

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

LEPTOSPIROSIS HUMANA:

**ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DE HERRAMIENTAS DE
DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DEL
SERODIAGNÓSTICO EN DIFERENTES ETAPAS DE LA
ENFERMEDAD.**

Vanasco Norma Bibiana

Director: Héctor Dante Tarabla

Lugares de realización:

Laboratorio de Leptospirosis – FBCB – UNL

Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospirosis – INER “Dr. E. Coni” –

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS)

*Algo he aprendido en mi larga vida:
que toda nuestra ciencia, contrastada con la realidad,
es primitiva y pueril;
y, sin embargo, es lo más valioso que tenemos.*
Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Tantas personas hicieron posible que pueda llegar a este momento que es difícil expresar en pocas palabras todo mi agradecimiento.

Agradezco a la Universidad Nacional del Litoral y en especial a la Facultad de Bioquímica Ciencias Biológica por el financiamiento y muy especialmente por haberme dado un lugar (Laboratorio de leptospirosis) sin el cual no hubiese sido posible concretar el trabajo experimental de esta tesis.

Quiero agradecer a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”) y en particular al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER “Dr. E. Coni”) por su apoyo y colaboración económica, sin la cual no hubiese sido posible la realización del presente trabajo. También le agradezco a mi práctica profesional diaria en este instituto de salud pública nacional, ya que fue allí donde obtuve la experiencia y sobre todo la percepción de las necesidades de la gente en el tema de leptospirosis, para reorientar el rumbo y crear sentido día a día al esfuerzo e inspiración de mis investigaciones.

Agradezco a mi director, Dr. Héctor Tarabla, por su colaboración, su enorme confianza, aliento y consejos, como así también por estar siempre abierto a mis sugerencias.

A mis muy queridas compañeras de trabajo en el INER especialmente a Fernanda, Yosena y Carolina, también a Susana y Gabriela por su colaboración, por la buena predisposición de siempre, por haberme hecho el aguante y haberme soportado este último tiempo.

A mis muy queridos compañeros de cátedra en la Facultad Esteban y Edith también por el aguante y la buena onda de siempre.

A la Dra. Silvana Levis y Alejandra Morales del INEVH por la provisión de las muestras para evaluar la reactividad cruzada frente a otras patologías.

Al Dr. Ronald Frank del Instituto Helmholtz Zentrum fuer Infektionsforschung de Alemania por la colaboración la síntesis de las bibliotecas para la identificación de epitopes antigénicos.

Al Dr. Sergio Guerrero por su colaboración con la obtención de las proteínas recombinantes en el laboratorio de Bioquímica Microbiana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Al Dr. Marcelo Signorini por su excelente disponibilidad y su colaboración con el meta-análisis.

A Paulina por su colaboración y enorme paciencia.

Quiero agradecer muy especialmente a mi familia mi esposo Javier y mis hijas Sofía y Julieta por su incondicional apoyo, comprensión y aguante de las largas ausencias y el mal humor por el trabajo. Sin su apoyo nada de esto tendría ningún sentido.

Quiero hacer un agradecimiento muy especial a mi esposo Javier ya que realmente sin él yo no habría llegado a esta instancia, porque fue él no solo quien me impulsó y animó a iniciar el doctorado sino quien me acompañó desde el inicio hasta el final del mismo.

Finalmente a mis amigos, de aquí y de allá, los que están cerca y los que no tanto (sólo geográficamente hablando, claro), por estar allí cuando los necesité.

A todos los que de alguna manera colaboraron en el desarrollo de esta tesis doctoral.

PATENTES Y PUBLICACIONES GENERADAS POR ESTE TRABAJO DE TESIS

La presente tesis, al momento de su presentación, ha generado 3 solicitudes de Patentes de Invención, 4 Publicaciones en revistas internacionales con referato y 12 publicaciones de resúmenes de resultados en revistas o comunicaciones en congresos u otras reuniones científicas. Los últimos resultados obtenidos, serán enviados a publicar luego de su defensa.

1. PATENTES DE INVENCIÓN (3)

1.1. Título de la invención: Equipo de Enzimoinmunoensayo (ELISA) para el diagnóstico de leptospirosis humana.

Inventores: Vanasco, N. B.; Lottersberger, J. Entidad Titular: ANLIS/UNL.

INPI, Acta P-080101950, 07/05/08. Examen técnico preliminar Aprobado (04-11-08)

1.2. Título de la invención: Péptidos inmunoreactivos contra bacterias del orden de las espiroquetas, vacunas y composiciones que lo comprenden, y métodos de detección de leptospirosis.

Inventores: Lottersberger, J.; Vanasco, N. B.; Guerrero, S. A.; Tonarelli, G. G.; Frank R. Entidad Titular: UNL/ANLIS.

INPI, Acta P-080104027, 17/9/08. Examen técnico preliminar Aprobado (26-3-09)

1.3. Título de la invención: Péptidos inmunoreactivos, vacunas y composiciones que lo comprenden, y métodos de detección de leptospirosis.

Inventores: Vanasco, N.B.; Lottersberger, J.; Guerrero, S.A.; Iglesias, A.A.; Beccaría,A. INPI; Acta P-20110102347, 27/6/11.

2. PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES CON REFERATO (5)

2.1. **Vanasco, N. B.;** Lottersberger, J.; Schmeling, M. F.; Gardner, I. A.; Tarabla, H. D. (2007). *Diagnosis of leptospirosis: evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay in different stages of the disease*. Rev. Panam Salud Pública. 21(6):388-95. (Se adjunta en anexo). Citado en pag 117.

2.2. **Vanasco, N. B.;** Schmeling, M. F.; Lottersberger, J.; Costa, F.; Ko, A. I; Tarabla, H. D. (2008) *Clinical Characteristics and Risk Factors of Human Leptospirosis in*

Argentina (1999-2005). Acta Trop. 107(3): 255-258. (Se adjunta en anexo)

2.3. Lottersberger, J.; Guerrero, S.; Tonarelli, G.; Frank, R.; Tarabla, H.; **Vanasco, N. B.** (2009) *Epitope Mapping of pathogenic leptospira LipL32*. Lett. Appl. Microbiol. (5): 641-645. (Se adjunta en anexo)

2.4. **Vanasco, N. B.**; Schmeling, M.; Chiani, Y.; Lottersberger, J.; Tarabla, H. D. (2012). *Human Leptospirosis diagnosis: macroscopic agglutination test evaluation in different stages of the disease*. Salud Publica Mex 2012; 54 (5): 530-536.

2.5. Signorini, M. L.; Lottersberger, J.; Tarabla, H. D.; **Vanasco, N. B.** Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. Epidemiol Infect. 2012; 7:1-11.

3. PUBLICACIONES DE RESÚMENES DE RESULTADOS EN REVISTAS O COMUNICACIONES EN CONGRESOS U OTRAS REUNIONES CIENTÍFICAS (12)

3.1. **Vanasco, N. B.**; Lottersberger, J.; Guerrero, S. A.; Chiani, Y.; Schmeling, M. F. (2011a); Tarabla, H. D. Evaluation of ELISA antigens for leptospiral serodiagnosis in different stages of the disease. *VII Reunión de la Sociedad Internacional de Leptospirosis, Merida, Yucatan, Mexico, 19-22 de Septiembre, 2011*. Citado en pag 118.

3.2. **Vanasco, N. B.**; Lottersberger, J.; Chiani, Y.; Schmeling, M. F.; Cudos, C.; Tarabla, H. D (2011b). Usefulness of direct and indirect methods for early diagnosis of leptospirosis. *VII Reunión de la Sociedad Internacional de Leptospirosis, Merida, Yucatan, Mexico, 19-22 de Septiembre, 2011*.

3.3. **Vanasco, N. B.**; Schmeling, M. F.; Chiani, Y.; Lottersberger, J.; Tarabla, H. D. (2010) *Diagnóstico de leptospirosis: Evaluación de la Aglutinación Macroscópica como prueba tamiz en diferentes etapas de la enfermedad*. I Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis: Espiroquetas Havana 2010. La Havana, Cuba, 5-7 de Mayo de 2010. Exposición Oral.

3.4. **Vanasco N. B.** (2010) *Situación de la leptospirosis en la Argentina: vigilancia epidemiológica y diagnóstico*. Acta Bioquím Clín Latinoam; 44(3): 477-617. (ISSN: 0325-2957, Buenos Aires, Argentina).

3.5. **Vanasco, N. B.**; Schmeling, M. F.; Chiani, Y.; Guerrero, S.; Tarabla, H. D.; Lottersberger, J. (2009) *Serodiagnosis of leptospirosis by means of an enzyme-linked immunoassay using two peptides from LipL32*. 6th Annual Scientific Meeting

- of International Leptospirosis Society (ILS), Gokulam Convention Centre, Cochin, India. 21-24 Septiembre de 2009.
- 3.6. Lottersberger, J.; Viarengo, G.; Guerrero, S.; Tarabla, H.; **Vanasco, N. B.** (2009) *Mice immunization using peptides from LipL32*. 6th Annual Scientific Meeting of International Leptospirosis Society (ILS), Gokulam Convention Centre, Cochin, India. 21-24 Septiembre de 2009.
- 3.7. Lottersberger, J.; **Vanasco, N. B.**; Viarengo, G.; Schmeling, M. F.; Chiani, Y.; Guerrero, S. (2009) *Leptospirosis: estudio para la obtención de herramientas de diagnóstico precoz y específico*. III Congreso Nacional de Extensión Universitaria. Santa Fe, Argentina. 20-22 de mayo de 2009.
- 3.8. Viarengo G, **Vanasco NB**; Lottersberger J, Guerrero SA. (2008) *Expression and Purification of Leptospira interrogans Antigens*. Application in serodiagnosis. BIOCELL (Suppl.) 2008; 32: BT-P09. (ISSN: 0327.9545, Argentina)
- 3.9. Viarengo, G.; **Vanasco, N. B.**; Lottersberger, J.; Guerrero, S. (2007) *Clonado expresión y purificación de una proteína de Leptospira interrogans para su evaluación como antígeno de diagnóstico*. Undécimo segundo Encuentro de Jóvenes investigadores de la UNL y Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. Santa Fe, Argentina. 10 y 11 de Octubre de 2007.
- 3.10. Lottersberger, J.; **Vanasco, N. B.**; Viarengo, G.; Guerrero, S. A.; Ronald, F.; Tonarelli, G. G. (2007) *Epitope mapping of LipL32 protein of pathogenic leptospires*. 5th Meeting of the International Leptospirosis Society. Quito, Ecuador. 19 de Septiembre 2007.
- 3.11. **Vanasco, N. B.**; Lottersberger, J.; Schmeling, M. F.; Tarabla, H. D. (2007) *Risk factors for human leptospirosis in Argentina*. 5th Meeting of the International Leptospirosis Society. Quito, Ecuador. 18 de Septiembre 2007.
- 3.12. **Vanasco, N. B.**; Lottersberger, J.; Schmeling, M. F.; Tarabla, H. D. (2007) *Clinical and epidemiological characteristics for human leptospirosis in Argentina (1999-2005)*. 5th Meeting of the International Leptospirosis Society. Quito, Ecuador. 18 de Septiembre 2007.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1) INTRODUCCIÓN	Pág.
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA	1
2. AGENTE ETIOLÓGICO DE LA LEPTOSPIROSIS	2
2.1. Taxonomía y clasificaciones.....	2
2.1.1. Clasificación fenotípica	2
2.1.2. Clasificación genotípica	3
2.2. Morfología	4
2.3. Membrana	5
2.3.1. LipL 32/Hap 1	6
2.3.2. Usos y aplicaciones del Mapeo de epitopes	7
2.4. Filamentos axiales y movilidad.....	8
2.5. Metabolismo y cultivo	8
3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS.....	9
3.1. Modos de transmisión	9
3.2. Distribución y carga de la enfermedad a nivel mundial y nacional	10
3.3. Factores de Riesgo	11
3.4. Cambios en la epidemiología y factores de riesgo.....	12
3.5. Variedades de leptospiras y animales transmisores en Argentina.....	12
4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA LEPTOSPIROSIS	14
4.1. Etapas de la enfermedad humana.....	14
4.1.1. Fase septicémica (leptospiemia).....	15
4.1.2. Fase inmune (leptospiruria e inmunidad)	15
4.2. Principales manifestaciones clínicas	16
4.3. Respuesta inmune.....	17
4.4. Mortalidad	18
4.5. Tratamiento	18
4.6. Prevención y control.....	19
4.7. Vacunación.....	20
5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEPTOSPIROSIS.....	21
5.1. Métodos directos: demostración de leptospiras o su material genético	23
5.1.1. Amplificación y detección de ADN	23
5.1.2. Aislamiento	23
5.1.3. Tipificación	23
5.1.4. Métodos moleculares de tipificación.....	24
5.2. Métodos indirectos o serológicos: detección de anticuerpos	25
5.2.1 Microaglutinación (MAT).....	26

5.2.2. Macroaglutinación con antígeno termo resistente (TR)	28
5.2.3. Enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA)	30
5.2.4. Otros métodos serológicos	32
6. VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	33
6.1. Evaluación y revisión sistemática de métodos diagnósticos (meta-análisis)	36
2) OBJETIVOS	
1. OBJETIVOS GENERALES	37
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3) MATERIALES Y MÉTODOS	
1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS	39
1.1. Antígenos extractivos	39
1.2. Antígenos sintéticos	39
1.2.1 Mapeo de epitopes mínimos de reconocimiento de LipL32 y LipL41.....	40
1.3. Antígenos recombinantes	41
2. DISEÑO Y DESARROLLO DE LOS ENZIMOINMUNOENSAYOS	41
2.1. Preparación de las superficies de inmunocaptura	41
2.2. Definición de las condiciones óptimas del ELISA	42
2.3. Evaluación de la actividad biológica del ELISA indirecto	42
2.4. Procesamiento de las muestras, expresión e interpretación de los resultados	43
3. MÉTODOS SEROLÓGICOS DE AGLUTINACIÓN	43
3.1. Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR)	43
3.2. Test de aglutinación microscópica con antígenos vivos (MAT)	44
4. DEMOSTRACIÓN DE LEPTOSPIRAS O SU MATERIAL GENÉTICO (MÉTODOS DIRECTOS)	45
5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS	45
5.1. Muestras	45
5.2. Datos clínicos y epidemiológicos	45
5.3. Etapas de la enfermedad	46
6. CRITERIOS DE DEFINICIÓN DE CASOS.....	46
6.1. Casos Confirmados	47
6.2. Casos No Confirmados.....	47
6.3. No Casos (Casos con diagnóstico de leptospirosis descartado).....	47
6.4. Controles.....	48

6.5. Casos confirmados con otras patologías	48
6.6. Casos probables	48
7. EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	49
7.1. Diseño de los estudios	49
7.2. Muestra representativa.....	50
7.3. Punto de corte	50
7.4. Sensibilidad, especificidad e Índice de Youden	51
7.5. Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN)	51
7.6. Grado de concordancia	51
7.6.1. Evaluación del error aleatorio: concordancia intra-operador (repetibilidad) e inter-operador (reproducibilidad)	52
7.7. Evaluación de los ELISAs desarrollados y del TR.....	53
7.7.1. ELISAs.....	53
7.7.2. TR.....	53
8. ESTUDIO DE META-ANÁLISIS	54
8.1. Criterios para la selección de los estudios.....	54
8.2. Variables de resultado y definiciones.....	55
8.3. Fuente de datos.....	55
8.4. Extracción de los datos	55
8.5. Análisis estadísticos	55
9. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS Y FACTORES DE RIESGO.....	57
9.1. Distribución de las frecuencias de los datos de vigilancia	57
9.2. Comparación de pacientes con leptospirosis confirmada y sin leptospirosis	57
9.3. Factores de riesgo de leptospirosis humana.....	57
4) RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	
CAPITULO I: Obtención, identificación, evaluación y selección de antígenos extractivos, sintéticos y recombinantes para el desarrollo de reactivos de ELISA.....	59
CAPITULO II: Evaluación de un ELISA con antígeno extractivo para la detección de anticuerpos antileptospiras de tipo IgG en muestras de suero humano, en tres etapas diferentes de la evolución de la enfermedad.....	75
CAPITULO III: Evaluación de la Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR).....	86
CAPITULO IV: Evaluación de cuatro ELISAs IgG desarrollados	95
CAPITULO V: Comparación de ocho métodos diagnósticos (2 directos y 6	

indirectos), para el diagnóstico precoz de leptospirosis humana.....	105
CAPITULO VI: Meta-análisis sobre pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana	112
CAPITULO VII: Características clínico-epidemiológicas y factores de riesgo de la leptospirosis humana en Argentina	128
5) CONCLUSIONES GENERALES	138
6) BIBLIOGRAFÍA.....	141

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1. Leptospiras empleadas en la microaglutinación (MAT)	48
Tabla 2. Biblioteca de 87 pentadecapéptidos superpuestos sintetizados correspondientes a la secuencia completa de LipL32 de <i>Leptospira interrogans</i>	63
Tabla 3. Biblioteca de 115 pentadecapéptidos superpuestos sintetizados correspondientes a la secuencia completa de LipL41 de <i>Leptospira interrogans</i>	65
Tabla 4. Resultados de los diferentes ELISAs en muestras de suero de pacientes con leptospirosis Confirmada y No casos	67
Tabla 5. Condiciones óptimas definidas para cada ELISA empleando cada antígeno (Extractivo, P1, P2 y Recombinante).....	71
Tabla 6. Sensibilidad, especificidad, valor de corte del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis en tres etapas de la enfermedad, Argentina (1999 - 2005)	78
Tabla 7. Evaluación del TR como método tamiz para el diagnóstico de leptospirosis en tres etapas de la enfermedad, Argentina (2008 - 2010)	88
Tabla 8. Evaluación global del TR como tamiz diagnóstico de leptospirosis, Argentina (2008 - 2010)	89
Tabla 9. Valores de Kappa (IC95%) para las diferentes repeticiones del TR realizados intra e inter operador.....	89
Tabla 10. Evaluación de los ELISAs con antígenos Extractivos, P1, P2 y Recombinante en cada una de las etapas de la enfermedad (n _{total} = 409).....	97
Tabla 11. Evaluación global de cuatro ELISAs desarrollados con antígenos Extractivos, P1, P2 y Recombinante (n = 591)	100
Tabla 12. Concordancia intra-operador (repetibilidad) de cada ELISA con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante (n = 550)	101
Tabla 13. Descripción de los estudios incluidos en el meta-análisis.....	114
Tabla 14. Medidas resumen para el análisis estratificado.....	121
Tabla 15. Meta-regresión para determinar fuentes de heterogeneidad.....	123
Tabla 16. Presentación clínica y resultados de laboratorio de Casos Confirmados y No casos, Argentina (1999 - 2005).....	132
Tabla 17. Factores de riesgo de leptospirosis humana, Argentina (1999-2005)	133

ÍNDICE DE FIGURAS.....	Pág.
Figura 1. Micrografía de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni en microscopio electrónico de barrido de alta resolución (Bharti y col., 2003). (A) Característico extremo en forma de gancho (B) A mayor aumento	4
Figura 2. Modelo de la arquitectura de membrana (Tomada y modificada Nascimento y col., 2004). Membrana externa (OM), membrana citoplásmica o interna (IM), pared celular de PG, LPS. La OM contiene LipLs como LipL41 y LipL32 y proteínas transmembrana como la OmpL1.....	5
Figura 3. (a) Representación gráfica de la estructura cristalina de LipL32, (b) Topología de la estructura de LipL32 coloreados como en a (Vivian y col., 2009). Los elementos de la estructura secundaria están etiquetados	6
Figura 4. Naturaleza bifásica de la leptospirosis e investigaciones relevantes en las diferentes etapas de la enfermedad (Tomada y modificada de Levett, 2001).....	15
Figura 5. Esquema para la selección de estudios del meta-análisis.....	54
Figura 6. Reactividad de la biblioteca de LipL32 frente a sueros de conejo: (a) mezcla de sueros negativos (b) mezcla de sueros hiperinmunes.....	64
Figura 7. Reactividad de la biblioteca de LipL41 frente a sueros de conejo: (a) mezcla de sueros negativos y (b) mezcla de sueros hiperinmunes	66
Figura 8. (a) Diagrama de puntos y (b) Curva ROC de los resultados del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis según el criterio de la definición de casos en la etapa 1 de la enfermedad, Argentina (1999-2005)...	79
Figura 9. (a) Diagrama de puntos y (b) Curva ROC de los resultados del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis según el criterio de la definición de casos en la etapa 2 de la enfermedad, Argentina (1999-2005)...	80
Figura 10. (a) Diagrama de puntos y (b) Curva ROC de los resultados del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis según el criterio de la definición de casos en la etapa 3 de la enfermedad, Argentina (1999-2005)...	81
Figura 11. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante en la etapa 1 de la enfermedad	98
Figura 12. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante en la etapa 2 de la enfermedad	98
Figura 13. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante en etapa 3 de la enfermedad	99
Figura 14. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante, en forma global independientemente de las etapas de la enfermedad (n= 591).....	100

Figura 15. Resultados de los diferentes métodos diagnósticos en muestras de Casos Confirmados (n=24) en la etapa 1 (<10 días de evolución)	107
Figura 16. Número de Casos detectados (n=24) por cada uno de los dos métodos directos (PCR convencional y RT-PCR) por día de evolución en la etapa 1	108
Figura 17. Número de Casos confirmados (n=24) detectados por cada uno de los métodos indirectos (serológicos) por día de evolución de la etapa 1	108
Figura 18. Estimación de sensibilidad (" <i>Forest plot</i> ") de de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana	118
Figura 19. Estimación de especificidad (" <i>Forest plot</i> ") de de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana	119
Figura 20. Curva SROC de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana	120
Figura 21. Distribución mensual de los 182 Casos Confirmados de leptospirosis, Argentina (1999 - 2005).....	129
Figura 22. Distribución geográfica de las proporciones de Casos Confirmados de leptospirosis en las 11 provincias argentinas (1999-2005)...	130

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	<i>(Area Under the Curve)</i> Área bajo la curva ROC
BCIP	5-bromo-4-choro-indolylphosphate
CAAT	<i>(Cross agglutination adsortion Test)</i> Ensayo de Adsorción de Aglutinación Cruzada
CP	Control Positivo
CN	Control Negativo
DS	Desvío estándar
GL	Grados de libertad <i>(Degree Freedom)</i>
DO	Densidad óptica
DOC	Densidad óptica corregida= DOP/DON
DON	Densidad óptica media del control negativo
DOP	Densidad óptica promedio de las muestras incógnitas
ELISA	<i>(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</i> Enzimoinmunoensayo en fase sólida.
EMJH	Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris
FC	Fijación de complemento
FHA	Fiebre Hemorrágica Argentina
FN	Falsos Negativos
FP	Falsos positivos
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
Hap-1	<i>(Haemolysis associated protein-1)</i> Proteína asociada a hemólisis 1
HPLC	<i>(High-performance liquid chromatography)</i> cromatografía líquida de alta performance
IC	Intervalo de confianza
IC95%	Intervalo de confianza del 95%
IgM, IgG, IgA	Inmunoglobulinas M, G y A
ILS	Sociedad Internacional de Leptospirosis
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
LCR	Líquido Cefaloraquídeo
LipL	Lipoproteínas

LPS	Lipopolisacáridos
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica o Aminotransferasa pirúvica
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética o Aminotransferasa oxalacética
MAT	(<i>Microscopic Agglutination Test</i>) Test de aglutinación microscópica o Microaglutinación
MLST	(<i>Multilocus Sequence Typing</i>) Tipificación por secuencia de multilocus
MLVA	(<i>Multi Locus VNTR Analysis</i>) Análisis de VNTR de multilocus
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
OR	(<i>Odds-ratio</i>) Razón de momios o Razón de los Productos Cruzados
ORD	<i>Odds-ratio</i> diagnóstico
OMPs	(Outer membrane proteins) Proteínas de membrana externa
P1-ELISA	ELISA con antígeno sintético P1
P2-ELISA	ELISA con antígeno sintético P2
PBS	(<i>Phosphate buffered saline</i>) Solución salina amortiguadora por fosfatos
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	(<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i>) Fenilmetilsulfonil fluoruro
POEs	Protocolos Operativos Estándar
RDOR	(<i>Relatives diagnostics Odds-ratio</i>) <i>Odds-ratio</i> diagnóstico relativo
REC-ELISA	ELISA con antígeno recombinante (P1 más P2)
RFLP	(<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>) Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción
RNLL	Red Nacional de Laboratorios de leptospirosis
ROC	(<i>Receiver Operating Characteristics Curve</i>) Característica Operativa del Receptor o Curva de eficacia diagnóstica
RT-PCR	(<i>Real Time-PCR</i>) PCR en Tiempo Real
SROC	(<i>Summary ROC</i>) Curva ROC Resumen
SPOT	(<i>Synthetic peptide array on membrane supports</i>) Matriz en forma de puntos o manchas de péptidos sintéticos en soportes de membrana
TMB	(<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>) 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TR	Aglutinación Macroscópica con Antígeno Termorresistente o Macroaglutinación
VNTR	(<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>) Número variable de repeticiones en tandem
VSG	Velocidad de sedimentación globular
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo

RESUMEN

La leptospirosis humana es la zoonosis más ampliamente distribuida en el mundo. Sin embargo, la información publicada sobre las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad en Argentina es muy escasa. Por otra parte, dado que las técnicas diagnósticas de referencia no permiten la detección temprana de casos, es necesario desarrollar y evaluar nuevas pruebas.

