaz de detectar anticuerpos IgM en estos casos, que también fueron positivos por el leptotek dip stick.

El leptotek dri dot fue capaz de detectar 8 casos positivos, los cuales presentan anticuerpos IgM, ya que fueron positivos por HA. Los 32 restantes presentan o no anticuerpos IgG.

De las 424 personas expuestas al riesgo de contraer la enfermedad, 19 y 44, respectivamente, fueron positivas y reactivas por HA. Al aplicar MAT los resultados fueron 64 positivos y 172 reactivos. Leptotek dri dot detectó 134 casos positivos. El índice de coincidencia entre MAT y leptotek dri dot fue del 59 %, y coincidieron un total de 251 casos.

En conclusión, las técnicas de leptodip stick y leptodri dot fueron los métodos de diagnóstico más rápidos en pacientes graves con sospecha de leptospirosis, mientras los serogrupos leptospirales más frecuentes encontrados por MAT fueron *Sejroe* y *Canicola*.

SUMMARY

Leptotek dip stick and leptotek dri dot, useful techniques in rapid diagnosis of human leptospirosis

Serious cases and risk groups suspected of having human leptospirosis were studied by means of rapid diagnosis kits known as leptotek dri dot and leptotek dip stick in the National Reference Laboratory of *Leptospira* of "Pedro Kouri" Tropical Medicine Institute (IPK). The new kits were experimentally compared with the conventional serological techniques such as indirect hemagglutination (HA) and microagglutination (MAT). The study was conducted from January to May, 2002. Of 40 suspected patients in critical condition, 20 were positive according to leptotek dip stick and 10 were positive according to HA results. Twenty and nine patients were positive by leptotek dri dot and MAT test respectively. The main serogroups found by MAT were *Sejroe* and *Canicola*. The coincidence index between leptotek dip stick and HA was 72,5% whereas that of leptotek dri dot and MAT was 70%. On the other hand, the coincidence index between the two new techniques was 80 % whereas that of the conventional methods was 85 %. This same parameter measured between leptotek dip stick and MAT was 85 %, and between leptotek dri dot and HA was 70 %. The introduction of kits leptotek dri dot and leptotek dip stick made it possible to detect specific antibodies to *Leptospira* in human leptospirosis-positive cases. Of 485 sera from 424 patients

of the risk group, 19 were positive and 44 reactive by HA test. MAT revealed 64 positive and 172 reactive monosera. Lepto tek dri dot detected 134 positive cases. In this regard, the coincidence index between MAT and lepto tek dri dot was 59 % for a total number of 251 coincident cases. The implementation of the state-of-the-art technology known as lepto tek dri dot allowed achieving immediately a rapid result for the final confirmation of each case under study.

Key words: Leptospirosis, serology, diagnosis, lepto tek dip stick, lepto tek dri dot.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farr RW. Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*. 1995;21:1-8.
2. Smiths HL, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. International multicentre evaluation of dip stick assay for human leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health*. 2000;5(2):124-8.
3. Sehgal SC, Vijayachari S, Sharma S, Sugunan AP. Lepto dip stick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;93:161-4.

Recibido: 4 de julio de 2005. Aprobado: 23 de septiembre de 2005.

Lic. *Ana Margarita Obregón Fuentes*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía, Km 6. Email: amobregon@ipk.sld.cu

¹ Máster en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

² Máster en Veterinaria. Investigadora Auxiliar.

³ Técnico en Microbiología.