Los Objetivos Generales de esta tesis fueron: 1. Desarrollar ELISAs IgG para detectar anticuerpos antileptospiras en muestras de suero humano; 2. Evaluar el error sistemático global y en diferentes etapas de la evolución de la enfermedad y el error aleatorio de los ELISAs desarrollados y de la macroaglutinación (TR); 3. Evaluar la presentación clínica y epidemiológica de los casos de leptospirosis e identificar factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad.

Se obtuvieron 11 antígenos extractivos mediante cultivo y lisado de cepas patrón de *Leptospira interrogans* y *biflexa*. Se realizó un mapeo de epitopes de LipL32 y LipL41 de *L. interrogans* serovar *Copenhageni*, identificándose dos regiones antigénicas (P1 y P2) en la LipL32. Se diseñaron y obtuvieron dos péptidos sintéticos y tres proteínas recombinantes. Posteriormente se desarrollaron cuatro ELISAs para la detección de anticuerpos IgG en muestras de suero sanguíneo utilizando cuatro antígenos elegidos en base a su capacidad discriminatoria: uno con antígeno extractivo (serovares Pyrogenes y Tarassovi), dos con péptidos sintéticos (P1-ELISA y P2-ELISA) y uno con el recombinante conteniendo la secuencia de ambos péptidos (REC-ELISA). El criterio de definición de casos incluyó los resultados de la Microaglutinación (MAT) y los antecedentes clínicos y de laboratorio general. Los tiempos de evolución se dividieron en tres etapas: 1 (<10 días), 2 (de 10 a 25 días) y 3 (>25 días).

El ELISA desarrollado con antígeno extractivo permitió en la etapa 1 mayor detección de casos que el TR, la MAT y los otros tres ELISAs, haciéndolo desde el cuarto día de evolución de la enfermedad. En la etapa 2 evidenció la mayor sensibilidad 95.6% (89,1; 98,8), especificidad 95.7% (89,2; 98,8), VPP 95,7% (89,2; 98,8), VPN 97,7% (91,9; 99,7) y AUC 0,974 (0,938; 0,992). En la etapa 3 y en la evaluación global mostró mayor AUC 0,943 (0,840; 0,988) que los otros

ELISAs y una concordancia excelente entre sus resultados. Estos hallazgos indican que en el caso de seleccionar un solo antígeno, el extractivo sería la mejor opción.

La baja sensibilidad del TR en la primera etapa, su baja especificidad y su variabilidad intra e inter-operador, indicarían que no es conveniente su utilización como única prueba tamiz.

Las AUCs de los cuatro ELISAs fueron mayores en las etapas 2 (de 0,974 a 0,787) y 3 (de 0,943 a 0,818) debido principalmente a la baja sensibilidad en la etapa 1. En coincidencia, el meta-análisis identificó que las pruebas de ELISA presentan mayor eficacia cuando se aplican en individuos en fase convaleciente.

Por lo expuesto, ningún método serológico sería capaz de resolver individual y completamente el diagnóstico en los primeros 9 días de la enfermedad. En esta primera etapa, la RT-PCR fue el método que permitió la mayor detección de casos, seguido del ELISA extractivo. Estos resultados avalan la conclusión de que un método directo, como la RT-PCR, detecta los casos de leptospirosis de forma más temprana que los métodos serológicos. Se concluye entonces en primer lugar, que RT-PCR sería el mejor método para la detección precoz de casos en muestras de hasta seis días de evolución. Luego una combinación de RT-PCR y ELISA extractivo resolvería el problema del diagnóstico en esta etapa en forma global. Finalmente si las muestras son de entre 6 y 9 días de evolución el ELISA extractivo sería la mejor opción.

El serogrupo presumiblemente infectante más frecuente fue Icterohaemorrhagie seguido de Pomona, Ballum y Canicola. La mayoría de los casos ocurrieron en adultos de sexo masculino durante los meses cálidos y lluviosos, con fiebre, dolor de cabeza y mialgia. La inyección conjuntival se manifestó en el 55% de los casos confirmados y en el 43% de los No casos. Aunque el trabajo rural continúa siendo un factor de riesgo en Argentina (OR= 3,41; 1,45-8,06), el contacto prolongado con inundaciones fue el factor más importante (OR= 4,49; 1,17-17,25).

SUMMARY

Human leptospirosis is the most widespread zoonoses in the world. However, published information on the clinical and epidemiological characteristics of the disease in Argentina is scarce. Since the reference diagnostic tests do not allow early detection of cases, it is necessary to develop and evaluate new tests.

General Objectives of this thesis were: 1. To develop IgG ELISAs to detect antileptospiral antibodies in human serum samples, 2. To evaluate the systematic error (with and without taking into account the different stages of the disease) and the random error of the ELISAs and the macroagglutination test (TR), 3. To evaluate the clinical and epidemiological characteristics of human leptospirosis and to identify potential risk factors.

Eleven antigens were obtained by culture and lysate extraction of standard strains of *Leptospira interrogans* and *biflexa*. Epitope mapping was performed on LipL32 and LipL41 from *L. interrogans* serovar Copenhageni, identifying two antigenic regions (P1 and P2) in LipL32. Two synthetic peptides and three recombinant proteins were designed and obtained. Four ELISAs were then developed to detect IgG antibodies in serum samples. Four antigens were selected based upon their discriminatory power: one extractive antigen (serovars Pyrogenes and Tarassovi), two synthetic peptides (P1 and P2 ELISAs) and one recombinant containing the sequences of both peptides (REC-ELISA). Case definition criteria included the results of the microagglutination test (MAT), medical signs and general laboratory results. Three stages of the disease were considered: 1 (<10 days), 2 (10 to 25 days) and 3 (> 25 days).

In Stage 1, extractive ELISA detected more cases than TR, MAT and any of the other three ELISAs. The latter started on the fourth day of disease evolution. In Stage 2 extractive ELISA showed the highest sensitivity: 95.6% (89.1; 98.8), specificity: 95.7% (89.2; 98.8), PPV: 95.7% (89.2; 98.8), NPV: 97.7% (91.9; 99.7) and AUC: 0.974 (0.938, 0.992). In Stage 3 and in the overall evaluation also showed larger AUC; 0.943 (0.840: 0.988) than the other ELISAs and an excellent agreement. These findings indicate that in the case of selecting a single antigen, the extractive would be the best choice.

The low sensitivity of TR in the first stage, its low specificity and high intra

and inter operator variability indicate that it is not convenient to use TR the sole screening test.

The AUCs of the four ELISAs were higher in Stage 2 (from 0.974 to 0.787) and 3 (0.943 to 0.818) due mainly to low sensitivity in Stage 1. Coincidentally, meta-analysis identified that ELISAs were most effective when applied to patients in the convalescent phase.

Based on the foregoing, no single serological method would be able to solve completely the problems of diagnosing leptospirosis the first 9 days of evolution. In this initial period, RT-PCR allowed the largest case detection, followed by extractive ELISA. The results of this study support the conclusion that direct methods, like RT-PCR, allow earlier detection of cases of leptospirosis than any of the serological methods. We conclude that RT-PCR is the best method for early detection of cases in samples taken up to day six of disease evolution. A combination of RT-PCR and extractive ELISA would be a good choice to solve the problem of diagnosis in this first Stage.

The most common presumed infecting serogroup was Icterohaemorrhagiae, followed by Pomona, Ballum and Canicola. Most cases occurred in adult males during the warm and rainy season, showing fever, headache and myalgia. Conjunctival injection was expressed in 55% of confirmed cases and 43% of no cases. Although rural labor remains to be a risk factor in Argentina (OR= 3.41, 1.45; 8.06), prolonged contact with flood was the most important single factor (OR= 4.49, 1.17; 17.25).

1

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA

La leptospirosis es la zoonosis más ampliamente distribuida en el mundo, causa enfermedad humana en forma de casos aislados o de brotes epidémicos, con mayor incidencia en regiones de clima templado o tropical (Vinetz y col., 1996; WHO, 1999).

Esta infección se destaca por su diversidad. Diferentes ecosistemas, gran cantidad y variedad de animales transmisores, diferentes actividades humanas de riesgo y amplio espectro de enfermedad humana, desde subclínica hasta una falla multiorgánica con alta mortalidad. Más aún, una nueva forma de presentación clínica descrita más recientemente, el síndrome de hemorragia pulmonar grave, se asocia con la mayor tasa de mortalidad pudiendo superar el 50% (Gouveia y col., 2008).

No es una enfermedad nueva ni de reciente aparición. El síndrome de falla multiorgánica, con ictericia y falla renal, fue reportado por primera vez en 1886 por Adolf Weill en Heidelberg (Alemania) y por ello recibe su nombre. Aunque, aparentemente una enfermedad similar fue descrita en trabajadores de alcantarillado algunos años antes y los primeros registros en la bibliografía son de principios del siglo XIX. Hay incluso quienes han sugerido que el serovar Icterohaemorrhagiae fue introducido a Europa occidental, en el siglo XVIII a través de *Rattus norvegicus* desde Eurasia (Levett, 2001).

En Argentina, es reconocida en seres humanos y reportada por primera vez por Samovici en el año 1915 en la provincia de Santa Fe (Cacchione y col., 1973). Ese mismo año el agente etiológico de la leptospirosis fue demostrado independientemente por Inada e Ido en Japón y por dos grupos de investigadores en Alemania (Levett, 2001).

La leptospirosis es reconocida desde hace unos años como una enfermedad infecciosa re-emergente (Meslin, 1997; Vinetz, 2001; Meites y col., 2004) o también emergente si se considera en nuevas poblaciones de riesgo (Levett, 2001; Sehgal y col., 2003; McBride y col., 2005; Vijayachari y col., 2008; Collen Lau y col., 2010), porque constituye un problema creciente de salud pública evidenciado por el aumento de las tasas de incidencia y múltiples brotes en todos los continentes (Lupidi y col., 1991; Sehgal y col., 1996; AAVLD, 1998; Jayaraman,

1998; Trevejo y col., 1998; Easton, 1999; Ko y col., 1999; Sanders y col., 1999; Sehgal y col., 1999; Suarez y col., 1999; Tangkanakul y col., 2005; Hartskeerl y col., 2011).

Esta enfermedad acarrea serios perjuicios no sólo para la salud pública, debido a la incidencia de casos humanos y al alto costo hospitalario, sino también a las economías regionales debido a las pérdidas de días de trabajo de los enfermos (Babudieri, 1958; Ko y col., 1999; Levett, 2001).

2. AGENTE ETIOLÓGICO DE LA LEPTOSPIROSIS

2.1. Taxonomía y clasificaciones

Las leptospiras son espiroquetas del Orden: Spirochaetales, Familia: Leptospiraceae y Género: *Leptospira*. Dentro de este género se incluyen las diferentes especies de leptospiras (Levett, 2001).

En la actualidad, se emplean dos sistemas de clasificación diferentes, uno basado en sus características fenotípicas y otro en las genotípicas. Aunque la clasificación más antigua o fenotípica es aún la norma y sigue siendo empleada debido a su correlación con la epidemiología de la enfermedad, la clasificación genotípica sigue aún en progreso y puede eventualmente reemplazar a la anterior (Plank y Dean, 2000). Por lo tanto, ambas clasificaciones siguen aún vigentes (Brenner y col., 1999; Levett, 2001).

2.1.1. Clasificación fenotípica

Según esta clasificación el género *Leptospira* se divide en **dos especies**: *L. interrogans sensu lato* (cepas patógenas) y *L. biflexa* (cepas no patógenas) (Zuerner y Bolin, 1997; Levett, 2001). Las leptospiras de cada especie se agrupan a su vez en serogrupos y el taxón básico de la clasificación es el **serovar** (Kmety y Dikken 1993). Más de 60 serovares de *L. biflexa* han sido descritos y más de 200 serovares, organizados en 24 serogrupos, son reconocidos dentro de *L. interrogans sensu lato* (Kmety y Dikken, 1993).

El ensayo de aglutinación cruzada luego de la adsorción con antígenos homólogos (CAAT, del inglés: “*Cross agglutination adsorption test*”) condujo a la

definición de serovar. La caracterización en serovares se basa en la expresión de epitopes expuestos de superficie del mosaico de lipopolisacáridos (LPS) antigénicos, mientras que la especificidad de los epitopes depende de la composición y orientación de sus azúcares (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Los serovares antigénicamente relacionados se agrupan en serogrupos, que si bien estos no tienen entidad taxonómica, son ampliamente utilizados ya que han probado ser muy útiles para comprender la epidemiología (Levett, 2001; Cerqueira y Picardeau, 2009).

Existen asociaciones características entre serovares particulares y ciertas especies animales portadoras u hospedadoras, pero la asociación no es absoluta y la base molecular para esta supuesta “especificidad del huésped de mantenimiento” es desconocida (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Así, por ejemplo, el serovar Pomona tiene como huésped principal al cerdo, Canicola al perro, Hardjo al bovino e *Icterohaemorrhagiae* a los roedores, pero cada uno de estos serovares pueden infectar transitoriamente a otros huéspedes (Acha y Szyfres, 1983). De allí que, la identificación del serovar o el serogrupo que los agrupa, es esencial para comprender la epidemiología de la enfermedad e implementar las medidas de prevención y control adecuadas (OPS, 1997).

Por décadas, la aglutinación cruzada ha sido empleada para la clasificación de *Leptospira* (Kmety y Dikken, 1993). Sin embargo el CAAT es engorroso, consume mucho tiempo, son muy pocos los laboratorios en todo el mundo que tienen la posibilidad de realizarlo y por lo tanto, la mayoría de los aislamientos no son identificados a nivel de serovar. Con la aparición y aplicación de los métodos moleculares de tipificación se hizo cada vez más evidente que el concepto de serovar no es totalmente satisfactorio, ya que puede fallar en definir cepas epidemiológicamente importantes de manera adecuada (Cerqueira y Picardeau, 2009).

2.1.2. Clasificación genotípica

La hibridación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es empleado desde hace tiempo como patrón de oro para la determinación de especies en procariontes. En base a estudios de hibridación, se incluyen actualmente dentro del género *Leptospira*, un total de **20 especies** (Yasuda y col., 1987; Ramadass y col., 1992;

Perolat y col., 1998; Brenner y col., 1999; Levett y col., 2005-2006; International Committee on Systematics Prokaryotes, 2008; Slack y col., 2008-2009; Cerqueira y Picardeau, 2009). Aparentemente hasta ahora de esas 20 especies, 7 serían patógenas, 6 de patogenicidad intermedia o desconocida y 7 no patógenas (Cerqueira y Picardeau, 2009). Las siete especies patógenas consideradas principales agentes causantes de leptospirosis son: *Leptospira interrogans* (*sensu stricto*), *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, y *L. alexanderi* (Ramadass y col., 1992; Ahmed y col., 2006; Cerqueira y Picardeau, 2009).

Hay muy poca o nula correlación entre esta nueva clasificación genómica y la anterior. Según esta última, serovares patógenos y no patógenos se encuentran dentro de una misma especie y un serovar puede pertenecer a más de una especie (Levett, 2001; Cerqueira y Picardeau, 2009). Más aún, un determinado serogrupo puede ser ubicado en varias especies diferentes (Levett, 2001). Por lo tanto, ni el serogrupo ni el serovar predicen la especie de *Leptospira* (Levett, 2001).

2.2. Morfología

Son microorganismos con forma de espiral de 0.1 μm de diámetro por 6 a 20 μm de largo, con espirales de 0.1 a 0.15 μm de amplitud. La morfología de las leptospiras es única dentro de las espiroquetas y se caracteriza por su extremo curvado en forma de gancho (Figura 1).

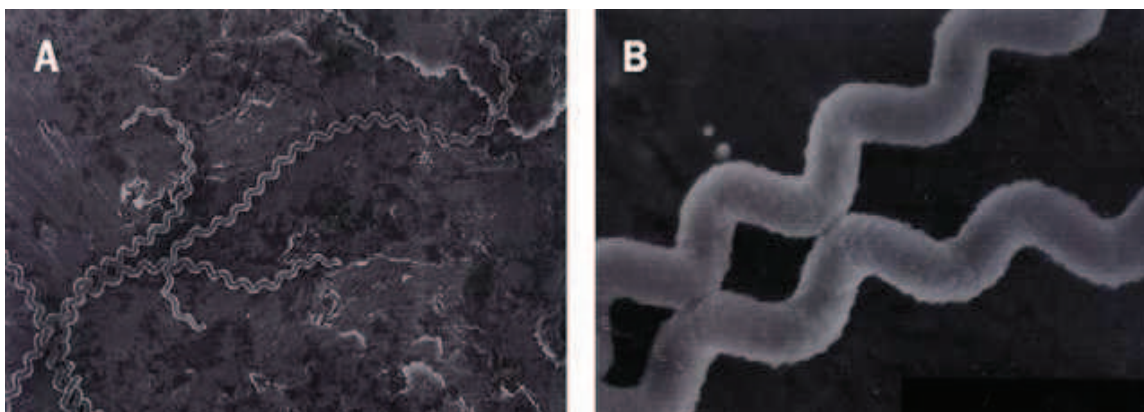


Figura 1. Micrografía de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni en microscopio electrónico de barrido de alta resolución (Bharti y col., 2003).

(A) Característico extremo en forma de gancho (B) A mayor aumento

2.3. Membrana

La envoltura externa rodea completamente el cuerpo de la célula o cilindro protoplásmico (Canale-Parola, 1977). Las leptospiras tienen la típica estructura de pared celular de doble membrana. Al igual que las bacterias Gram-negativas, poseen tanto una membrana externa como una citoplasmática, separadas por un espacio periplásmico (Holt, 1978). Sin embargo, la capa de peptidoglicano está asociada con la membrana plasmática en lugar de la membrana externa (Johnson y Harris, 1967; Holt, 1978; Haake y col., 2000b; Cullen y col., 2004). Es decir, la constitución de la doble membrana es como la de las bacterias Gram-negativas, mientras que la unión del peptidoglicano a la membrana interna se parece a la de las Gram-positivas (Haake, 2000a; Vijayachari y col., 2008) (Figura 2).

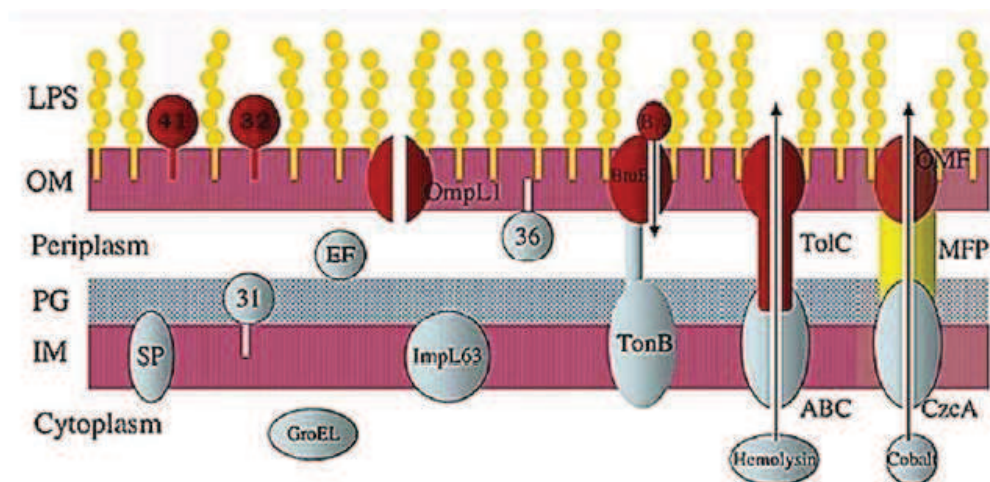


Figura 2. Modelo de la arquitectura de membrana (Tomada y modificada Nascimento y col., 2004). Membrana externa (OM), membrana citoplásmica o interna (IM), pared celular de PG, LPS. La OM contiene LipLs como LipL41 y LipL32 y proteínas transmembranales como la OmpL1.

Dentro de la membrana externa, los lipopolisacáridos (LPS) constituyen los principales antígenos (Faine y col., 1999; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Además de los LPS, forman parte de la membrana externa proteínas estructurales y funcionales (Cullen y col., 2005). Estas proteínas de la membrana externa (OMPs del inglés "Outer membrane protein") altamente conservadas son de especial importancia para el serodiagnóstico y desarrollo de vacunas (Zhang y col., 2005; Chang y col., 2007). Se han identificado tres clases de OMPs: lipoproteínas (LipL) (como LipL21, LipL32, LipL36, LipL41), proteínas

transmembrana (como OmpL1) y proteínas periféricas de membrana (como LipL45) (Zhang y col., 2005). Las lipoproteínas son las más abundantes, siendo a su vez, las de mayor abundancia relativa en la superficie celular: LipL32> LipL21> LipL41 (Cullen y col., 2005; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Natarajaseenivasan y colaboradores (2004) sugieren que LipL41 sería un buen antígeno para el desarrollo de reactivos diagnósticos de leptospirosis y concluyen que una combinación de Lip31 y LipL41 serían útiles para la detección de IgM y altamente sensibles y específicos para el diagnóstico de casos mediante la detección de IgG.

2.3.1. LipL 32/ Hap 1

La LipL 32 También denominada Hap-1 (del inglés “*haemolysis-associated protein*”), porque se le ha descrito actividad hemolítica (Branger y col., 2005). Adopta un plegado compacto y globular (Figura 3)

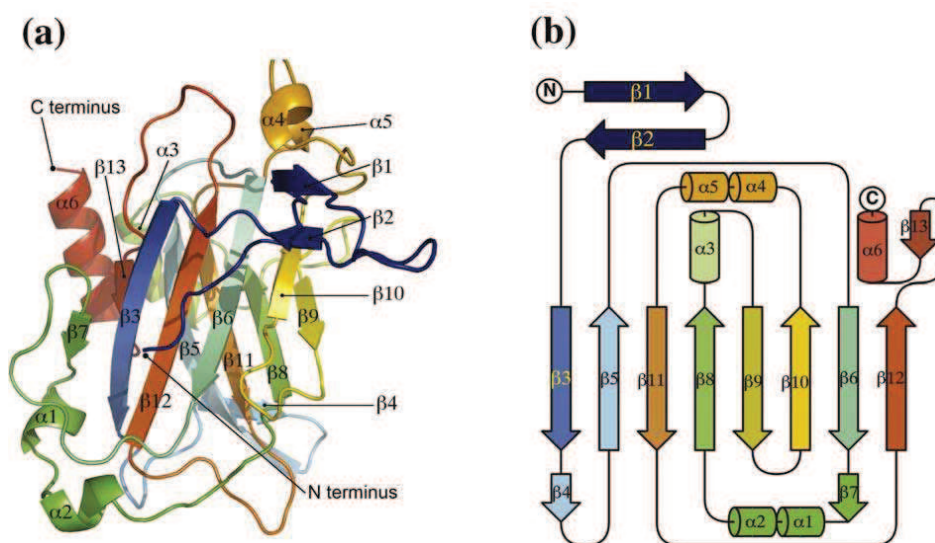


Figura 3. (a) Representación gráfica de la estructura cristalina de LipL32, (b) Topología de la estructura de LipL32 coloreados como en a (Vivian y col., 2009).

Los elementos de la estructura secundaria están etiquetados.

LipL32/Hap 1 es la proteína de membrana externa y de superficie más abundante, está solo presente en las especies patógenas de leptospirosis (Vivian y col., 2009). La secuencia y expresión de esta lipoproteína es altamente conservada dentro de las especies patógenas, pero no tiene ortólogos en las especies saprófitas (Hauk y col., 2008). Esto indica que esta LipL puede ser importante en la

patogénesis, diagnóstico y prevención de leptospirosis (Haake y col., 2000b). Es por lo tanto sorprendente que no esté involucrada ni en la infección aguda en hamsters, ni en la colonización de los riñones en ratas (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Sin embargo es una de las OMPs más inmunogénicas y la más abundante en el total del perfil proteico durante la leptospirosis humana (Zuerner y col., 1991; Haake y col., 2000b). Por otra parte, fue identificada como blanco durante la infección natural por leptospiras (Wang y col., 2007). Estos anticuerpos resultantes de una infección natural proporcionan, en algunos modelos animales, inmunidad pasiva género específica contra diferentes cepas y especies de *Leptospira* (Faine y col., 1999; Faisal y col., 2008).

Varios autores han reportado que LipL32, es la LipL de mejor utilidad serodiagnóstica (Guerreiro y col., 2001; Cullen y col., 2002; Tahiliani y col., 2005; Levett, 2007; Hoke y col., 2008). La mayoría de estos estudios utilizaron toda la molécula recombinante o grandes fragmentos de LipL32 (región C-terminal) como antígeno para diagnóstico o desarrollo de vacunas (Flannery y col., 2001; Cullen y col., 2002; Tahiliani y col., 2005; Levett, 2007; Hoke y col., 2008).

2.3.2. Usos y aplicaciones del Mapeo de epitopes

Aunque algunos autores han predicho recientemente epitopes de otras OMPs (Lig A, OmpL1, LipL 21) mediante el uso de otros métodos, como los bioinformáticos (Wiwanitkit, 2007; Lin y col., 2008a,b) o las bibliotecas de péptidos al azar (Tungtrakanpoung y col., 2006), previo a la realización de este trabajo de tesis no se han reportado mapeos de epitopes de LipL32 mediante la síntesis de péptidos superpuestos de una biblioteca cubriendo toda la longitud de una proteína.

El mapeo de epitopes y la evaluación de su inmunoreactividad con anticuerpos específicos utilizando bibliotecas de péptidos superpuestos que cubren la secuencia completa de la proteína, permite el conocimiento de los epitopes lineales de esa proteína y proporciona a su vez la obtención de moléculas pequeñas que podrían ser utilizadas como antígenos en ensayos de ELISA (del inglés: "*Enzyme-linked immunosorbent assay*"). Este método de síntesis química simultánea y en paralelo sobre una membrana es sencillo, muy flexible, y permite

obtener rápidamente y a bajo costo un gran número de péptidos para el análisis sistemático de epitopes (Frank y Overwin, 1996).

2.4. Filamentos axiales y movilidad

Tienen dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) con inserción polar y localizados en el espacio periplásmico que son responsables de su movilidad, las proteínas FlaA y FlaB constituyen la vaina y el núcleo respectivamente (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Poseen dos formas de movimiento: traslacional y no traslacional (Levett, 2001).

2.5. Metabolismo y cultivo

Las leptospiras son incapaces de sintetizar ácidos grasos y, en la naturaleza, sólo se reproducen dentro de los huéspedes animales (Acha y Szyfres, 1983; Plank y Dean, 2000). Son aerobios obligados, Gram negativos y con un crecimiento óptimo a 28-30 °C (Staneck y Henneberry, 1973). Crecen en medios enriquecidos con vitaminas B1 y B12, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio (Staneck y Henneberry, 1973). Los ácidos grasos de cadena larga son utilizados como única fuente de carbono y son metabolizados por β oxidación (Faine, 1999). Actualmente, el medio de cultivo más ampliamente utilizado es el medio Ellinghausen - McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH) que tiene como componentes esenciales 1% de albúmina de suero bovino y tween 80 (fuente de ácidos grasos de cadena larga) (Ellinghausen y McCullough, 1965). Algunas cepas requieren el agregado de suero de conejo y piruvato para el aislamiento inicial (Lesley y col., 1984).

Las muestras de sangre o líquido cefaloraquídeo (LCR) pueden ser obtenidas en heparina u oxalato de sodio y mantenidas y transportadas a temperatura ambiente, pero nunca se debe usar citrato como anticoagulante porque es inhibitorio del desarrollo (Faine, 1982).

El crecimiento de leptospiras es generalmente muy lento, el tiempo de duplicación es de 6 - 8 hs, los cultivos deben ser retenidos hasta las 13 semanas (4 meses) antes de descartarlos como negativos (Levett, 2001; WHO-ILS, 2003).

3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPTOSPIROSIS

3.1. Modos de transmisión

La leptospirosis es una zoonosis que afecta tanto a los animales como al hombre. Los primeros constituyen los principales transmisores de la infección, mientras que los seres humanos son hospedadores accidentales poco eficientes en la transmisión (Hartskeerl y Terpstra, 1996).

Las leptospiras se establecen crónicamente en los túbulos renales proximales de reservorios mamíferos domésticos y salvajes (Babudieri, 1958; Faine, 1994; Maciel y col., 2008). Desde los riñones, son excretadas a través de la orina y pueden contaminar el suelo, aguas superficiales, ríos, arroyos o lagunas (Levett, 2001). Un animal infectado puede permanecer asintomático y eliminar bacterias en la orina por toda su vida (Faine, 1999; Maciel y col., 2008).

La fuente de infección humana es el contacto directo o indirecto con animales infectados. La infección se adquiere por *contacto directo* con orina, fluidos corporales o tejidos de animales infectados o *indirectamente* mediante el contacto con agua, suelos u otros materiales húmedos contaminados con orina (Bharti y col., 2003; WHO-ILS, 2003; McBride y col., 2005). La transmisión directa de persona a persona es excepcional (Bolin y Koellner, 1988; Vijayachari y col., 2008). El mayor modo de transmisión a los humanos es por contacto indirecto con agua o suelo húmedo contaminado con orina de animales infectados (Bharti y col., 2003; WHO-ILS, 2003; McBride y col., 2005; Maciel y col., 2008).

La vía de entrada del microorganismo al hombre es a través de heridas en la piel o mucosas de la boca, nariz, ojos u oídos, pudiendo incluso penetrar a través de piel íntegra macerada (OPS, 1997).

Para que exista transmisión de la infección es necesario que, además de existir los animales infectados, se den las condiciones ambientales favorables para la supervivencia del agente causal en el medio exterior. Se requiere alto grado de humedad ambiental, pH neutro o ligeramente alcalino y temperaturas de entre 20 y 30°C (Badudieri, 1958; Levett, 2001). Fuera del cuerpo animal solo pueden sobrevivir en agua fresca o suelos húmedos por meses (Plank y Dean, 2000).

3.2. Distribución y carga de la enfermedad a nivel mundial y nacional

Existe en ambientes rurales y urbanos tanto de países industrializados como en vías de desarrollo (Bharti y col., 2003). En países desarrollados, está asociada a actividades recreacionales, turismo y deportes acuáticos (Levett, 2001; Nascimento y col., 2004; Maciel y col., 2008). En cambio, en países en vías de desarrollo es una enfermedad endémica en poblaciones urbanas y la infección está asociada con actividades agrícolas, contacto con animales (roedores o perros), abundantes lluvias e inundaciones (Nascimento y col., 2004; Maciel y col., 2008; Lau y col., 2010), y en poblaciones rurales con la agricultura de subsistencia, arrendamiento y cría de animales de granja (Faine y col., 1999; Levett, 2001; Maciel y col., 2008; Lau y col., 2010).

Su ocurrencia se ve favorecida por las condiciones ambientales en regiones de climas cálidos y húmedos donde la elevada temperatura y los períodos del año con altos índices pluviométricos favorecen la aparición de brotes epidémicos de carácter estacional (OPS, 1997; Levett, 2001; Adler y de la Peña Montezuma, 2010). Con el cambio climático, se espera que ocurran desastres naturales como inundaciones, con mayor frecuencia y potencialmente puedan conducir a un aumento en la incidencia general y en la frecuencia de brotes de leptospirosis (Lau y col., 2010).

La carga humana global de la enfermedad es aún desconocida por ser una enfermedad muy desatendida y la incidencia estimada de 500.000 casos graves cada año, con tasas de letalidad superiores al 30%, es una subestimación (Hartskeerl y col., 2011).

En Argentina, se sabe que causa numerosos casos aislados y brotes, tanto rurales como urbanos, durante los períodos estacionales de abundantes lluvias e inundaciones (AVLDL, 1994, Vanasco y col., 2000b; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2004). Aunque se ha avanzado mucho en la vigilancia epidemiológica, de ésta y otras enfermedades, en los últimos años (SNVS, 2011), ***la información sobre la carga de la enfermedad o la real incidencia de casos de leptospirosis en nuestro país es aún limitada.*** En este sentido la vigilancia desde el laboratorio es la que brinda la información más específica por basarse en casos confirmados.

La sub-notificación de casos al sistema nacional de vigilancia es

generalmente atribuida a: la falta de profesionales conocedores de la enfermedad para llevar a cabo el diagnóstico clínico, la existencia de formas clínicas inespecíficas que dificultan el diagnóstico diferencial con otras patologías y la falta de laboratorios en condiciones de realizar las pruebas diagnósticas específicas (Cacchione y col., 1973). Esto último se evidencia claramente en nuestro país ya que las provincias con mayor notificación e incidencia de casos son casualmente las provincias de Santa Fe y Buenos Aires, donde están establecidos los laboratorios de referencia (AAVLD, 2002; SNVS, 2011). Además por ejemplo los registros de casos difieren mucho entre provincias vecinas con características epidemiológicas y ambientales muy similares (SNVS, 2011). Por esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Internacional de Leptospirosis (ILS) reconocen como prioritario el desarrollo de técnicas de fácil utilización e implementación en cualquier laboratorio para aumentar la cobertura del diagnóstico en todo el mundo.

3.3. Factores de Riesgo

Los principales factores de riesgo para adquirir la infección humana están asociados a exposiciones *ocupacionales, recreacionales o vocacionales* (Levett, 2001).

La *ocupación* es un factor de riesgo significativo en seres humanos (Waitkins, 1986). Algunos ejemplos de grupos de riesgo por contacto directo con animales infectados son: granjeros, agricultores, veterinarios y matarifes y por contacto indirecto: mineros, soldados, pescadores, trabajadores de acantarillado y cloacas, cosechadores de arroz, caña de azúcar o banana (Levett, 2001).

Existe un significativo riesgo asociado con actividades *recreacionales* por las exposiciones que ocurren durante deportes acuáticos como nadar, hacer canotaje, kayak o "*rafting*", y también la caza o excursionismo (Levett, 2001; Haake y col., 2002, Lau y col., 2010). Durante eventos competitivos existe un potencial riesgo de exposición a un gran número de individuos y se han descrito numerosos brotes asociados a actividades acuáticas (CDC, 1997; CDC, 1998; CDC, 2001; Levett, 2001).

Algunos casos esporádicos de leptospirosis pueden ser adquiridos luego

de exposiciones por actividades *vocacionales* que ocurren durante la vida diaria tales como: caminar descalzo en ambientes húmedos y hacer jardinería con las manos desnudas (Levett, 2001).

3.4. Cambios en la epidemiología y factores de riesgo

Los factores de riesgo varían significativamente entre países, y dependen de numerosas variables, culturales, ambientales y ecológicas (Lau y col., 2010). Estos factores pueden variar a su vez con el tiempo conforme estas condiciones se van modificando, pudiendo desaparecer algunos y emerger nuevos grupos de riesgo. En países desarrollados como Australia por ejemplo, la leptospirosis era tradicionalmente una enfermedad ocupacional, que afectaba a hombres que trabajaban en granjas e industrias ganaderas (Lau y col., 2010). Sin embargo, la exposición recreacional y los viajes internacionales han emergido como factores de riesgo significativos de infección en la última década (Slack y col., 2006; Lau y col., 2010). Por otra parte también, en países en vías de desarrollo como Brasil, la leptospirosis pasó de ser una considerada una enfermedad rural esporádica, a ser principalmente urbana (Ko y col., 1999). El mayor factor de riesgo de leptospirosis severa es vivir en los barrios pobres, que carecen de condiciones básicas de saneamiento, en la periferia de la ciudad (Ko y col., 1999; Mc Bride y col., 2005). De allí que la vigilancia epidemiológica y la investigación de los factores de riesgo en cada país y en cada región, son esenciales para monitorear los cambios ecológicos y epidemiológicos que pudieran re-direccionar tanto las intervenciones clínicas como de salud pública para esta enfermedad.

En Argentina no eran conocidos los factores de riesgo que afectaban la transmisión de leptospirosis y no existían antecedentes de estudios epidemiológicos previos de identificación y cuantificación de factores de riesgo.

3.5. Variedades de leptospiras y animales transmisores en Argentina

En nuestro país existen numerosos antecedentes de aislamientos en diferentes especies animales (Alexander, 1960; AAVLD, 2002; Vanasco y col., 2000a; Vanasco y col., 2003a), pero hay muy pocas evidencias y no muy bien

documentadas de aislamientos de casos humanos, o son demasiado antiguos. Por otro lado, la casi totalidad de los estudios serológicos de leptospirosis son a partir de muestras humanas o de animales domésticos con sospecha clínico-epidemiológica, derivados al laboratorio para su confirmación. Es decir, solo son orientadores sobre las variedades de leptospiras presentes y su abundancia relativa, pero no indican prevalencia real en población general. Más aún, el único antecedente en muestras humanas relevante, es además muy antiguo, ya que fue publicado hace ya más de treinta años y contiene datos de resultados de seropositividad recolectados durante los veinte años previos (Cacchione y col., 1980).

El serogrupo *Icterohaemorrhagiae* fue aislado con frecuencia de ratas (*Rattus rattus* y *norvegicus*), pero también se aisló de otras especies de roedores, de caninos y aparentemente de seres humanos (AAVLD, 2002; Vanasco y col., 2003). Este serogrupo es además uno de los de mayor seropositividad en perros, caballos, ovejas, cerdos y cabras (Cacchione y col., 1975; Cacchione y col., 1980; AAVLD, 2002).

El serogrupo *Canicola* se aisló principalmente de perros pero también de bovinos y aparentemente de seres humanos (AAVLD, 2002). El serogrupo *Pomona* fue frecuentemente aislado de cerdos y bovinos y de casos humanos (Alexander, 1960; AAVLD, 2002). El serovar *Hardjo* (serogrupo *Sejroe*) ha sido únicamente aislado de caballos y bovinos sanos (Myers y col., 1975; Myers, 1976; AAVLD, 2002). El serogrupo *Ballum* fue aislado principalmente de *Mus musculus* o roedores urbanos y un aislamiento muy antiguo en ovino (Cacchione y col., 1961); mientras que *Tarassovi* se aisló solo de cerdos (Cacchione y col., 1973; Vanasco y col., 2000a; AAVLD, 2002). Existieron algunos aislamientos de *Grippotityphosa* y *Bataviae* en especies silvestres, así como algunos aislamientos sin tipificar (AAVLD, 2002). Recientemente fueron detectados aislamientos y seropositividad en animales silvestres, principalmente de serovares incluidos dentro de estos mismos serogrupos (Grune y col., 2011).

El único antecedente de seropositividad en humanos con muestras de diferentes regiones del país describe en 1.849 muestras un 18,2% de positividad al test de aglutinación microscópica (MAT, del inglés: "*Microscopic Agglutination*

Test”), siendo el principal serogrupo reaccionante Icterohaemorrhagiae (24%), el segundo fue Australis (19%) y el resto se distribuyó entre otros 11 serogrupos (Cacchione y col., 1980).

A nivel nacional, se desconocen actualmente cuáles son las variedades de leptospiras infectantes y se desconocían hasta la realización de este estudio los serogrupos seroprevalentes y presumiblemente infectantes más frecuentes en seres humanos.

4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA LEPTOSPIROSIS

Los determinantes de la enfermedad están presumiblemente relacionados con: factores asociados a la exposición (como tamaño del inóculo durante la infección), y factores del huésped y virulencia de las leptospiras infectantes (McBride y col., 2005).

Los mecanismos causales de las manifestaciones clínicas de leptospirosis son aún desconocidos (Bharti y col., 2003). Antiguamente se consideraba que distintos síndromes clínicos se asociaban con serogrupos específicos, pero estudios realizados en los últimos 30 años han refutado esta hipótesis (Levett, 2001; Vinetz, 2001).

El espectro de síntomas de enfermedad humana asociada con leptospirosis es extremadamente amplio (Levett, 2001; Bharti y col., 2003). Los síntomas de la enfermedad pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades febriles tales como dengue, fiebres hemorrágicas, hantavirus y hepatitis (AVLDL, 1994; Kobayashi y col., 2005). La infección por leptospiras puede ser desde subclínica hasta causar falla multiorgánica severa, con compromiso hepático, renal y/o pulmonar, asociada a una alta mortalidad (Farr, 1995; Perani y col., 1998; Bharti y col., 2003; McBride y col., 2005).

4.1. Etapas de la enfermedad humana

El período de incubación promedio es de 10 días con un rango de 2 a 20 días (Levett, 2001). La propagación de la bacteria en el cuerpo causa los signos y síntomas de la enfermedad (Nascimento y col., 2004; Asmad y col., 2005). Típicamente, el curso de la enfermedad es bifásico (Farr, 1995; Levett, 2001;

Bharti y col., 2003) (Figura 4).

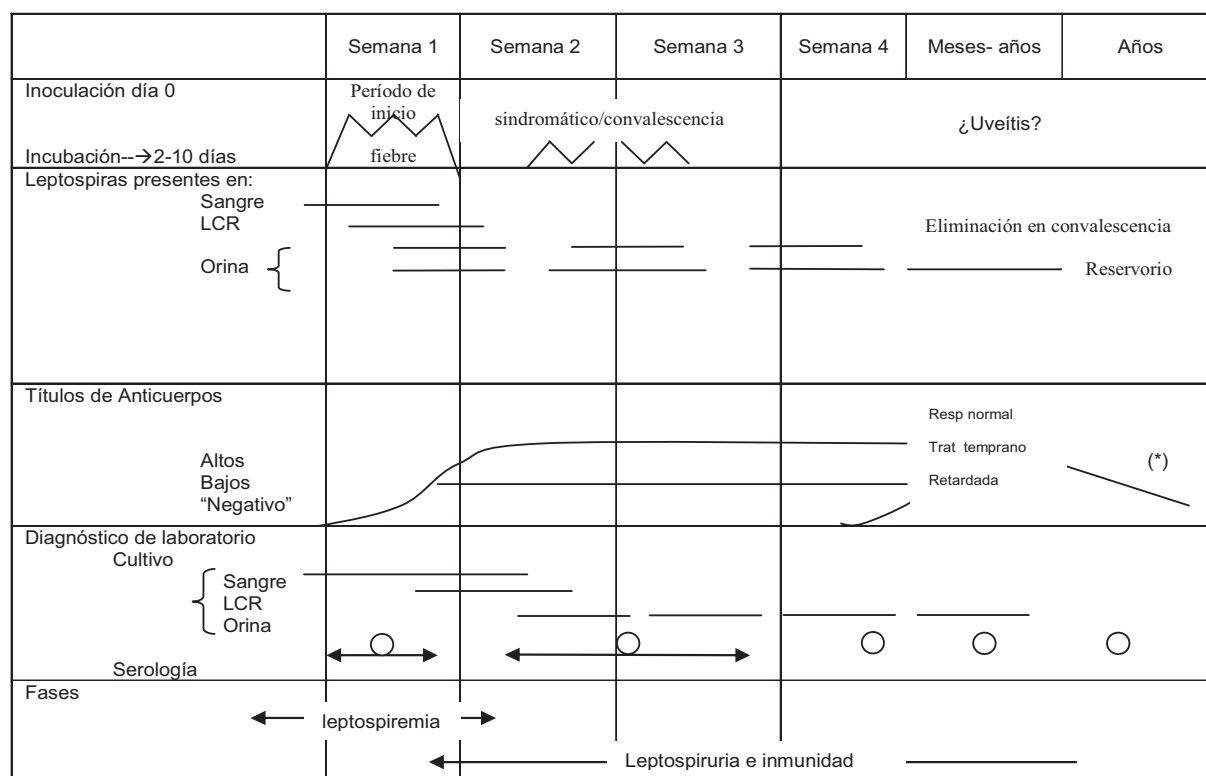


Figura 4. Naturaleza bifásica de la leptospirosis e investigaciones relevantes en las diferentes etapas de la enfermedad (Tomada y modificada de Levett, 2001).

4.1.1. Fase septicémica (leptospiremia)

Comienza repentinamente con cefalea, fiebre, malestar general, mialgia, escalofríos, anorexia, náuseas y vómitos (Bharti y col., 2003; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Esta etapa, en la que las leptospiras circulan en el torrente sanguíneo, dura aproximadamente 7 días (Bharti y col., 2003, Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). De allí que, durante esta primera fase, es posible aislar leptospiras de muestras de sangre o LCR.

4.1.2. Fase inmune (leptospiruria e inmunidad)

El inicio de esta segunda fase de la infección coincide con la aparición de anticuerpos (Levett, 2001) acompañados por la excreción de espiroquetas en la orina (Bharti y col., 2003). Durante esta fase sólo es posible aislar leptospiras a partir de muestras de orina, sin embargo, el aislamiento es más dificultoso dado que la eliminación de leptospiras no es constante (Levett, 2001), y la sobrevivencia de

las leptospiras es menor, requiere de la rápida neutralización y son más frecuentes las contaminaciones (Ahmad y col., 2005).

Esta etapa puede durar desde unos pocos días hasta varias semanas. La mayoría de las complicaciones de la leptospirosis están asociadas con la localización de las leptospiras en los diferentes tejidos durante la fase inmune y esto ocurre durante la segunda semana de la enfermedad (Levett, 2001).

4.2. Principales manifestaciones clínicas

La mayoría de las infecciones son formas sub-clínicas o muy suaves, se recuperan sin ninguna complicación y sin requerir atención médica (Faine, 1994; Plank y Dean, 2000; Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Vijayachari y col., 2008; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). La alta proporción de casos leves e incluso asintomáticos, constituyen un problema al momento de la selección de controles sanos para evaluar métodos diagnósticos, más aún en zonas endémicas; porque existe una elevada probabilidad de hallar individuos sanos con anticuerpos específicos que serían identificados erróneamente como falsos positivos del método evaluado.

Cerca del 90% de los pacientes tienen una forma anictérica suave, mientras que el 5-10% experimentan una forma más severa con ictericia, falla renal y hepática, y manifestaciones hemorrágicas, conocido como síndrome de Weil o síndrome hepato-renal (Plank y Dean, 2000; Bharti y col., 2003). Más aún, hay estudios que sugieren que la infección asintomática con *Leptospira* es frecuente en zonas endémicas (Bharti y col., 2003).

La real incidencia de compromiso pulmonar no es clara pero puede variar entre el 20 y 70% (Bharti y col., 2003). Los pacientes pueden presentar síntomas que van desde tos, disnea, y hemoptisis hasta la hemorragia y distres pulmonar del adulto (Bharti y col., 2003). Esta forma de presentación pulmonar es cada vez más frecuente a nivel global y en nuestro país en particular (datos no publicados). La falla renal aguda es reportada en 16-40% de los casos y es usualmente no oligúrica (Bharti y col., 2003).

Los síntomas y signos más frecuentes de la leptosporiosis aguda son: fiebre, mialgias y cefalea intensas (con dolor retro-orbital y fotofobia) y luego

manifestaciones gastrointestinales, como vómitos, alteraciones del tránsito y dolor abdominal, inyección conjuntival y síndrome meníngeo en la segunda semana de evolución (Bharti y col., 2003; Zunino y Pizarro, 2007).

Las tasas de incidencia de los diferentes signos y síntomas varían según la localización y magnitud de los diferentes estudios (Plank y Dean, 2000; Zunino y Pizarro, 2007). ***En Argentina, no había tasas de frecuencias de datos clínicos, solo existían descripciones de pocos casos o casos puntuales.*** En los brotes registrados en nuestro país, la forma de presentación clínica más común incluye síntomas inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza y mialgias (Vanasco y col., 2000b-2002-2004).

4.3. Respuesta inmune

Aunque es un tema de mucha controversia, está generalmente aceptado que las espiroquetas patógenas son patógenos extracelulares (Cullen y col., 2004). La inmunidad contra la enfermedad es predominantemente humoral (Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Collins, 2006; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Una vez que los anticuerpos circulantes aparecen, las bacterias son removidas de la circulación y los tejidos mediante opsonofagocitosis (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). La inmunidad celular (linfocitos T, fagocitos y células “*natural killer*”) pueden ser responsable de las manifestaciones tardías de la enfermedad (Collins, 2006). La inmunidad está fuertemente restringida a los serovares homólogos o cercanos dado que está principalmente determinada por anticuerpos contra los antígenos LPS (Levett, 2001; Bharti y col., 2003).

Los anticuerpos son detectables en sangre generalmente entre los 5 - 7 días desde la aparición de los primeros síntomas, pero algunas veces puede hacerlo recién después de 10 o más días (WHO-ILS, 2003) (Figura 4).

Generalmente los anticuerpos de tipo IgM (inmunoglobulina M) aparecen algo más temprano que los de tipo IgG, pero permanecen en niveles dosables en suero por meses o incluso por años (Adler y Faine, 1978; Faine, 1982; Levett, 2001; WHO-ILS, 2003). El título de anticuerpos aumenta gradualmente durante el curso de la enfermedad, comenzando a descender luego de la recuperación (Figura 4). La interpretación de la aparición de reacciones serológicas débiles es muy

compleja, porque pueden representar una fase muy temprana o tardía de la enfermedad o reacciones no específicas. Más aún, títulos bajos o respuesta tardía se han observado en casos muy severos en pacientes inmunodeprimidos y/o cuando se han administrado altas dosis de antibióticos en la primera fase de la enfermedad (Figura 4) (Levett, 2001).

4.4. Mortalidad

Los valores de mortalidad hallados en diferentes estudios se encuentran comprendidos entre un 5 y 52% (Plank y Dean, 2000). Para las formas severas de la enfermedad como el síndrome de Weil, la mortalidad es mayor al 10%, entretanto para la hemorragia pulmonar severa supera el 50-55% (Gouveia y col., 2008).

4.5. Tratamiento

Persiste cierta controversia sobre si el tratamiento antimicrobiano de leptospirosis severa debe suministrarse, dado que la mayoría de los casos agudos se resuelven espontáneamente y hay estudios donde no se observan diferencias significativas entre pacientes agudos tratados y no tratados (Bharti y col., 2003). Sin embargo, la mayoría de los expertos no niegan la administración de tratamiento antimicrobiano cuando los hallazgos clínicos y epidemiológicos sugieren leptospirosis (Bharti y col., 2003). El tratamiento antimicrobiano para que sea efectivo y prevenga la evolución hacia formas graves de la enfermedad debe iniciarse antes de los 5 días posteriores al inicio de los síntomas (Kobayashi, 2005).

El tratamiento de los pacientes con leptospirosis grave, continúa basándose en el tratamiento de soporte de las distintas manifestaciones y complicaciones que pueden ocurrir y el uso de penicilina y tetraciclinas, aunque su utilidad esté discutida (Plank y Dean, 2000; Levett, 2001; Bharti y col., 2003).

La doxiciclina es la droga recomendada para la profilaxis y enfermedad leve (Plank y Dean, 2000; Levett, 2001; Bharti y col., 2003). Ampicilina y amoxicilina también son recomendadas para casos leves, mientras que penicilina G y ampicilina lo son para casos severos (Plank y Dean, 2000; Levett, 2001; Bharti y

col., 2003; Suputtamongkol y col., 2004). Ceftriaxona tiene el beneficio de menor frecuencia de administración, la opción de administración intravenosa e intramuscular, y es un antibiótico alternativo en pacientes alérgicos a penicilina (Plank y Dean, 2000; Levett, 2001; Bharti y col., 2003).

4.6. Prevención y control

Las medidas según la WHO-ILS (2003) podrían resumirse en tres grandes grupos: a) Intervenciones sobre la ruta de transmisión (para evitar la exposición mediante higiene personal, ocupacional y ambiental) b) Intervenciones para reducir las fuentes de infección (animales infectados) y, c) Intervenciones a nivel del huésped humano (que incluyen: sensibilización de la población general y grupos de riesgo sobre la enfermedad, además de quimioprofilaxis, educación y vacunación).

Las intervenciones para reducir la exposición incluyen el uso de botas, guantes y ropa de protección, lavado de manos, en aquellos que, debido a su trabajo o actividades recreacionales, están expuestos al contacto con animales, agua o suelo contaminados (WHO-ILS, 2003; Collins, 2006). Sin embargo, las medidas de higiene ocupacional para evitar exposición tales como el uso de ropa protectora y evitar salpicaduras con orina o agua contaminada son generalmente útiles pero difíciles de aplicar, porque pueden impedir el trabajo o son inaceptables para los trabajadores y/o empleadores (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Por ejemplo, no es practicable en poblaciones de villas tropicales y húmedas aconsejar eliminar las actividades de riesgo tales como el contacto con cerdos, ganado o perros y caminar o trabajar en condiciones de humedad (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Algunas medidas de higiene ambiental incluyen: evitar el estancamiento de agua y realizar el drenaje de fuentes de agua, desmalezar, evitar la acumulación de residuos domiciliarios y evitar el acceso a cuerpos de agua posiblemente contaminados (Faine, 1982; WHO-ILS, 2003).

Algunas intervenciones para reducir las fuentes de infección son: la detección y conocimiento de las principales especies animales transmisores (domésticos y silvestres) en cada región, control de roedores y vacunación de animales domésticos (WHO-ILS, 2003). Aunque esta última (cuando se aplica a

animales como bovinos, perros o cerdos) sólo posee una eficacia parcial, debido a la inmunidad restringida al serovar que contiene la vacuna y la posible presencia de serovares diferentes a los contenidos en la misma (Levett, 2001; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Según Adler y de la Peña Moctezuma (2010), la prevención de la leptospirosis humana sin vacunación es verdaderamente difícil. La quimioprofilaxis con doxiciclina (200 mg/semana), ofrece una estrategia alternativa de prevención en personas o militares que visitan zonas endémicas y en infecciones accidentales de laboratorio (Bharti y col., 2003). Sin embargo, aparentemente no sería útil para prevenir la infección en áreas endémicas, y por lo tanto son muy necesarios estudios clínicos que evalúen su utilidad luego de desastres naturales como inundaciones o huracanes (Bharti y col., 2003).

Es importante acompañar con programas educativos, generar conciencia e higiene en la comunidad, y apoyo de las autoridades responsables de la salud pública humana y veterinaria (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

4.7. Vacunación

No se ha desarrollado aún una vacuna ampliamente disponible y útil para uso humano (Vinetz, 2001). Hasta la fecha, casi todas las vacunas existentes para uso humano son bacterinas (bacterias muertas) preparadas con leptospiras enteras muertas por calor o químicos como formalina o fenol (Faine, 1999; Bharti y col., 2003; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Estas vacunas se asocian con inaceptables efectos adversos, confieren protección por corto tiempo (por lo que requieren revacunación anual) y la inmunidad es serovar/serogrupo específica (limitada al/los serovares que contienen) (Faine, 1999; Levett, 2001; Vinetz, 2001; Bharti y col., 2003; WHO-ILS, 2003).

Las vacunas deben contener serovares representativos de la realidad epidemiológica local. La variabilidad de cepas en zonas endémicas complica el desarrollo de una vacuna que pueda ser usada mundialmente ya que, antes de ser aplicada en una determinada población, requiere de estudios epidemiológicos para conocer la incidencia de los serovares presentes (Koizumi y Watanabe, 2005; Vijayachari y col., 2008; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Cuba y China han desarrollado vacunas bacterinas y basadas en OMPs respectivamente (Martínez y col., 1998, 2000 y 2004; Yan y col., 2003). Generalmente las vacunas contienen dos o tres serovares prevalentes en la región. Por ejemplo, la vacuna cubana evaluada más recientemente, contiene los serovares Canicola, Copenhageni y Mozdoc (Martínez y col., 2004).

La atención se ha centrado los últimos años en el desarrollo y evaluación de vacunas más nuevas, como las de ADN recombinante (Vijayachari y col., 2008).

5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis es frecuentemente mal diagnosticada y/o sub-diagnosticada debido a su baja tasa de sospecha, la presentación clínica tan diversa y la falta de métodos de laboratorio apropiados (Turner, 1968; WHO-ILS, 2003). Más del 70-80% de los pacientes que finalmente tienen leptospirosis inicialmente se sospecharon otras patologías (Plank y Dean, 2000).

El diagnóstico temprano es imprescindible para comenzar inmediatamente una terapia efectiva y evitar formas más graves de la enfermedad (Farr, 1995; Perani y col., 1998; Kobayashi, 2005; McBride y col., 2005). Son necesarios métodos diagnósticos de laboratorio apropiados para ayudar en la detección de casos y facilitar la implementación de investigaciones rápidas durante brotes para un óptimo tratamiento y manejo de los pacientes (Guidigli y col., 2000; Effler y col., 2002; Suputtamongkol y col., 2010).

El diagnóstico temprano de leptospirosis se basa en el análisis de datos a tres niveles (AVLDD, 1994; Kobayashi, 2001):

* *epidemiológicos*

* *clínicos*

* *de laboratorio (general y específico)*

Debe evaluarse en primer lugar la historia de exposición al agente etiológico, mediante el análisis de los posibles factores de riesgo epidemiológicos, a través una buena anamnesis del paciente.

En la evaluación clínica debe hacerse el diagnóstico diferencial con las

siguientes enfermedades: influenza, dengue, hantavirus, fiebre hemorrágica argentina, hepatitis, gastroenteritis, malaria, fiebre amarilla, rickettsiosis, meningitis a líquido claro, encefalitis, neumonías atípicas, insuficiencia renal, fiebre tifoidea, sepsis por Gram negativos y anaerobios, entre otras (Faine, 1982; AVLDL, 1994; Plank y Dean, 2000; Bharti y col., 2003; Ahmad y col., 2005).

Las pruebas de laboratorio general o inespecífico incluyen fundamentalmente: velocidad de sedimentación globular (VSG), hepatograma, función renal, LCR y hemograma (AVLDL, 1994; Levett, 2001; Bharti y col., 2003; Ahmad y col., 2005).

La leucocitosis con neutrofilia y aumento de VSG son los hallazgos de laboratorio general más importantes para la detección precoz de leptospirosis y para diferenciarla de las enfermedades febriles virales (Kobayashi, 2001). Otro hallazgo como enzimas hepáticas (GPT, GOT y/o FO) normales o levemente aumentadas, permiten diferenciar la leptospirosis de las hepatitis virales. El análisis de orina de rutina revela proteinuria y piuria; puede observarse hematuria y cilindros hialinos o granulados. Los niveles de urea y creatinina en sangre pueden estar aumentados. El LCR es claro y revela predominancia de polimorfonucleares o linfocitos, con glucosa normal, lo cual permite diferenciarla de las meningitis tuberculosas y virales. En la leptospirosis severa se observa leucocitosis con desvío a la izquierda (a diferencia del dengue donde hay linfocitos atípicos), y plaquetopenia con aumento de la bilirrubina (Levett, 2001). La ictericia y hemorragia son raramente importantes para el diagnóstico precoz (Kobayashi, 2001).

Estos resultados solo sugieren el diagnóstico de leptospirosis, para su confirmación se necesitan los métodos de laboratorio específico (Levet, 2001). Existen diferentes métodos de laboratorio específico (Faine, 1982; WHO-ILS, 2003): métodos directos, que permiten demostrar *el agente etiológico (Leptospira infectante o su material genético)* y métodos indirectos o serológicos, que detectan *la respuesta de anticuerpos (género o serogrupo específicos)* que genera el huésped en respuesta a la infección.

5.1. Métodos directos: demostración de leptospiras o su material genético

5.1.1. Amplificación y detección de ADN

Se han descrito varios protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: “*Polimerase Chain Reaction*”) para la detección de ADN en muestras clínicas desde la década de los noventa (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Sin embargo, solo dos fueron extensamente evaluados, el de Merien y el de Brown y colaboradores y ganaron amplio uso para diagnóstico (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). El primero es un ensayo género específico que amplifica ADN de serovares patógenos y no patógenos. El otro método descrito inicialmente por Gravekamp y col. (1993) y Bal y col. (1994) requiere de dos sets de “*primers*” para detectar especies patógenas. Posteriormente se han logrado mejoras en la sensibilidad y especificidad mediante las PCRs en tiempo real (RT-PCR, *del inglés Real Time-PCR*) como la de Stoddard y col. (2009) que emplea sondas TaqMan.

5.1.2. Aislamiento

Puede realizarse en muestras de: sangre, suero, LCR y tejidos (renal, pulmonar y/o hepático) obtenidos de biopsias o necropsias. La recuperación de leptospiras de muestras clínicas es el único método que permite el diagnóstico de certeza. Sin embargo, tiene la desventaja de ser lento, laborioso, de sensibilidad usualmente baja debido a las frecuentes contaminaciones, tiene un alto costo y que debe ser realizado en laboratorios altamente especializados (WHO-ILS, 2003; Ahmad y col., 2005). El tiempo necesario para aislar e identificar las leptospiras permite sólo un diagnóstico retrospectivo de los casos con poca utilidad clínica (Adler y col., 1980). Requiere además que las muestras sean obtenidas en la primera etapa de la enfermedad, que el paciente no haya recibido antibioterapia previa y que las muestras sean frescas (menos de 24 hs de extraídas) y nunca congeladas (Levett, 2001; Bharti y col., 2003, Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Si esto no sucede puede presentar falsos resultados negativos.

5.1.3. Tipificación

La tipificación de los aislamientos de leptospiras puede hacerse por los

métodos serológicos descriptos (MAT y CAAT) o por diversos métodos moleculares. Muy pocos laboratorios en el mundo pueden aplicar los primeros, por ello los métodos moleculares se han convertido en los más ampliamente usados (Ahmad y col., 2005). Además, los métodos serológicos requieren disponer siempre de los aislamientos, pero algunos métodos moleculares más modernos no siempre (Perez y Goarant, 2010). Como algunos métodos moleculares de tipificación pueden realizarse sobre el ADN amplificado, se describen como un grupo de métodos, adicionalmente al de amplificación y detección por PCR convencional.

5.1.4. Métodos moleculares de tipificación.

Los métodos genómicos de caracterización más modernos, confiables y robustos según Adler y de la Peña Moctezuma (2010) son: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP *del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Herrman y col., 1992), secuenciación del ARNr 16S (Morey y col., 2006), detección de la variabilidad de secuencias repetitivas en tandem (VNTR *del inglés Variable Number of Tandem Repeats*) Multilocus análisis de los VNTRs (MLVA *del inglés Multilocus VNTRs Analysis*) (Majed y col., 2005) y Tipificación por secuencia de multilocus (MLST *del inglés Multilocus Sequence Typing*) (Majed y col., 2005; Ahmed y col., 2006; Thaipadungpanit y col., 2007).

Existen otros métodos de tipificación (más antiguos o clásicos) como: análisis con endonucleasas de restricción (REA *del inglés Restriction Endonuclease Analysis*), Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP *del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism*) o su variante revelando con fluorescencia (FAFLP *del inglés Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Nalanm y col., 2010), Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE *del inglés Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) y numerosos métodos basados en PCR (Ahmad y col., 2005; Cerqueira y Picardeau, 2009).

Todos estos métodos de tipificación molecular (los más modernos y los clásicos) se basan en los polimorfismos presentes en los genomas. Sin embargo, la mayoría de ellos (principalmente los más antiguos) presentan desventajas tales como: la necesidad de contar con gran cantidad de ADN purificado de alta calidad, poseer poca reproducibilidad y poder discriminatorio. A su vez, presentan problemas asociados a la interpretación de los datos y la transferencia de

resultados entre laboratorios (Cerqueira y Picardeau, 2009).

Dentro de los métodos más recientes el MLVA y MLST prometen ser los más útiles, ya que tienen la ventaja de que requieren poca cantidad de ADN, por lo que podrían ser aplicados directamente al estudio de muestras biológicas o ambientales *sin necesidad del cultivo*. Estudios recientes indican que el producto de amplificación de PCR podría ser útil para identificar directamente la cepa de leptospira infectante (Cerqueira y Picardeau, 2009; Perez y Goarant, 2010). Su principal limitante es que son específicos de las especies: *L. interrogans*, *L. bogpetersenii* y *L. kirschneri*, y por lo tanto sólo pueden distinguir entre serovares pertenecientes a estas especies patógenas (Cerqueira y Picardeau, 2009).

Estos métodos podrían resolver el problema de la tipificación en zonas altamente endémicas si estuvieran disponibles en laboratorios de investigación y de salud pública de países en desarrollo, pero aún es necesario ampliar las bases de datos que contengan los genotipos de las cepas circulantes (Cerqueira y Picardeau, 2009; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

El MLST se ha convertido en una técnica líder y patrón de oro para la tipificación de aislamientos de cepas de *Leptospira* (Nalan y col., 2010), debido a su alto poder discriminatorio, su fácil aplicación y estandarización, además de la posibilidad de transmitir la información obtenida en distintos laboratorios a través de bases de datos públicas (<http://leptospira.mlst.net/>). Permite generar gran cantidad de datos de evolución y filogenia aplicables a estudios poblacionales y epidemiológicos (Cerqueira y col., 2010; Nalam y col., 2010).

5.2. Métodos indirectos o serológicos: detección de anticuerpos.

La gran mayoría de los casos humanos de leptospirosis se detectan mediante el serodiagnóstico (WHO-ILS, 2003; Amhad y col., 2005).

Los métodos serológicos pueden dividirse en dos grupos: *género o serogrupo específicos*. Los primeros se basan en la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos comunes a todas las leptospiras (variedades patógenas y no patógenas), por eso son denominados *género específicos* y los segundos detectan anticuerpos dirigidos contra antígenos *serogrupo específicos* (WHO-ILS, 2003).

Los anticuerpos *género específicos* (“co-aglutinantes” o de “reactividad cruzada”) son los primeros en aparecer (Cacciapuoti, 1976; WHO-ILS, 2003), por lo que su presencia ha sido tomada como indicador de fase aguda de la infección (Guerreiro y col., 2001). Luego del período agudo estos anticuerpos desaparecen gradualmente a medida que la respuesta inmune “madura” (WHO-ILS, 2003). Por lo tanto, los anticuerpos *género específicos* sólo permanecen dosables por semanas o meses mientras que los *serogrupo específicos* pueden hacerlo por años (WHO-ILS, 2003). Este hecho indica que un resultado positivo a una técnica que detecte anticuerpos *serogrupo específicos* puede ser de escasa utilidad para diferenciar una infección presente de una pasada, especialmente, en zonas de alta endemicidad, donde una elevada proporción de la población puede presentar anticuerpos debidos a infecciones pasadas.

Las técnicas género específicas generalmente son más sensibles y permiten la detección más temprana de la infección. Por ello y por ser rápidas y sencillas se emplean como técnicas de “*screening*” o tamiz. Los resultados positivos obtenidos por cualquiera de ellas deben ser confirmados por la MAT, única técnica *serogrupo específica* (Faine, 1982).

La diversidad de respuesta inmune de los diferentes individuos frente a la infección por leptospiras y las características propias de los diferentes tipos de anticuerpos dosados por las técnicas serológicas dificultan enormemente el diagnóstico en algunos pacientes y limita la utilidad de una única técnica para el serodiagnóstico, aun cuando ésta fuera de alta eficiencia. De allí la necesidad de contar con al menos una técnica serológica para cada tipo de anticuerpos (género y serogrupo específico) y conocer perfectamente la utilidad de cada una de ellas según la fase de la infección y la población donde se aplique (WHO-ILS 2003).

5.2.1 Microaglutinación (MAT)

La MAT es la prueba de diagnóstico patrón o de referencia internacional para la *confirmación serológica* de los casos de leptospirosis (Faine, 1982; WHO-ILS, 2003). Se basa en la microscopía de campo oscuro para la observación de reacciones de aglutinación y es la prueba más ampliamente usada (Levett, 2001).

Es una técnica *serogrupo específica* y no serovar específica como

erróneamente se ha creído y citado en la bibliografía durante mucho tiempo (Levett, 2001). Permite inferir en algunos casos el serogrupo de *Leptospira* infectante mediante la utilización de un serovar representativo de cada serogrupo prevalente en la región. Sin embargo, esta predicción del serogrupo presumiblemente infectante, no es posible en más del 50% de los pacientes (Levett, 2003). Por esa razón, aunque no parece ser útil para identificar el serogrupo infectante en casos individuales, si puede ser útil para predecir el serogrupo presente en una determinada población (Levett, 2003).

La alta reactividad cruzada en la fase aguda, seguida de una relativa serogrupo-especificidad en muestras de la fase convaleciente; resultan de la detección, por parte de la MAT, tanto de anticuerpos tipo IgM como IgG y a la presencia de antígenos comunes de las leptospiras (Adler y col., 1980; Flannery y col., 2001; WHO-ILS, 2003).

El diagnóstico temprano no es posible con la MAT dado que depende de la detección de anticuerpos que no son dosables hasta 1 semana después de la aparición de los síntomas. En áreas no endémicas, títulos $>1:50-100$ indican que el paciente tiene leptospirosis. En cambio, en áreas endémicas títulos más elevados ($>1:400-800$) deben ser obtenidos en la MAT para que la leptospirosis sea sospechada. Además, para confirmar el diagnóstico, es necesario el análisis de una segunda muestra de aproximadamente 1 semana más tarde de la primera, y detectar seroconversión o aumento de 4 veces en el título (WHO-ILS, 2003).

Esta técnica requiere de un laboratorio equipado, mantener un gran número de cepas de *Leptospira* vivas para ser usadas como antígenos y experiencia técnica para la lectura e interpretación de resultados (Faine, 1982; Levett, 2001). La necesidad de contar con numerosos serovares de leptospiras en fase exponencial de crecimiento (cultivos de 4 a 14 días) hace no sólo que sea costosa, sino también que sea lenta, difícil de realizar, interpretar y estandarizar, quedando su utilización limitada a pocos laboratorios con personal altamente capacitado y adecuadas medidas de bioseguridad (Faine, 1982). Por esa razón no es adecuada para laboratorios de rutina y en nuestro país existen muy pocos laboratorios de referencia en condiciones de realizar esta técnica. La ineficiencia de la MAT es una de las principales razones de la falta de diagnóstico oportuno y precoz en esta

enfermedad (WHO-ILS, 2003).

Con el fin de mejorar al máximo la confiabilidad y estandarización de la MAT, la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS) puso en marcha desde el año 2002 la Prueba de Eficiencia Internacional de la MAT, del cual el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) participa desde el año 2004 (Chappel y col., 2004).

No existe un método de laboratorio sensible, específico, de bajo costo, rápido y ampliamente disponible para el diagnóstico de leptospirosis (Plank y Dean, 2000).

En resumen, las técnicas diagnósticas de referencia para leptospirosis (la MAT y el aislamiento) son complejas, anticuadas y no permiten la detección temprana de los casos. De allí la importancia de disponer de métodos de diagnóstico rápido y que puedan realizarse en laboratorios de baja complejidad. Por ello, es necesario desarrollar y evaluar la utilidad de nuevos ensayos que puedan ser aplicados en este u otros países.

5.2.2. Macroaglutinación con antígeno termoresistente (TR)

El método de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, conocido como TR, fue desarrollado en la década de los setenta (Mailloux y col., 1974; Mazzonelli y col., 1974) y emplea como único reactivo un antígeno obtenido a partir de una cepa de *Leptospira* inactivada por calor (30 minutos a 100°C) con visualización directa sobre un porta objeto. Es una prueba específica de género (detecta anticuerpos anti-leptospiras) y su producción artesanal se realiza en muy pocos laboratorios de referencia.

Si bien existen numerosas pruebas de tamiz disponibles en el mundo, en la mayoría de los laboratorios de salud pública de Argentina el cribado o tamiz diagnóstico aún se realiza mediante el TR. En este país, como no existen reactivos diagnósticos comerciales, en los últimos años se desarrollaron y validaron reactivos de ELISA, pero aún no están disponibles para su uso en todos los laboratorios del país.

Las principales ventajas de éste reactivo consisten en que es económico, rápido y sencillo de realizar, permitiendo que pueda ser utilizado en laboratorios

de baja complejidad. Todas estas ventajas favorecen su descentralización, por ello este método constituyó la herramienta esencial para la creación de la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL) y así mejorar la accesibilidad y oportunidad del diagnóstico de leptospirosis en Argentina. El laboratorio de referencia nacional de la RNLL produce en forma centralizada el reactivo TR y lo distribuye en forma gratuita a todo el país. Esto permite el diagnóstico presuntivo precoz en centros diagnósticos descentralizados de mediana o baja complejidad. Las muestras procesadas en estos laboratorios regionales/provinciales son derivadas al laboratorio de referencia correspondiente para su confirmación por MAT.

A pesar de la amplia utilización del TR en nuestro país y de sus ventajas estratégicas, tiene numerosas limitaciones. Una de sus desventajas operativas es su subjetividad, no es fácil de visualizar, y requiere de muestras límpidas y bien conservadas. Sin embargo, su principal limitación sería su aparente baja sensibilidad y especificidad. En nuestro laboratorio en un período de 12 años de trabajo se documentaron falsos negativos y positivos en casos confirmados y descartados respectivamente (datos no publicados). Este hallazgo no coincide con el único estudio realizado en nuestro país que le atribuyen al TR tanto una sensibilidad como especificidad cercana al 100 % (Seijo, 1993). Los otros antecedentes hallados en la bibliografía internacional son muy escasos, limitados y con resultados dispares (Banfi y col., 1984; Regalado Segui y col., 1990; Brandao y col., 1998). Estas discordancias constituyen la principal razón que justifica este trabajo.

Por otra parte, ninguno de los estudios previos evaluó el desempeño del TR en diferentes etapas de la enfermedad, ni la cualidad de repetirse de las lecturas entre un mismo operador (repetibilidad) o entre operadores diferentes (reproducibilidad). Estos datos son necesarios para evaluar la calidad del resultado de un método de diagnóstico.

Si bien en la bibliografía internacional se describen otros *métodos de aglutinación macroscópica*, algunos de ellos con elevada sensibilidad y/o especificidad (Bragger y col., 1976; Wanyangu y col., 1987; Brandao y col., 1998; Smits y col., 2000a; Levett, 2001) *ninguno de ellos está disponible en Argentina.*

5.2.3. Enzimoimmunoensayo en fase sólida

Con la finalidad de superar los problemas de los métodos de referencia (cultivo y MAT), en los últimos años se han desarrollado e incorporado el uso de algunas pruebas potencialmente útiles, fundamentalmente el ELISA, tanto para la detección de IgM como IgG en muestras de suero humano (Adler y col., 1980; Cumberland y col., 1999; Smits y col., 1999; Levett, 2001; Zochowski y col., 2001; Bajani y col., 2003; WHO-ILS, 2003; Tansuphasiri y col., 2005). No obstante, la eficacia de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana depende de la etapa de la enfermedad, el tipo de antígenos empleados y los anticuerpos detectados (Nakarin y Pradutkanchana, 2004).

Las principales ventajas del ELISA en comparación con la MAT son: que emplea generalmente un antígeno género específico, que puede detectar todas las leptospiras, puede ser estandarizado y no requiere el mantenimiento y cultivo de leptospiras (WHO-ILS, 2003).

Idealmente, un test diagnóstico debe ser seguro, fácil de realizar, rápido y con uso de una sola muestra, como los son los ensayos de tipo ELISA (Cerqueira y Picardeau, 2009). Este método usa componentes no peligrosos, es sensible, específico y semi-automático por lo que es fácil de realizar (Surujballi y col., 2004). Puede ser usado tanto en trabajos a campo como en pequeños laboratorios regionales. Además, los rigurosos controles de calidad establecidos aseguran la reproducibilidad de los resultados (Surujballi y col., 2004). Mientras que otros ensayos requieren una interpretación subjetiva, como intensidad de color o de aglutinación, el ELISA brinda un punto final numérico (Bajani y col., 2003). Las desventajas incluyen falsos positivos en zonas endémicas para otras enfermedades febriles, falta de especificidad de serogrupo y la necesidad de confirmación por MAT.

Existen distintos antígenos utilizados en ensayos de tipo ELISA para leptospirosis:

*** Extractos crudos:**

La mayoría usan lisados de extractos celulares crudos como antígeno y detectan anticuerpos IgM o IgG (Cerqueira y Picardeau, 2009).

Adler y Faine (1980) hallaron que si bien hay muy pocos pacientes que producen anticuerpos IgG aglutinantes dosados por MAT, todos ellos producen anticuerpos detectables por ELISA. Estos mismos autores demostraron, muy poco después, la existencia de antígenos no aglutinantes, tanto género como especie específicos, sólo dosables por ELISA (Adler y Faine, 1983). Esto implicaría una ventaja en términos de sensibilidad para los métodos de ELISA que utilizan este tipo de antígenos, que no contienen solo antígenos de superficie sino también de otras partes de la bacteria.

*** Antígenos recombinantes:**

Los ELISAs basados en proteínas recombinantes son un procedimiento seguro y, dado que utilizan antígenos inmunodominantes, que no poseen los motivos no específicos de las preparaciones con extractos crudos celulares, ofrecen elevada sensibilidad y especificidad (Neves y col., 2007; Lin y col., 2008a,b). Las ventajas de usar un antígeno recombinante en el diagnóstico de la enfermedad en humanos y animales incluyen: elevada sensibilidad y especificidad, reproducibilidad del 100% cuando se realiza bajo las condiciones descritas, seguridad y estabilidad de los antígenos (Bomfin y col., 2005).

La identificación de un antígeno que sea conservado en un amplio espectro de leptospiras patógenas, y que sea expresado durante la infección de manera que genere niveles detectables de anticuerpos en la fase aguda es útil para desarrollar un método diagnóstico rápido, mientras que aquellos que generan anticuerpos que persisten durante la fase de convalecencia son útiles para desarrollar ensayos que puedan ser usados en estudios seroepidemiológicos (Natarajaseenivasan y col., 2004). Un ELISA con LipL32 fue, de las proteínas recombinantes empleadas, la que demostró mayor sensibilidad y permitió detectar anticuerpos IgG en el 56 y 94% de los casos confirmados por MAT durante la fase aguda y convalescente de la enfermedad humana, respectivamente (Flannery y col., 2001). La seroreactividad contra LipL32 puede ser capaz de detectar casos no identificados por la MAT (Guerreiro y col., 2001). La baja reactividad en individuos sanos y en pacientes con sífilis, hepatitis y dengue en regiones donde la leptospirosis es endémica indicaría que la respuesta anti-LipL32 es específica y por lo tanto útil para diferenciar la

enfermedad de otras causas de síndromes febriles agudos (Flannery y col., 2001; Guerreiro y col., 2001).

La mayor desventaja de usar un ELISA basado en la detección de anticuerpos IgG para el diagnóstico temprano es la relativamente tardía aparición de estos anticuerpos durante el curso de la respuesta inmune (Tahiliani y col., 2005). Sin embargo, se ha demostrado que la cinética de la respuesta inmune IgG contra proteínas recombinantes es comparable a la respuesta IgM contra preparaciones de extractos celulares (Haake y col., 2000b; Dey y col., 2004; Tahiliani y col., 2005). Es más, se ha mostrado que la proteína recombinante fue capaz de inducir una respuesta IgG robusta frente a una respuesta IgM indetectable, lo que fue presuntamente debido a una rápida seroconversión IgM-IgG (Haake y col., 2000b; Dey y col., 2004; Tahiliani y col., 2005). Recientemente, se encontró reactividad IgG anti-LipL32 en la fase convaleciente, mientras que poca o nula reactividad se detectó en la fase temprana (Neves y col., 2007).

*** Sintéticos:**

Solo existe un antecedente, posterior a nuestro estudio y muy reciente, de utilización de péptidos sintéticos en ensayos de ELISA para serodiagnóstico humano (Aviat y col., 2010).

5.2.4. Otros métodos serológicos

Existen otros métodos diagnósticos tales como: la hemoaglutinación indirecta (IHA), contrainmunolectroforesis, hemoaglutinación (HA), lisis de eritrocitos sensibilizados, inmunofluorescencia indirecta (IFI), radioinmunoensayo (RIA), fijación de complemento (FC) y otros (Faine, 1982; Levett, 2001; WHO-ILS, 2003). Estos métodos se emplean como tamiz y complemento de la MAT pero la gran mayoría de ellos ya no se usan por ser muy antiguos. Han sido reemplazados por otros como: el ELISA o sus variantes (Amhad y col., 2005) y los métodos de aglutinación género específicos más sensibles (Levett, 2001).

Uno de los avances reciente más importantes en el diagnóstico de esta enfermedad fueron las evaluaciones clínicas en gran escala de nuevos métodos rápidos de diagnóstico que usan diferentes formatos de ELISA (*dipstick* o DOT) y los principales métodos de aglutinación (Smits y col., 2000b; Vinetz, 2001; Effler y

col., 2002; Seghal y col., 2003; McBride y col., 2007). La mayoría de estos métodos, que detectan IgM, son comercializados *pero ninguno de ellos está disponible en Argentina*. De allí que para poder contar con algún método diagnóstico alternativo se hace necesario el desarrollo y producción nacional.

6. VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Las pruebas de laboratorio juegan un papel importante, no sólo en el diagnóstico de la enfermedad en individuos con diagnóstico presuntivo positivo, sino también en la vigilancia epidemiológica poblacional, constituyéndose en herramientas cruciales en los programas de control (John, 2005). En este contexto, las pruebas diagnósticas están usualmente asociadas con importantes consecuencias económicas y de salud pública. Para que las pruebas lleguen a los objetivos de calidad aceptados internacionalmente se deben aplicar prácticas estrictas que la aseguren. Dentro de los parámetros de calidad se encuentra la probabilidad de error aleatorio, medido a través de la variabilidad inter-e intra-ensayo u operador. Ésta, a su vez, es usualmente cuantificada con medidas de dispersión como el desvío estándar (DS) y los intervalos de confianza (IC) (Tarabla, 2000). Pero, además, las pruebas tienen sesgos típicos que llevan a errores de clasificación de los pacientes (sistemáticos), aún cuando las medidas que aseguren la calidad sean llevadas a la práctica. Una manera de medir el error sistemático es mediante la medición de falsos positivos (FP) y negativos (FN) de cada una de las técnicas (Tarabla, 2000).

La evaluación de una prueba con respecto al estado verdadero de salud de un individuo se mide como sensibilidad y especificidad (Tarabla, 2000). Estas son dos características propias de las pruebas y cuantifican respectivamente la probabilidad condicional de un resultado positivo en un individuo con la enfermedad y de un resultado negativo en un individuo sano. La sensibilidad y especificidad, dependen además del tiempo de evolución de la enfermedad donde se aplican las pruebas diagnósticas, cuanto más corto es éste más difícil será lograr buena sensibilidad a las pruebas.

Para validar una prueba, sus resultados deben ser comparados con el verdadero estado de salud de los individuos frecuentemente determinado por una

prueba patrón o estándar de oro (del inglés: "*gold standard*"). Este es un método diagnóstico o una combinación de ellos que determina en forma absoluta y sin error si una enfermedad/infección está presente en un individuo (Tarabla, 2000).

El aislamiento y tipificación de leptospiras patógenas es el estándar de oro pero, además de todas las desventajas mencionadas para este método, tiene la limitante de que un cultivo negativo no descarta la enfermedad (posibles FN). La prueba patrón serológico, la MAT, es simplemente el método disponible más confiable en este caso.

La curva ROC (del inglés "*Receiver Operating Characteristics Curve*") es una herramienta muy útil determinar el punto de corte óptimo que expresa sus resultados bajo una escala continua como el ELISA (Metz, 1978; Zweig y Campbell, 1993; Schoojans y col., 1995). Esta curva es una representación gráfica de la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica. Se construye graficando la sensibilidad frente a (1- especificidad) bajo varias posibilidades de positividad o puntos de corte y describe la habilidad de una prueba para discriminar entre sanos y enfermos. De esta manera, el extremo superior izquierdo es el punto de nivel óptimo de sensibilidad y especificidad. (Zweig y Campbell, 1993; Schoojans y col., 1995; Tarabla, 2000).

La curva ROC, también llamada curva de eficacia diagnóstica, permite comparar diferentes pruebas diagnósticas. La estimación de la función exponencial que subyace a la curva ROC graficada se denomina área bajo la curva ROC (AUC, del inglés *Area Under the Curve*) y se estima de dos maneras: a) asumiendo una distribución binomial (Hanley y McNeil, 1982) y b) sin supuestos referentes a la distribución de los resultados de la prueba basado en la relación del AUC con la estadística U de Mann-Whitney (Landis y Koch 1977). La prueba perfecta es la que tiene un AUC del 100%, mientras que una prueba que no mejora lo que obtendríamos por azar tiene un AUC del 50%. Para la comparación de dos pruebas diagnósticas distintas, se comparan las AUC de ambas pruebas y la de mayor AUC será de la de mayor eficacia diagnóstica.

El índice de Youden (J) es un resumen de validez que combina sensibilidad y especificidad, y refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de FP

(Szklo y Nieto, 2003). El índice J tiene la ventaja de no estar afectado por la prevalencia de la enfermedad y es uno de los parámetros preferidos, dado que utiliza una combinación simple de los valores de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, tiene la desventaja de que, al resultar de la combinación de estos valores, no es posible determinar si la prueba diagnóstica es buena en sensibilidad, especificidad o ambas. El mejor punto de corte estimado mediante J será aquel que más se aproxime a 1 (en teoría la prueba perfecta es aquella que ofrezca un valor de $J=1$, dado que de esa forma la sensibilidad y la especificidad de la prueba serían perfectas) (Szklo y Nieto, 2003).

La estadística *Kappa* (k) mide la concordancia entre los resultados de dos pruebas diagnósticas o una misma prueba realizada por dos operadores diferentes o en diferentes oportunidades, corrigiendo el efecto del azar. Un valor de $k=1$ representa una concordancia perfecta, más allá de la intervención del azar (Tarabla, 2000). Esta estadística se usa principalmente para medir la fiabilidad entre dos o más resultados de una misma prueba diagnóstica (Szklo y Nieto, 2003). *Kappa* depende de la prevalencia real de la enfermedad y, si se comparan dos pruebas aplicadas en poblaciones diferentes, los k van a variar de acuerdo a la prevalencia real de las poblaciones o subpoblaciones sujetas a comparación (Tarabla, 2000).

Por otra parte, hay otros parámetros que se pueden estimar a partir de la aplicación de una prueba en una población y de gran utilidad tanto clínica como epidemiológica, siendo los más notables la probabilidad de que un individuo positivo a la prueba diagnóstica esté realmente enfermo (Valor Predictivo Positivo, VPP) y la probabilidad de que un individuo negativo a la prueba diagnóstica esté realmente sano (Valor Predictivo Negativo, VPN) (Tarabla, 2000; Szklo y Nieto, 2003).

Una de las variables que influyen en el desempeño de una prueba diagnóstica son las características propias de la población donde será aplicada. De allí la importancia de validarlas en cada región (Tarabla, 2000). ***Sorprendentemente, en Argentina, sólo había un estudio de validación del TR y no había otros métodos diagnósticos de tamiz evaluados o validados disponibles.*** Estas limitaciones se vuelven aún más evidentes en situaciones de emergencia, como las recientes inundaciones en Santa Fe (años 2003 y 2007).

6.1. Evaluación y revisión sistemática de métodos diagnósticos (meta-análisis)

Diversos estudios se han realizado para determinar la eficacia de las pruebas de ELISA, aplicadas en diferentes situaciones y en una gran variedad de pacientes para detectar anticuerpos específicos contra leptospiras, y han comparado sus resultados con los obtenidos mediante la prueba MAT. Estos estudios midieron sensibilidad y especificidad de los diferentes ELISAs. ***No obstante, los resultados fueron muy variables entre los diferentes estudios, situación que dificulta la obtención de conclusiones acerca de la eficacia global de esta prueba.*** Dado lo anterior, una forma de resumir los resultados obtenidos por diferentes estudios es a través del meta-análisis, que ofrece una medida global de la sensibilidad y especificidad de la prueba, permite identificar las fuentes de heterogeneidad (o variabilidad) y ofrece otras medidas de la exactitud de la prueba diagnóstica. La exactitud de una prueba está dada no solo por la precisión sino también por la validez de sus resultados.

La revisión sistemática, complementada con el meta-análisis, consiste en la revisión de trabajos científicos disponibles en la literatura internacional empleando métodos específicos para la identificación, selección y evaluación crítica para alcanzar resultados previamente definidos (Faria Filho y col., 2006). ***De allí la importancia de evaluar mediante meta-análisis la exactitud del ELISA para la detección de anticuerpos específicos antileptospiras en humanos, así como identificar las fuentes de heterogeneidad (variabilidad) que afectan el desempeño de la prueba diagnóstica.***

2

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES

1.1. Desarrollar ELISAs (IgG) para la detección de anticuerpos antileptospiras en muestras de suero humano.

1.2. Evaluar el error sistemático global y en diferentes etapas de la evolución de la enfermedad y el error aleatorio de los ELISAs desarrollados y del TR.

1.3. Evaluar la presentación clínica y epidemiológica de los casos de leptospirosis e identificar factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Diseñar y obtener antígenos extractivos, sintéticos y recombinantes.

2.2. Evaluar la utilidad de cada uno de estos antígenos, solos o en combinación, para el desarrollo de reactivos de ELISA.

2.3. Evaluar sensibilidad y especificidad de los distintos ELISAs desarrollados y del TR en forma global y en tres diferentes etapas de la evolución de la enfermedad.

2.4. Evaluar la variabilidad: intra-operador de los ELISAs desarrollados, e intra-operador e inter-operador del TR.

2.5. Determinar el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), e interpretar los resultados de los ELISAs desarrollados y el TR en función de ellos.

2.6. Evaluar reactividad cruzada en las pruebas serológicas contra otros patógenos.

2.7. Comparar los métodos serológicos (ELISAs desarrollados, TR y MAT) y métodos directos de diagnóstico (cultivo y PCR) en la primera etapa de la enfermedad.

2.8. Evaluar, mediante meta-análisis, la exactitud del ELISA para la detección de anticuerpos específicos anti-*Leptospira* en humanos e identificar las fuentes de heterogeneidad que afectan el desempeño de la prueba diagnóstica.

2.9. Examinar la carga de la leptospirosis en la Argentina, describir los datos de vigilancia y evaluar la presentación clínica y epidemiológica de los casos.

2.10. Identificar factores de riesgo para la adquisición de la leptospirosis humana.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS

1.1. Antígenos extractivos

La obtención de los diferentes antígenos para los ensayos ELISA se hizo a partir de cultivos de los siguientes serovares de *Leptospira interrogans*: Castellonis (Castellon3); Canicola (Hound Utrecht IV); Grippotyphosa (Moskva V); Icterohaemorrhagiae (M20); Hebdomadis (Hebdomadis); Pomona (Pomona); Pyrogenes (Salinem); Tarassovi (Perepelicin); Wolffi (3705), Hardjo (hardjoprajitno) y de *Leptospira biflexa*: Patoc I.

Cada una de las 11 cepas patrón fue procesada de acuerdo a la técnica descrita por Adler y Faine (1978) y (1983). Se partió de cultivos de 7-14 días de desarrollo (etapa exponencial) de cada una de las cepas de leptospiras en medio Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris (EMJH) líquido. El cultivo se centrifugó 20 minutos a 10.000 g, se lavó 3 veces con buffer fosfato salino (PBS, del inglés: "*Phosphate Buffered Saline*") pH 7,2 y se resuspendió finalmente en el mismo buffer. Se sonicó 2 veces por 2 minutos, en Equipo Cole Palmer Ultrasonic Cleaner Bath Potencia 100W 42 kHz.

Se hizo primero una obtención en pequeña escala de estos 11 antígenos para hacer la evaluación funcional de cada uno de ellos y una vez seleccionadas las cepas a ser empleadas como antígeno en el ELISA se repitió todo el procedimiento de obtención pero a mayor escala. En esta producción, una vez finalizados los lavados, se llevó a un volumen de 10 ml con PBS y se adicionó fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM. El contenido proteico en el extracto empleado para la preparación de los lotes finales para su evaluación se determinó por el método de Bradford en 0,6 mg/ml. Finalmente se alicuotó y para su conservación se mantuvo a -20°C hasta su uso.

1.2. Antígenos sintéticos

La síntesis química de cada péptido individual se realizó utilizando la química Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) para síntesis de péptidos en fase sólida, que se realiza desde el extremo C-terminal al N-terminal de la secuencia, según el método clásico descrito por Atherton y Sheppard (1989). Esta técnica

permite obtener productos de síntesis homogéneos, lo que facilita su posterior purificación. La técnica consiste en incorporar de a uno los aminoácidos sobre una resina de poliestireno derivatizada para obtener péptidos tipo amida. En un paso final se realiza la desprotección final del péptido y separación de la resina por tratamiento ácido TFA (trifluoroacético) en presencia de agentes de captura. Los péptidos sintetizados fueron purificados por extracción en fase sólida y cromatografía en fase reversa utilizando HPLC (del inglés: “*High Performance Liquid Chromatography*”). Las muestras purificadas luego fueron liofilizadas (Tonarelli y col., 2000).

La síntesis de péptidos para su utilización como antígenos en los diferentes ELISAs fue realizada en el laboratorio de química orgánica (FBCB-UNL) y provista para esta tesis.

1.2.1 Mapeo de epitopes mínimos de reconocimiento de LipL32 y LipL41

Los péptidos se sintetizaron mediante el método de síntesis denominado SPOT (del inglés: “*Synthetic peptide array on membrane supports*”) (Frank, 1992). Consiste en una síntesis química simultánea sobre una membrana de celulosa derivatizada con un dipéptido Ala-Ala para la preparación de péptidos inmovilizados en forma de puntos y de allí también su denominación en inglés “spots”. La síntesis de los péptidos sobre las membranas se llevó a cabo utilizando la química Fmoc, de acuerdo a las modificaciones descritas por Frank y Overwin (1996). Las bibliotecas preparadas están formadas por pentadecapéptidos que abarcan la secuencia completa de LipL32 (residuos 1 a 272) y LipL41 (residuos 1 a 355), con un desplazamiento de tres residuos de aminoácidos.

Las bibliotecas para la identificación de epitopes antigénicos se sintetizaron en colaboración con el Instituto “Helmholtz Zentrum fuer Infektionsforschung” de Alemania.

La reactividad de la biblioteca de péptidos se evaluó de acuerdo con el protocolo descrito por Soutullo y col. (2007). Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (IgG anti-conejo, Sigma), seguida de una reacción de color con 5-bromo-4-choro-indolyphosphate (BCIP) y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT)

(Frank, 1992).

El análisis de epitopes se llevó a cabo con muestras de suero de conejo, un pool de tres muestras de sueros verdaderos negativos y un pool de tres muestras hiperinmunes contra el serogrupo Icterohaemorrhagiae, serovar Copenhageni (cepas M20 y RGA) y serovar Icterohaemorrhagiae (cepa Ictero N° 1).

1.3. Antígenos recombinantes

La obtención de antígenos recombinantes se realizó por técnicas de ADN recombinante a partir de *Leptospira interrogans* Copenhageni serogrupo Icterohaemorrhagiae cultivada axénicamente en medio EMJH líquido, durante 7-14 días (Flannery, 2001). Fueron obtenidos en *Escherichia coli* transformadas con construcciones plasmídicas recombinantes obtenidas a partir de distintos plásmidos comerciales. Las proteínas fueron purificadas a homogeneidad mediante cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC, del inglés: “*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*”).

Todas las proteínas recombinantes se obtuvieron en el laboratorio de Microbiología Aplicada y fueron provistas para este trabajo de tesis, en el marco de un trabajo en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica Microbiana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

2. DISEÑO Y DESARROLLO DE LOS ENZIMOINMUNOENSAYOS

2.1. Preparación de las superficies de inmunocaptura

Se hicieron primero ensayos utilizando diferentes placas de ELISA, marcas y diferentes presentaciones (*completas o tiras*) para determinar la que permitía una mejor discriminación frente a paneles reducidos de referencia.

Una vez fijada la marca, tipo y presentación, se determinaron las mejores condiciones de sensibilización o inmovilización. Se definieron las condiciones óptimas de pegado en base a la mayor discriminación entre sueros de casos confirmados de leptospirosis y sueros negativos.

2.2. Definición de las condiciones óptimas del ELISA

Para cada antígeno se determinaron previamente las condiciones de cada ensayo: buffers de sensibilización a emplear, dilución de las muestras, concentración de conjugados, cantidad de lavados, tiempos de incubación y de revelado que permitan la mejor discriminación entre sueros de casos confirmados de leptospirosis y sueros negativos (Vanasco, 2001; Lottersberger, 2002).

2.3. Evaluación de la actividad biológica del ELISA indirecto.

Con las condiciones determinadas, se evaluaron primero las mezclas de sueros positivos y negativos (obtenidos de paneles de sueros previamente evaluados) y se determinó la capacidad de separación entre ambos. Luego se procesaron todas las muestras del panel por los diferentes ELISAs y antígenos descriptos.

En los ensayos ELISA, los antígenos individuales o las mezclas, se inmovilizaron sobre placas de poliestireno para preparar las superficies de inmunocaptura. Las muestras a evaluar se diluyeron en un buffer proteico y se incubaron a 37°C para que los anticuerpos específicos presentes en las mismas reaccionen con los antígenos inmovilizados. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó utilizando un segundo anticuerpo marcado: en este caso se utilizó una anti-IgG humana (Fracción Fc) conjugado con peroxidasa. Luego, la reacción se puso en evidencia utilizando un sistema cromogénico compuesto por 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada que son sustratos para que la enzima peroxidasa produzca un cambio de color de incoloro a azul. La reacción luego se detuvo con ácido sulfúrico 2M (1N) y el color vira a amarillo. Posteriormente se leyó en un lector de microplacas a 450 y 630 nm (Tijssen, 1987).

Todos los inmunoensayos desarrollados fueron ELISAs indirectos para la detección de anticuerpos de tipo IgG. El sistema de detección de este tipo de ensayos involucra dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno pegado a superficie de inmunocaptura y uno secundario marcado contra el primario (anti-IgG humana conjugado con peroxidasa).

2.4. Procesamiento de las muestras, expresión e interpretación de los resultados

En cada placa ensayada se procesó por triplicado una mezcla de sueros provenientes de pacientes clasificados como No casos (llamado control negativo, CN) y se obtuvo el promedio de densidades ópticas (DO) de la mezcla de sueros CN (**DON**). Se procesó también siempre en cada ensayo una mezcla de sueros provenientes de pacientes considerados casos confirmados (llamado control positivo, CP). Cada muestra se procesó por duplicado y se obtuvo la densidad óptica promedio (**DOM**) para cada muestra. Los resultados se expresaron como densidad óptica corregida (**DOC**) en función de la mezcla de sueros CN, obtenida del cociente DOM/DON . Resultado del ELISA: $DOC = \frac{DOM}{DON}$

Una muestra fue considerada positiva o reactiva cuando su DOC resultó mayor que el punto o valor de corte ("*cut off*") y negativas o no reactivas si resultó menor o igual al valor de corte determinado para cada ELISA en su evaluación.

3. MÉTODOS SEROLÓGICOS DE AGLUTINACIÓN

3.1. Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR).

El TR evaluado correspondió al lote 2007 producido en el laboratorio del INER "Dr. E. Coni" según la metodología descrita por Faine (1982), Mazzonelli y col. (1974), y Mailloux y col. (1974). A diferencia de estos autores que utilizan la cepa Patoc I, (serovar Patoc, serogrupo Semaranga) de *L. biflexa*, el utilizado en este estudio se obtuvo a partir de cultivos de la cepa Hardjoprajitno (serovar Hardjo, serogrupo Sejroe). Previamente, se evaluaron todas las serovariedades de leptospiros utilizadas en la MAT y se observó que la cepa Hardjoprajitno fue la que evidenció la mejor reactividad frente a un panel de sueros positivos y negativos provenientes de casos confirmados y no casos de leptospirosis.

Sólo se incluyeron en el análisis aquellas muestras de casos o no casos cuyos resultados hayan sido reactivos o positivos y no reactivos o negativos. Los resultados débiles reactivos se interpretaron como reactivos o positivos. No se incluyeron las muestras cuyo resultado haya sido no interpretable. Un resultado no

interpretable es aquel donde la muestra no puede clasificarse como reactiva o no reactiva por no poder visualizarse la aglutinación o ausencia de ésta debido a la presencia de lípidos, glóbulos rojos o cualquier otro componente del suero que haga que la muestra no se vea homogénea. Éste fenómeno se observa generalmente en muestras conservadas por mucho tiempo.

3.2. Test de aglutinación microscópica con antígenos vivos (MAT)

Se usaron como antígeno cultivos frescos en medio EMJH líquido (Laboratorios Difco) según la metodología descrita por Faine y la Sociedad Internacional de Leptospirosis (Faine, 1982; WHO-ILS, 2003). Todos los sueros fueron analizados por MAT, usando como antígeno la batería de 14 serovares comprendidos en 12 serogrupos que se indica en la Tabla 1. Los serovares incluidos en esta batería son los consensuados y acordados por los laboratorios que integran la RNLL y realizan MAT en seres humanos en Argentina. Las muestras de suero fueron consideradas positivas si presentaron un título $\geq 1:50$, según las recomendaciones de la AAVLD (1994) para nuestro país.

Tabla 1. Leptospiras empleadas en la Microaglutinación (MAT)

Especies Genómicas	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
		Icterohaemorrhagiae	RGA
		Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem ^{ELISA}
	Sejroe	Wolffi	3705
		Hardjo	Hardjoprajitno ^{TR}
	Bataviae	Bataviae	Swart
	Australis	Australis	Ballico
	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis
Tarassovi		Tarassovi	Perepelitsin ^{ELISA}
Sejroe		Sejroe	M 84
<i>L. kirschneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1

^{TR} Cepa actualmente empleada para la producción del TR

^{ELISA} Cepas empleadas para la producción del ELISA con antígeno extractivo

Para los estudios epidemiológicos, se consideró serogrupo presumiblemente infectante, en los casos confirmados, a aquel serogrupo que arrojó mayor título en la MAT.

4. DEMOSTRACIÓN DE LEPTOSPIRAS O SU MATERIAL GENÉTICO (MÉTODOS DIRECTOS)

Se aplicaron dos métodos de PCR, la PCR convencional descrita por Bal y col. (1994), y la RT-PCR descrita por Stoddard y col. (2009).

Para la extracción del ADN de las muestras se empleó el Kit DNA QIAamp (QIAGEN) de acuerdo a las indicaciones del fabricante a partir de 200 uL de sangre o suero humano.

La PCR convencional emplea dos sets de primers (G1-G2 y B64-I - B64-II). Con G1-G2 se amplifica un fragmento de ADN de 285-pb de cepas pertenecientes a las especies de leptospira: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y solo la cepa ICF de *L. meyeri* (Bal y col, 1994). Con el par B64-I - B64-II se amplifica ADN pertenecientes a *L. kirschneri*, generando un fragmento de ADN de 563-pb. Los fragmentos amplificados se separaron en gel de agarosa al 2%.

La RT-PCR empleada también detecta leptospiras patógenas mediante la amplificación del gen de LipL32. Para visualizar los amplicones se utilizó un método de fluorescencia por medio de sondas TaqMan. El par de primers empleado fue LipL32-45F (5'-AAG TAC TAC CGC TTG TGG TG-3') y LipL32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') que amplifican un fragmento de 242 pb. El cual fue detectado por la sonda LipL32-189p (FAM-5'-CAG CAG CAG AA AAG CGC CG-3'-BHQ1). Como control interno de inhibidores de la PCR se empleó la RNaseP3F (5'-CCA AGT GTG AGG GAA GCT AAG-3') y RNaseP3R (5'-GGC TGT TGT TGA TGA ACT ATA AAA GG-3') que amplifican el fragmento que fue detectado por la sonda RNaseP3 (FAM-5'-CC ECP GTC CGC TCT AGC ACT CAC TTC-3'-BHQ1).

5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

5.1. Muestras

Las muestras empleadas en este estudio forman parte del banco de sueros preexistente en el laboratorio de leptospirosis del INER, Santa Fe, Argentina. Este centro de referencia recibe muestras de casi todas las provincias argentinas. Aunque desde de Buenos Aires se reciben pocas muestras porque esta provincia posee sus propios laboratorios regionales de referencia. Todas las muestras del banco corresponden a pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al

laboratorio nacional de referencia de leptospirosis para su diagnóstico. Las muestras se conservaron a -70°C hasta la realización de cada una de las pruebas diagnósticas.

5.2. Datos clínicos y epidemiológicos

Junto a las muestras de sangre y/o suero de todos los pacientes con sospecha de leptospirosis se envía una planilla clínico-epidemiológica de vigilancia nacional desde el laboratorio.

La planilla clínico-epidemiológica contiene los siguientes datos: *Fecha de inicio* de síntomas y de toma de muestra/s, *Datos demográficos* (apellido y nombres, residencia, edad, sexo y ocupación), *Datos Clínicos* (fiebre mayor a 39°C , mialgias, cefaleas, inyección conjuntiva bilateral, ictericia, síndrome meníngeo, respiratorio, hemorrágico o renal, cualquier otro síntoma que el paciente hubiera presentado y fecha en que aparecieron), Resultados de *laboratorio clínico general o inespecífico* (hemograma completo y diferenciado, bilirrubina sérica y transaminasas, e indicadores de la función renal) y *Datos epidemiológicos* (si el paciente tuvo exposición al riesgo y las probables fuentes de infección: lugar de residencia habitual y laboral, contacto con animales domésticos, contacto con roedores y contacto con aguas o ambientes contaminados potencialmente contaminados, como inundaciones, aguas servidas, ríos, arroyos, o lagunas, aguas residuales, cloacas, alcantarilla).

Los datos que contiene esta planilla acompañan generalmente la primera muestra, por esa razón, no contiene información sobre el tratamiento del paciente.

Toda la información de cada muestra y los datos de cada paciente que ingresó al laboratorio del INER, se cargaron en una base de datos para su posterior análisis en este estudio.

5.3. Etapas de la enfermedad

Las muestras fueron obtenidas en diferentes momentos de la enfermedad. De la/s diferencia/s entre las fechas de la/s toma/s de muestra y del inicio de los síntomas se obtuvieron los tiempos de evolución de la enfermedad para cada muestra y según ellos se las agrupó en tres etapas: Etapa 1 (menos de 10 días de

evolución), Etapa 2 (de 10 a 25 días de evolución) y Etapa 3 (más de 25 días de evolución). Se calculó la media, mediana, DS e Intervalos de Confianza del 95% (IC95%) de los períodos de evolución.

6. CRITERIOS DE DEFINICIÓN DE CASOS

Se utilizó un criterio de definición de casos que incluyó los resultados a la prueba serológica de referencia internacional (MAT), antecedentes de síntomas clínicos y de laboratorio clínico general o inespecífico según las recomendaciones internacionales (WHO-ILS, 2003) y la experiencia del grupo de trabajo en el tema.

6.1. Casos Confirmados.

Se definieron como casos confirmados de leptospirosis a los pacientes con sospecha clínica de leptospirosis, que presentaron resultados de laboratorio general o inespecífico compatibles con la enfermedad (recuento de leucocitos $>8000/\text{mm}^3$ y de neutrófilos $>70\%$) sumado a:

a) Seroconversión de la MAT (aumento de 4 veces o más en los títulos de anticuerpos o seroconversión de negativo a positivo), en dos o más muestras de suero de diferentes etapas de la enfermedad, o

b) Un título de la MAT $\geq 1/200$, en una única muestra de suero, o

c) Cultivo positivo y/o RT-PCR detectable. Este criterio sólo fue empleado en el Capítulo V, donde solo se compararon métodos.

6.2. Casos No Confirmados

Se consideraron casos no confirmados de leptospirosis a todos los pacientes con sospecha de leptospirosis derivados al laboratorio del INER que no cumplieron el criterio para ser caso confirmado de leptospirosis. Estos pacientes y sus muestras se excluyeron de todos los análisis, tanto para la evaluación de los diferentes métodos diagnósticos como para los estudios clínicos y epidemiológicos.

6.3. No Casos (Casos con diagnóstico de leptospirosis descartado).

Se definió como No Caso o Caso con diagnóstico de leptospirosis descartado, a los pacientes donde:

a) se sospechó inicialmente leptospirosis pero luego se obtuvo un diagnóstico positivo para otra enfermedad, o

b) se obtuvieron resultados de laboratorio general o inespecífico poco compatibles con leptospirosis (recuento de leucocitos $\leq 8,000/\text{mm}^3$ y de neutrófilos $\leq 70\%$), y un título de MAT negativo ($\leq 1/50$) en muestras obtenidas en diferentes etapas de la enfermedad.

6.4. Controles.

Se incluyeron también muestras de niños de zona endémica de menos de 4 años de edad (n=49) como controles. Estas muestras se incluyeron en la evaluación global de los cuatro ELISAs desarrollados, pero no pudieron ser incluidos en el análisis por etapas, ya que al ser controles sanos no disponían de fecha de evolución de la enfermedad.

6.5. Casos confirmados con otras patologías

Casos confirmados de dengue (n=30), fiebre hemorrágica argentina (FHA) (n=52), hantavirus (n=32) y hepatitis (n=19). Esta población fue seleccionada para evaluar la reactividad cruzada de las pruebas diagnósticas evaluadas frente a las patologías que constituyen los principales diagnósticos diferenciales de leptospirosis en Argentina. El diagnóstico de hepatitis A y hantavirus fue confirmado por ELISA IgM de captura; MAC-ELISA (antígeno MIX D1, 2, 3 y 4) y prueba de neutralización para dengue y ELISA IgG en muestras de período agudo y convaleciente para FHA.

Las muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de otras patologías no se incluyeron en los análisis por etapas de ninguno de los métodos evaluados por no disponer del dato confiable de los días de evolución en esas muestras; Se incluyeron en la evaluación global del TR y de los cuatro ELISA desarrollados, independientemente de las etapas de la enfermedad.

6.6. Casos probables

Se definieron como casos probables aquellos pacientes con antecedentes clínicos y epidemiológicos compatibles, que resultaron positivos a la MAT con

título menor de 1/200 en la primera y/o segunda muestra y/o con al menos neutrofilia mayor al 70% y leucocitosis mayor a 8.000/mm³.

Estos casos sólo se emplearon en el análisis de la primera evaluación del ELISA con antígeno extractivo para demostrar la validez de la clasificación de casos utilizada.

7. EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

7.1. Diseño de los estudios

El diseño del estudio de evaluación de las pruebas diagnósticas fue de tipo observacional transversal, evaluando simultáneamente tanto las condiciones de sanos o de enfermos en general (o casos y no casos en particular) como las de positivos o de negativos a la prueba. Para determinar el verdadero estado de salud o enfermedad de los individuos, se utilizó un criterio de definición de casos descripto previamente.

Los sueros utilizados para la evaluación del TR y de cada uno de los ELISAs desarrollados fueron procesados a doble ciego para controlar el *sesgo de revisión* y por duplicado para controlar el *error aleatorio*.

Se minimizó el *sesgo de verificación* aplicando los resultados de cada uno de los ELISAs desarrollados y evaluados y del TR sumado a la confirmación por MAT, a todos los pacientes incluidos en el estudio en forma independiente de los resultados obtenidos en cada una de estas pruebas. La inestabilidad cuantitativa se estimó mediante los IC95%.

Para asegurar la validez interna del estudio se siguieron protocolos estándar (POEs) y se utilizó siempre el mismo laboratorio bajo las mismas condiciones de operación. La estimación de la sensibilidad y especificidad se efectuó con las lecturas realizadas por un mismo operador especializado para cada tipo de prueba, usando muestras de referencia provenientes de pacientes sanos y de pacientes enfermos.

Para asegurar la *validez externa* del estudio se tomó una muestra representativa de la población de referencia.

7.2. Muestra representativa

El número (n) de individuos sanos y enfermos en general (o casos confirmados y no casos en particular) a incluir en el estudio se determinó mediante la fórmula para estimar el Intervalo de Confianza (IC) de una proporción.

$$n = \frac{Z^2 p (1 - p)}{e^2}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra.

Z = valor de tabla.

p = sensibilidad o especificidad.

e = margen de error.

El número de muestra mínimo calculado, considerando una sensibilidad y especificidad estimada del 90%, un error absoluto del 5% y un nivel de confianza del 95%, fue de 138 para la evaluación de cada uno de los métodos diagnósticos de este estudio, utilizando el programa Epi Info 6.04. El siguiente programa ([Disponible en: www.measuringusability.com/world.htm](http://www.measuringusability.com/world.htm)) también permite calcular los (n) con diferentes grados confianza para muestras con n <150.

En cada capítulo de resultados se describe el n empleado para cada evaluación de cada método diagnóstico, que siempre superó este n estimado mediante el cálculo descrito en este punto.

7.3. Punto de corte

Para determinar el punto o valor de corte (*“cut off”*) óptimo del ELISA se empleó el análisis de la curva ROC utilizando el programa Medcalc®. El punto de corte se establece sistemáticamente sobre todo el rango de los valores observados, determinando sensibilidad y especificidad para cada uno de los k puntos operativos. Los resultantes k pares son graficados como curva ROC.

Para este análisis se empleó como variable discriminante el criterio de definición de casos. Se definió la probabilidad de enfermedad a través de la comparación con el criterio de definición de casos y se dividió en poblaciones de individuos sanos y enfermos según fueron casos confirmados o no casos.

7.4. Sensibilidad, especificidad e Índice de Youden

La sensibilidad se calculó como la proporción de individuos enfermos de leptospirosis (casos confirmados) positivos a la prueba diagnóstica a evaluar. La especificidad se calculó como la proporción de individuos sin leptospirosis (no casos), que fueron negativos a la prueba diagnóstica a evaluar.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{PV}}{(\text{PV} + \text{FN})} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{NV}}{(\text{NV} + \text{FP})} \times 100$$

Donde PV son positivos verdaderos, FP falsos positivos, NV negativos verdaderos y FN falsos negativos (Tarabla, 2000). Los FP y FN miden el error sistemático de las pruebas diagnósticas.

Los índices de Youden (J) se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula: $J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$ (Szklo y Nieto, 2003).

7.5. Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN)

Los VPP y VPN se calcularon de acuerdo a la base algebraica del Teorema de Bayes, introducido a la práctica médica por Connell y Koepsell (1985).

El VPP se calculó como:

$$\text{VPP} = \frac{\text{PR} \times \text{Sens}}{\text{PR} \times \text{Sens} + (1 - \text{PR}) \times (1 - \text{Esp})}$$

Por su parte el VPN fue calculado como:

$$\text{VPN} = \frac{(1 - \text{PR}) \times \text{Esp}}{(1 - \text{PR}) \times \text{Esp} + \text{PR} \times (1 - \text{Sens})}$$

Con los valores predictivos se hicieron las diferentes interpretaciones de los resultados de cada prueba diagnóstica.

7.6. Grado de concordancia

La concordancia fue determinada mediante la prueba estadística Kappa (K) (Tarabla, 2000).

$$K = \frac{CO - CE}{1 - CE}$$

1-CE

Donde:

$$CO = [Pr A (+) y B (+)] + [Pr A (-) y B (-)]$$

$$CE = \frac{Pr A (+) \times B (+) + Pr A (-) \times B (-)}{n^2}$$

Pr= probabilidad

(+)= positivo y (-) negativo

La Concordancia Observada (CO) se calculó como la suma de la probabilidad de los resultados positivos y negativos a ambas pruebas. Para corregir el grado de acuerdo debido solamente a la intervención del azar se calculó la Concordancia Esperada (CE) y la razón Kappa (K). La CE incorpora los valores marginales de cada prueba.

Los valores de K (kappa) mayores a 0,75 se interpretaron como una concordancia excelente, entre 0,75 y 0,40 como moderada y menores a 0,40 como pobre (Hui y Walter, 1980; Szklo y Nieto, 2003).

7.6.1. Evaluación del error aleatorio: concordancia intra-operator (repetibilidad) e inter-operator (reproducibilidad)

Se calcularon la concordancia intra-operator de los diferentes ELISAs desarrollados y la concordancia intra-operator e inter-operator del TR.

La concordancia entre las lecturas tanto intra como inter operador se midieron mediante el coeficiente *kappa* (k) y el error aleatorio se cuantificó por el IC95%.

Las muestras empleadas para la evaluación de la variabilidad intra e inter operador en la evaluación del TR fueron escogidas al azar, codificadas adecuadamente para evitar interpretaciones subjetivas y luego leídas por 3 operadores diferentes (A, B y C) y por duplicado cada operador. Para la evaluación de la variabilidad intra observador (A) e inter observador (A versus B) se utilizaron 106 muestras, mientras que para la evaluación inter observador (A y B versus C) se emplearon 65 muestras.

La concordancia intra-operador de los ELISAs desarrollados se calculó sobre el total de muestras escogidas para este estudio y sus duplicados, siguiendo la misma metodología para evitar interpretaciones subjetivas.

7.7. Evaluación de los ELISAs desarrollados y del TR

Se hicieron dos evaluaciones, una para cada etapa (1, 2 y 3) y otra en forma global, independientemente de las etapas de la enfermedad. En el análisis global se pudieron incluir las muestras con diagnóstico confirmado de otras patologías y controles que, por no ser enfermos, no disponen del dato de los días de evolución de la enfermedad. En cada análisis se calcularon la sensibilidad, especificidad, IC 95%, VPP y VPN del TR y de cada uno de los ELISAs desarrollados. Se aplicaron diferentes indicadores y programas de cálculo para la evaluación debido a las diferencias en la expresión de sus resultados, cuantitativos en los ELISAs y cualitativos en el TR.

7.7.1. ELISAs

En el caso de los ELISAs, por ser sus resultados variables cuantitativas continuas, se determinó el valor de corte de cada uno para poder interpretar sus resultados como positivos o negativos. Se calculó el AUC de cada ELISA evaluado para conocer su eficacia (sensibilidad y especificidad combinada). Se hizo también la comparación de las AUC de los diferentes ELISAs para conocer si existían diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las eficacias de ellos.

Para determinar los valores de corte o (*“cut off”*), sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, IC95%, curvas ROC y AUC de los diferentes ELISAs desarrollados se emplearon los programas estadísticos MedCalc© y Epidat 3.1.

7.7.2. TR

El resultado de la lectura del TR es una variable cualitativa (dicotómica). Para la evaluación del TR, fue necesaria previamente la confección de la tabla de 2 x 2, considerando la variable dicotómica (TR reactivo/ TR no reactivo).

Luego se calcularon la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, IC95% e índices de Youden del TR empleando el programa Epidat 3.1.

8. ESTUDIO DE META-ANÁLISIS

8.1. Criterios para la selección de los estudios

Para la realización del meta-análisis fueron seleccionados estudios donde se evaluó la eficacia de las pruebas de ELISA para detectar anticuerpos contra *Leptospira* en humanos. Las revisiones o artículos duplicados fueron excluidos (Figura 5). Los estudios seleccionados debían aportar datos necesarios para estimar la eficacia de las pruebas diagnósticas (en términos de sensibilidad y especificidad) a partir de la construcción de tablas de 2x2.

Varios de los artículos seleccionados reportaron la evaluación de más de una prueba de ELISA frente a la prueba de referencia (MAT). En estos casos se consideró cada comparación (ej.: estudios que usaron diferentes tipos de ELISA o en pacientes en diferentes etapas de la enfermedad) de manera separada.

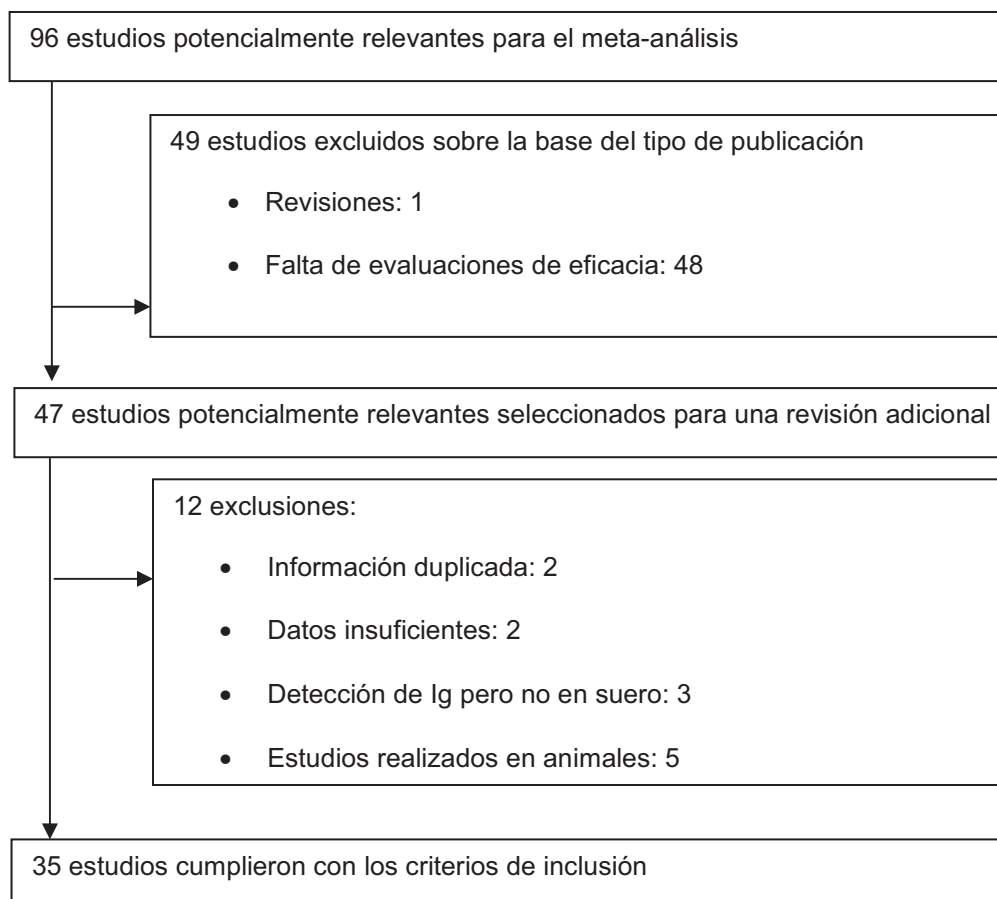


Figura 5. Esquema para la selección de estudios del meta-análisis.

8.2. Variables de resultado y definiciones

Se calculó la sensibilidad, especificidad y el *odds-ratio* diagnóstico (ORD) de cada estudio incluyendo IC95%, los cuales fueron presentados a través de gráficos tipo *forest plots*. El ORD expresa cuanto mayor es el OR de estar enfermo entre las personas con resultado positivo que entre las que tienen resultado negativo. Es una medida simple del rendimiento diagnóstico de la prueba.

8.3. Fuente de datos

Los artículos fueron seleccionados a partir de una búsqueda realizada en las bases de datos de PubMed y Scopus, publicados entre 1980 y 2011 sin restricciones de lenguaje. Los términos de búsqueda incluyeron *leptospirosis*, *human* y ELISA. Los resúmenes y artículos completos fueron evaluados para seleccionar aquellos que se ajustaron a los criterios de inclusión definidos *a priori*.

8.4. Extracción de los datos

Los datos metodológicos y técnicos, número de pacientes, criterios utilizados para la selección de los grupos control y casos, número de VP, VN, FP y FN, fueron extraídos a partir de cada estudio. La metodología empleada en cada artículo fue analizada para evaluar la calidad de los estudios. No obstante, no se emplearon calificaciones de calidad para excluir los estudios (Lean y col., 2009).

8.5. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Meta-Disk 1.4 (Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España). Para cada prueba de ELISA investigada se calculó la sensibilidad, especificidad, cocientes de probabilidad positivo y negativo y el valor de *odds ratio* diagnóstico (ORD), incluyendo el IC95%.

Cada estudio en el meta-análisis contribuyó con un par de valores: sensibilidad y especificidad. Con el objetivo de analizar si los estudios incluidos utilizaron diferentes umbrales para definir los resultados positivo y negativo de la prueba, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman entre sensibilidad y especificidad. De existir el efecto umbral debería observarse una correlación

inversa entre sensibilidad y especificidad. Asimismo, se confeccionó una curva ROC resumen (SROC, del inglés: "*Summary ROC*") para explorar visualmente el efecto del punto de corte en los resultados obtenidos en una curva con un patrón curvilíneo.

Aparte de las variaciones debidas al efecto del punto de corte de la prueba, existen otras fuentes potenciales que pueden generar variaciones en los estimados de eficiencia entre los estudios. La heterogeneidad entre los estudios fue evaluada mediante la prueba de DerSimonian y Laird (Estadística- Q) y el índice de Inconsistencia (estadística- I ; Higgins y Thompson, 2002). La siguiente clasificación fue utilizada para interpretar la magnitud de los valores de I^2 : valores inferiores al 25%, entre el 50% y el 75% y superiores al 75% fueron considerados como heterogeneidad baja, media y alta, respectivamente (Higgins y Thompson, 2002).

Fuentes adicionales de heterogeneidad fueron investigadas mediante el análisis de subgrupos previamente especificados (análisis estratificado). Los datos fueron estratificados de acuerdo con la etapa de la enfermedad (aguda o convaleciente), tipo de inmunoglobulina que detecta la prueba de ELISA (IgM, IgG o IgA) y el tipo de antígeno empleado en el desarrollo de cada prueba de ELISA: antígeno proveniente de células completas de leptospiras o antígeno recombinante/sintético.

Adicionalmente se realizó una meta-regresión para investigar fuentes adicionales de heterogeneidad. En este modelo de regresión lineal se empleó el ORD como variable de respuesta. Las variables independientes (fase de la enfermedad, tipo de inmunoglobulina y tipo de antígeno) fueron empleadas como covariables con potencial de estar asociadas con la variabilidad en el ORD. Los resultados del modelo de meta-regresión fueron reportados como *odds-ratio* diagnóstico relativos (RDOR, del inglés: "*Relatives diagnostics odds-ratio*"), la cual es una transformación exponencial de los coeficientes estimados de cada covariable e indica el cambio en el rendimiento diagnóstico de la prueba en estudio por aumento de una unidad en la covariable correspondiente (Flores y col., 2005).

9. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS Y FACTORES DE RIESGO

9.1. Distribución de las frecuencias de los datos de vigilancia

Para el análisis descriptivo de las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con leptospirosis confirmada se calcularon las proporciones y medias \pm desviaciones estándar (SD).

En pacientes con leptospirosis confirmada se realizó la distribución de frecuencias de: serogrupos implicados, distribución en los diferentes meses del año, ocupación y provincia de residencia.

9.2. Comparación de pacientes con leptospirosis confirmada y sin leptospirosis

Se utilizaron los métodos de Chi-cuadrado y T de Student's para determinar la existencia de diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos de pacientes (Casos confirmados y No casos) con respecto a los serogrupos presumiblemente infectantes, signos clínicos y resultados clínicos de laboratorio, y la exposición al riesgo. El Chi-cuadrado para las variables dicotómicas y el T de Student's para las continuas.

9.3. Factores de riesgo de leptospirosis humana

Para evaluar los factores de exposición y el riesgo de leptospirosis se utilizó un análisis de Casos y Controles. Los casos fueron aquellos con leptospirosis confirmada. Los controles fueron aquellos que habían tenido un diagnóstico descartado de leptospirosis (No Casos de leptospirosis). Los niños fueron excluidos de los análisis de los datos laborales y relacionados con el trabajo. Para estimar la relación entre la exposición y el riesgo de contraer leptospirosis se utilizaron los Chi cuadrados, los "odds ratios" (OR) y los Intervalos de Confianza del 95% (IC95%). Primero se hizo un análisis univariado para identificar los posibles factores de riesgo y luego se hizo el análisis multivariado o regresión logística.

Se realizó una regresión logística para identificar asociaciones espurias, factores de confusión o relaciones de riesgo independientes entre las exposiciones que fueron identificadas como importantes factores de riesgo en el análisis

univariado. Para obtener el mejor modelo de ajuste se utilizó la aproximación mediante la eliminación paso a paso hacia atrás (del inglés: "*stepwise backward elimination*"). Se determinaron los parámetros del modelo mediante la estimación de la máxima verosimilitud (del inglés: "*maximun likelihood*"), con un criterio de convergencia de 0,01 para un máximo de 10 interacciones. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Statistix 7.0.

4 RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

CAPITULO I

OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN, EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE ANTÍGENOS EXTRACTIVOS, SINTÉTICOS Y RECOMBINANTES PARA EL DESARROLLO DE REACTIVOS DE ELISA

1. RESUMEN

Objetivos. Diseñar y obtener antígenos extractivos, sintéticos y recombinantes. Evaluar la utilidad de cada uno de estos antígenos, solos o en combinación, para el desarrollo de reactivos de ELISA.

Metodología y Resultados.

Antígeno extractivo: se obtuvieron once antígenos sonicados provenientes de cultivos de once cepas patrón (Castellon3, Hound Utrecht IV, Moskva V, M20, Hebdomadis, Pomona, Salinem, Perepelicin, 3705 y Hardjoprajitno y Patoc I). Se estudió la utilidad individual de cada uno de ellos y luego combinados en diferentes ensayos de ELISA. La selección se hizo considerando la mayor capacidad de discriminación con paneles de sueros positivos y negativos.

Antígeno sintético: el mapeo de epitopes se llevó a cabo mediante la síntesis de dos bibliotecas de fragmentos de péptidos superpuestos correspondientes a la secuencia completa de LipL32 (residuos 1 a 272) y LipL41 (residuos 1 a 355) de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Los péptidos se sintetizaron sobre membranas de celulosa derivatizadas mediante el método de síntesis denominado SPOT. En LipL32 se identificaron dos regiones antigénicas entre los aminoácidos 151 a 177 y 181 a 204. Estos péptidos se identificaron como P1 y P2, luego fueron sintetizados y evaluados por su capacidad de reacción mediante pruebas de ELISA. En LipL41 no se identificaron epitopes antigénicos.

Antígenos recombinantes: la obtención se realizó en *Escherichia coli* por técnicas de ADN recombinante a partir de *Leptospira interrogans* Copenhageni serogrupo Icterohaemorrhagiae. Se realizó inicialmente la producción de LipL32 y LipL41 completas. Sobre la base de los resultados obtenidos en el mapeo de epitopes de LipL32, se diseñó y obtuvo una última proteína recombinante (LipL32 Δ 150N Δ 67C) que incluía los péptidos P1 y P2.

Conclusiones.

El antígeno extractivo seleccionado fue un extracto de una mezcla de serovares Pyrogenes (Cepa: Salinem) y Tarassovi (Cepa: Perepelicin) de *L. interrogans* en partes iguales. La identificación y análisis de los epitopes sugieren la existencia de dos regiones antigénicas dentro de la LipL32. Los péptidos que contienen estas regiones (P1 y P2) mostraron una buena capacidad de reconocimiento de anticuerpos anti-leptospiras. Con estos resultados se diseñó y obtuvo una proteína recombinante. Con los cuatro antígenos seleccionados se desarrollaron cinco ensayos de ELISA, cuatro de los cuales fueron elegidos para su posterior evaluación en profundidad.

2. RESULTADOS

2.1. Obtención, identificación, evaluación y selección de antígenos

2.1.1. Antígenos extractivos

La selección de los diferentes antígenos extractivos se hizo entre los once antígenos obtenidos a partir de cultivos de cepas patrón, diez cepas provenientes de *Leptospira interrogans* (Castellon3, Hound Utrecht IV, Moskva V, M20, Hebdomadis, Pomona, Salinem, Perepelicin, 3705 y hardjoprajitno) y una de *Leptospira biflexa* (Patoc I).

Se evaluaron los extractos de cada una de las 11 variedades de *Leptospira* descritas. Se estudió la utilidad individual de cada uno de ellos en diferentes ensayos de ELISAs, y luego se combinaron las diferentes cepas en base a los resultados de los ensayos individuales obtenidos. La selección se hizo considerando la mayor capacidad de discriminación con paneles de sueros positivos y negativos de referencia, estudiando no sólo la respuesta de las diferentes cepas frente a los pooles o mezclas de sueros positivos y negativos, sino también de muestras individuales. Con el fin de evaluar la capacidad de reaccionar de cada una de las cepas empleadas como antígeno frente a los anticuerpos específicos del mismo serogrupo o de otros serogrupos presentes en las muestras de los casos confirmados, se incluyeron sueros MAT positivos que presentaron títulos de anticuerpos frente a todas las variedades de leptospiaras presentes en el cepario.

Todas las cepas empleadas como antígenos fueron capaces de reaccionar, en mayor o menor medida, no sólo frente a los anticuerpos específicos del mismo serogrupo, sino también frente a anticuerpos específicos de serogrupos de leptospiaras diferentes a los de la cepa empleada como antígeno.

El antígeno seleccionado fue un extracto de una mezcla de serovares Pyrogenes (Cepa: Salinem) y Tarassovi (Cepa: Perepelicin) de *L. interrogans* en partes iguales, por mostrar la mayor capacidad para distinguir y separar mezclas de sueros (positivos y negativos) provenientes de casos confirmados y no casos respectivamente y también de muestras positivas y negativas de casos individuales.

2.1.2. Antígenos sintéticos

Para poder identificar los posibles antígenos dentro de las lipoproteínas en estudio fue necesario un paso previo. Se realizó un mapeo de epitopes mínimos de reconocimiento de LipL32 y LipL41 utilizando una secuencia común a leptospirosis patógenas (*Leptospira interrogans* serovar Copenhageni <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>), con el objetivo de: identificar posibles epitopes antigénicos de estas lipoproteínas y evaluar su capacidad de reconocimiento por anticuerpos específicos en ensayos de inmunoenzimáticos.

2.1.2.1a. Identificación de epitopes antigénicos de la *LipL32*

Los ochenta y siete pentadecapéptidos superpuestos sintetizados correspondientes a la secuencia completa de la LipL32 y sus secuencias se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Biblioteca de 87 pentadecapéptidos superpuestos sintetizados correspondientes a la secuencia completa de **LipL32** de *Leptospira interrogans*.

Spot N°	Secuencia	Spot N°	Secuencia	Spot N°	Secuencia
1	MKKLSILAISVALFA	30	AVIAEMGVRMISPTG	59	HNKYNSLTRIKIPNP
2	LSILAISVALFASIT	31	AEMGVRMISPTGEIG	60	YNSLTRIKIPNPPKS
3	LAISVALFASITACG	32	GVRMISPTGEIGEPG	61	LTRIKIPNPPKSFDD
4	SVALFASITACGAFG	33	MISPTGEIGEPGDGD	62	IKIPNPPKSFDDLKN
5	LFASITACGAFGGLP	34	PTGEIGEPGDGDLVS	63	PNPPKSFDDLKNIDT
6	SITACGAFGGLPSLK	35	EIGEPGDGDLVSDAF	64	PKSFDDLKNIDTKKL
7	ACGAFGGLPSLKSSF	36	EPGDGDLVSDAFKAA	65	FDDLKNIDTKKLLVR
8	AFGGLPSLKSSFVLS	37	DGDVSDAFKAATPE	66	LKNIDTKKLLVRGLY
9	GLPSLKSSFVLS EDT	38	LVSDAFKAATPEEKS	67	IDTKKLLVRGLYRIS
10	SLKSSFVLS EDTIPG	39	DAFKAATPEEKSM PH	68	KKLLVRGLYRISFTT
11	SSFVLS EDTIPGTNE	40	KAATPEEKSM PHWFD	69	LVRGLYRISFTTYKP
12	VLS EDTIPGTNETVK	41	TPEEKSM PHWFDTWI	70	GLYRISFTTYKPGEV
13	EDTIPGTNETVK TLL	42	EKSM PHWFDTWIRVE	71	RISFTTYKPGEVKGS
14	IPGTNETVK TLLPYG	43	MPHWFDTWIRVERMS	72	FTTYKPGEVKGSFVA
15	TNETVK TLLPYGSVI	44	WFDTWIRVERMSAIM	73	YKPGEVKGSFVASVG
16	TVK TLLPYGSVINYY	45	TWIRVERMSAIMPDQ	74	GEVKGSFVASVGLLF
17	TLLPYGSVINYYGYV	46	RVERMSAIMPDQIAK	75	KGSFVASVGLLFP PG
18	PYGSVINYYGYVKPG	47	RMSAIMPDQIAKAAK	76	FVASVGLLFP PGIPG
19	SVINYYGYVKPGQAP	48	AIMPDQIAKAAKAKP	77	SVGLLFP PGIPGVSP
20	NYYGYVKPGQAPDGL	49	PDQIAKAAKAKPVQK	78	LLFP PGIPGV SPLIH
21	GYVKPGQAPDGLVDG	50	IAKAAKAKPVQKLDD	79	PPGIPGV SPLIHSNP
22	KPGQAPDGLVDGNKK	51	AAKAKPVQKLDDDDD	80	IPGV SPLIHSNPEEL
23	QAPDGLVDGNKKAYY	52	AKPVQKLDDDDDGDD	81	VSPLIHSNPEELQKQ
24	DGLVDGNKKAYYLYV	53	VQKLDDDDGDDTYK	82	LIHSNPEELQKQAIA
25	VDGNKKAYYLYVWIP	54	LDDDDGDDTYKEER	83	SNPEELQKQAIAAEE
26	NKKAYYLYVWIPAVI	55	DDDGDDTYKEERH NK	84	EELQKQAIAAEE SLK
27	AYYLYVWIPAVIAEM	56	GDDTYKEERHNKYNS	85	QKQAIAAEE SLK KAA
28	LYVWIPAVIAEMGVR	57	TYKEERHNKYNSLTR	86	AIAAEE SLK KAASDA
29	WIPAVIAEMGVRMIS	58	EERHNKYNSLTRIKI	87	AAEE SLK KAASDATK

Las bibliotecas fueron sintetizadas desde el extremo superior izquierdo identificando al primer SPOT con el n°1, 25 SPOTs por línea. Cada secuencia del péptido superpone tres aminoácidos del péptido anterior.

Los resultados del análisis SPOT de LipL32 con muestras de suero de conejo hiperimmune se muestran en la Figura 6.



Figura 6. Reactividad de la biblioteca de **LipL32** frente a sueros de conejo: (a) mezcla de sueros negativos (b) mezcla de sueros hiperinmunes.

En la biblioteca correspondiente a la LipL32, (Figura 6, imagen a) no se observa reactividad inespecífica. En la tercera línea de la Figura 6, imagen b, se pueden observar los SPOTs coloreados que indican la reacción primaria péptido-anticuerpo anti-leptospira. De acuerdo a la intensidad de los puntos o imágenes (SPOTs), las regiones más reactivas de la LipL32 fueron localizadas por los puntos o SPOTs 51 a 55 y los SPOTs 61 a 64. Estos resultados sugieren fuertemente la existencia de dos regiones antigénicas en LipL32, que pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos anti-leptospiras. Estas regiones reactivas de LipL32 son altamente conservadas entre los aislamientos de las variantes antigénicas de *Leptospira spp.* y no muestran homología con las secuencias de otros microorganismos.

De acuerdo con estos resultados, se hallaron dos regiones reactivas identificadas como péptido P1: (región de 151 a 177) secuencia AAKAKPVQKLDDDDGDDTYKEERH NKYNS, y péptido P2: (región desde 181 hasta 204) secuencia YNSLTRIKIP NPPKSFDDLKNIDTKKLV RG.

2.1.2.1b. Identificación de epitopes antigénicos de la LipL41

Los ciento quince pentadecapéptidos superpuestos sintetizados y sus secuencias correspondientes a la LipL41 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Biblioteca de 115 pentadecapéptidos superpuestos sintetizados correspondientes a la secuencia completa de **LipL41** de *Leptospira interrogans*.

Spot N°	Secuencia	Spot N°	Secuencia	Spot N°	Secuencia
1	MRKLSSLISVLVLL	40	AKIGNLIGAEAILYI	79	AAAYIKGRLSPIVKT
2	LSSLISVLVLLMFLG	41	GNLIGAEAILYIGYQ	80	YIKGRLSPIVKTERI
3	LISVLVLLMFLGNCA	42	IGAEAILYIGYQKPY	81	GRLSPIVKTERIKVVF
4	SVLVLLMFLGNCAAT	43	EAILYIGYQKPYTEC	82	SPIVKTERIKVVFVKD
5	VLLMFLGNCAATVDV	44	LYIGYQKPYTECSTE	83	VKTERIKVVFVKDEDE
6	MFLGNCAATVDVEYP	45	GYQKPYTECSTENKI	84	ERIKVVFVKDEDEEVK
7	GNCAATVDVEYPVFP	46	KPYTECSTENKIDAV	85	KVVFVKDEDEEVKELL
8	AATVDVEYPVFPKDK	47	TECSTENKIDAVAAG	86	VKDEDEEVKELLQEG
9	VDVEYPVFPKDKKEGR	48	STENKIDAVAAGLKV	87	EDEEVKELLQEGYEE
10	EYPVFPKDKKEGRALQ	49	NKIDAVAAGLKVAGF	88	EVKELLQEGYEEIVG
11	VFPKDKKEGRALQKFL	50	DAVAAGLKVAGFAAS	89	ELLQEGYEEIVGETP
12	KDKKEGRALQKFLGTI	51	AAGLKVAGFAASMAT	90	QEGYEEIVGETPSFK
13	EGRALQKFLGTIRNV	52	LKVAGFAASMATGKD	91	YEEIVGETPSFKKAK
14	ALQKFLGTIRNVGLA	53	AGFAASMATGKDVNT	92	IVGETPSFKKAKEAW
15	KFLGTIRNVGLAVEA	54	AASMATGKDVNTGNE	93	ETPSFKKAKEAWEKA
16	GTIRNVGLAVEAPKK	55	MATGKDVNTGNPVS	94	SFKKAKEAWEKADKK
17	RNVGLAVEAPKSLW	56	GKDVNTGNPVS KPT	95	KAKEAWEKADKKAKG
18	GLAVEAPKSLWEAI	57	VNTGNPVS KPTGVR	96	EAWEKADKKAKGQSW
19	VEAPKSLWEAIFGE	58	GNPVS KPTGVRMML	97	EKADKKAKGQSWGAK
20	PKKSLWEAIFGEGSS	59	PVS KPTGVRMMLIPL	98	DKKAKGQSWGAKANL
21	SLWEAIFGEGSSFID	60	KPTGVRMMLIPLDAT	99	AKGQSWGAKANLATY
22	EAIFGEGSSFIDQMP	61	GVRMMLIPLDATLIK	100	QSWGAKANLATY YFS
23	FGEGSSFIDQMPSKV	62	MMLIPLDATLIKVET	101	GAKANLATY YFSTGD
24	GSSFIDQMPSKVFEA	63	IPLDATLIKVETGEV	102	ANLATY YFSTGDFEK
25	FIDQMPSKVFEAFDK	64	DATLIKVETGEVKKA	103	ATY YFSTGDFEKS I K
26	QMPSKVFEAFDKESY	65	LIKVETGEVKKAVVS	104	YFSTGDFEKS I KLYE
27	SKVFEAFDKESY YKL	66	VETGEVKKAVVSSPA	105	TGDFEKS I KLYEEAM
28	FEAFDKESY YKLTDL	67	GEVKKAVVSSPAKIF	106	FEKS I KLYEEAMK L K
29	FDKESY YKLTDL SKR	68	KKAVVSSPAKIFNSV	107	SIKLYEEAMK L KDAD
30	ESY YKLTDL SKRADA	69	VVSSPAKIFNSVGNL	108	LYEEAMK L KDADKSY
31	YKLTDL SKRADAIN E	70	SPAKIFNSVGNLECP	109	EAMK L KDADKSYLRE
32	TDL SKRADAIN EASL	71	KIFNSVGNLECP SIL	110	KLKDADKSYLREL R K
33	SKRADAIN EASLSLT	72	NSVGNLECP SILDSF	111	DADKSYLREL R KRVE
34	ADAIN EASLSLTGIT	73	GNLECP SILDSFGQG	112	KSYLREL R KRVEATF
35	INEASLSLTGITKNR	74	ECPSILDSFGQGLDE	113	LREL R KRVEATFAVD
36	ASLSLTGITKNRAKI	75	SILDSFGQGLDEAAA	114	LRKRVEATFAVDES N
37	SLTGITKNRAKIGNL	76	DSFGQGLDEAAA YIK	115	RVEATFAVDESNAK
38	GITKNRAKIGNLIGA	77	GQGLDEAAA YIKGRL		
39	KNRAKIGNLIGAEAI	78	LDEAAA YIKGRLSPI		

Los resultados del análisis SPOT con muestras de suero de conejo hiperimmune de la LipL41 se muestran en la Figura 7.

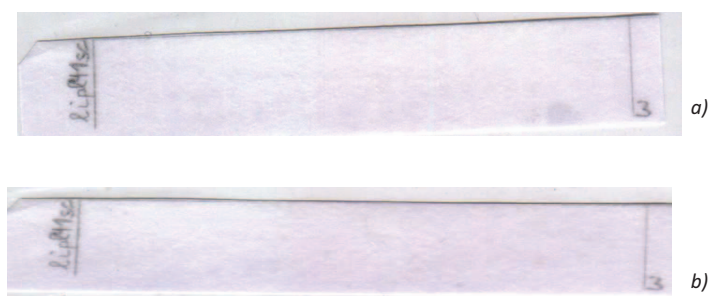


Figura 7. Reactividad de la biblioteca de **LipL41** frente a sueros de conejo: (a) mezcla de sueros negativos y (b) mezcla de sueros hiperinmunes.

En la biblioteca correspondiente a la LipL41 no se observó reactividad en ningún SPOT, por lo que no pudieron identificarse zonas con capacidad de reconocer anticuerpos específicos. Los ensayos fueron repetidos también con muestras de sueros humanos, obteniéndose los mismos resultados. En este contexto no se pudieron identificar epitopes continuos de reconocimiento, aunque no se puede descartar la presencia de epitopes conformacionales que no pueden ser determinados por esta técnica.

2.1.2.2. Evaluación de la capacidad de reconocimiento de anticuerpos específicos de los péptidos sintéticos identificados (P1 y P2) mediante enzimoimmunoensayos.

Para confirmar los epitopes identificados con la biblioteca peptídica, se sintetizaron químicamente dos péptidos (P1 y P2) que contienen los epitopes y se evaluó su utilidad tanto en forma individual como combinados en ensayos ELISA.

Se llevaron a cabo en paralelo tres pruebas serológicas empleando un diseño a ciegas, dos con los péptidos (P1 y P2) como antígenos individuales y otro combinados (P1 + P2), y se lo comparó con el ensayo de ELISA clásico género específico con antígeno extractivo como control de reactividad.

Se incluyeron para este estudio ciento diez (110) muestras de suero (50 de casos confirmados y 60 No casos) de leptospirosis humana en diferentes etapas de la enfermedad. Las muestras fueron seleccionadas al azar del panel de muestras derivadas al Laboratorio del INER.

Los puntos de corte hallados para los ELISA con cada uno de los antígenos peptídicos fueron $DOC >1,79$ y $>1,99$ para P1 y P2 respectivamente. Los resultados de evaluación se muestran en la Tabla 4. Obviamente, como la MAT fue parte de la definición de caso, sus resultados no se incluyen en la tabla.

Tabla 4. Resultados de los diferentes ELISAs en muestras de suero de pacientes con leptospirosis Confirmada y No casos.

Definición de caso (n)	Reactividad de los ensayos de ELISA			
	ELISA Extractivo	P1-ELISA	P2-ELISA	P1+ P2- ELISA
Casos Confirmados (50)	47	44	42	46
No Casos (60)	1	3	3	4

Los tres casos confirmados que no reaccionaron al ELISA con antígeno extractivo, fueron reactivos para todas las pruebas con ELISA que empleaban péptidos sintéticos (P1, P2 y P1+P2). Por otro lado, los seis casos confirmados que no reaccionaron con el P1-ELISA no estaban incluidos dentro de los ocho casos que no reaccionaron con el P2-ELISA.

2.1.3. Antígenos recombinantes

Según la información disponible al inicio de la tesis (Adler y Faine, 1983; Guerreiro, 2001; Bharti, 2003), había cuatro proteínas que se identificaron como los antígenos de *Leptospira interrogans* potencialmente más importantes por su inmunogenicidad: DnaK, GroEL, LipL32 y LipL41. Sin embargo, los resultados hallados durante el desarrollo de la tesis, sumados a que la bibliografía internacional claramente identificaba a LipL32 como la proteína de superficie más inmunogénica, motivaron que se continúe el trabajo sólo con ésta lipoproteína como antígeno.

Previo a la obtención de los antígenos recombinantes, se hizo un análisis informático (Vector NTI Suite 6.0) sobre la secuencia de aminoácidos correspondientes a LipL32, utilizando los datos ofrecidos por el proyecto genoma de *Leptospira interrogans* (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>). Este análisis se hizo con el objeto de identificar regiones *hidrofílicas* y *antigénicas*, para definir los dominios estructurales con potencialidad de constituir determinantes antigénicos (Welling, 1985). El programa grafica dos perfiles uno de hidropaticidad

y otro de antigenicidad. Rápidamente, valores positivos en el perfil de hidropaticidad definen regiones hidrofóbicas y valores positivos en el de antigenicidad representan regiones potencialmente antigénicas. Estos perfiles son muy útiles, para determinar regiones internas de las proteínas (típicamente hidrofóbicas) o externas (típicamente hidrofílicas). Las regiones hidrofílicas son las zonas potencialmente antigénicas, debido a que son las regiones que quedan expuestas y por lo tanto las que tienen la mayor capacidad de generar anticuerpos.

Así, una vez identificadas estas regiones dentro de LipL32, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar, utilizando la técnica de PCR, el fragmento de ADN codificante para el péptido antigénico antes caracterizado. Esta secuencia codificante fue clonada en plásmidos de expresión comerciales (pRSETB, Novagen) siendo el péptido antigénico expresado en *E. coli* y purificado cromatográficamente. En el caso de LipL32 se caracterizó una región potencialmente antigénica a partir del residuo 150 en adelante, lo que coincidió con los resultados obtenidos en el mapeo de epitopes antigénicos.

Para poder llegar a la selección de la única molécula recombinante empleada finalmente en el ELISA que se evaluó en el presente trabajo de tesis, fue necesaria la obtención de varias moléculas y la prueba en inmunoensayos de cada una de ellas.

Se realizó inicialmente la producción de LipL32 y LipL41 completas y se hicieron los ensayos de evaluación de la actividad biológica de ambas proteínas como antígeno en diferentes ELISAs.

LipL41 no mostró reactividad frente a mezclas de sueros positivos, y por lo tanto, no mostró capacidad de diferenciación entre sueros positivos y negativos; coincidiendo con lo hallado en el mapeo de epitopes para esta lipoproteína donde no pudo identificar zonas reactivas. Por esta razón es que se decidió continuar el trabajo de evaluación sólo con LipL32.

Por otra parte se sintetizaron dos moléculas recombinantes de LipL32. La primera molécula (LipL32 Δ 134N) tenía una delección de 134 residuos aminoacídicos en el extremo amino de la proteína. Esta proteína presentó problemas de solubilidad y agregación, dificultando la estandarización del

procedimiento de inmovilización en superficies de inmunocaptura. Por esta razón la evaluación mediante ELISA de esta primera proteína evidenció algo de reactividad frente a la mezcla de sueros positivos pero insuficiente separación entre sueros positivos y negativos. Sobre la base de los resultados obtenidos en el trabajo de mapeo de epitopes de LipL32, se diseñó una nueva proteína recombinante (LipL32 Δ 150N Δ 67C), que tenía delección de los primeros 150 residuos aminoacídicos del extremo amino y los últimos 67 del extremo carboxilo de la proteína y que incluía a los péptidos P1 y P2 descritos anteriormente. Esta segunda proteína, no mostró problemas ni de solubilidad ni de agregación, por lo que fue posible realizar con la misma todos los ELISAs y pudo ser posteriormente evaluada en profundidad.

2.2. Desarrollo de los Enzimoimmunoensayos para la detección de anticuerpos antileptospiras en muestras de suero humano

2.2.1. Selección de las superficies de inmunocaptura y estabilidad de los pocillos sensibilizados.

Se realizaron primero ensayos utilizando diferentes placas de ELISA, tipos, marcas y diferentes presentaciones (completas o tiras) para determinar la que permitía una mejor discriminación frente a paneles reducidos de referencia.

Se probaron placas y tiras separables de las marcas: Dinotech, Nunc, Grainer Bio One, Costar y no se observaron diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$), pero se escogieron las tiras Costar (Cat# Costar 2580 y Costar 2592) por las ventajas operativas de su manejo. La más relevante y exclusiva de estas tiras de esta marca Costar, es que no solo permite trabajar con tiras separables de 8 pocillos, sino que éstas a su vez pueden sub-dividirse en 4, dos o hasta en pocillos individuales. Esto permite, en caso de ser necesario, procesar hasta un mínimo de una muestra incógnita por vez.

Las condiciones óptimas de conservación de los pocillos ya sensibilizados fueron entre 4 y 10°C, y en condiciones de baja humedad (selladas con cinta, incorporación de desecador colocados en una bolsa plástica hermética). Las placas sensibilizadas, conservadas en estas condiciones, resultaron estables hasta 5 años luego de preparadas.

2.2.2. Condiciones óptimas definidas para de cada uno de los ELISAs IgG indirectos desarrollados

2.2.2.1. ELISA con antígeno extractivo

El antígeno extractivo fue inmovilizado por adsorción sobre policubetas de poliestireno de 96 pocillos (Costar, USA, cat. #2592) utilizando una solución de PBS 0.1 M y pH 7,2. Se incubaron 100 µl/pocillo de la disolución (concentración de proteínas totales 10µg/ml) toda la noche a 4°C. Luego de la incubación, las placas se lavaron tres veces con buffer de lavado (PBS con 0,05% de Tween 20, pH 7,2) y tres veces con agua destilada. Luego se secaron y conservaron selladas en bolsas plásticas con desecadores a 4°C hasta su utilización. Las muestras se diluyeron al 1:200 en buffer proteico (PBS con 1% de caseína, Sigma, USA) y 100 µl de esa dilución se incubó por duplicado 30 minutos a 37°C. Luego de la incubación, se lavó 6 veces con buffer de lavado. El conjugado utilizado (Anti-IgG humana Fc gamma-peroxidasa, Chemicon Internacional, USA), se diluyó 1:40.000 con una solución proteica y se incubaron 50µl de esa dilución en todos los pocillos por 30 minutos a 37°C. Luego de la incubación se repitió el paso de lavado. El revelado de la reacción se realizó con 100µl de TMB listo para usar (Zymed, USA) incubando 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 100µl de ácido sulfúrico 1N (2M) y se midió la absorbancia a 450/630 nm en lector para microplacas de ELISA (MRX II, Dynatech) (Tijssen, 1987).

2.2.2.2. ELISA con antígenos sintéticos (P1/P2) y recombinante

El protocolo utilizado en el ELISA empleando péptidos obtenidos por síntesis química es el descrito previamente por Lottersberger y col. (2004). Los péptidos sintéticos y el recombinante fueron adsorbidos sobre placas de poliestireno (Costar, USA, cat. #2592) con 100µl de una solución de 20µg/ml de péptidos (individuales o mezcla) y de 10µg/ml del recombinante en tampón carbonato/bicarbonato (pH 9,6). Las microplacas se incubaron durante 60 minutos a 37°C con 100 µl/pocillo de una dilución 1:100 de suero humano, seguido de una incubación con conjugado marcado con peroxidasa (Anti-IgG humana Fc gamma-peroxidasa, Chemicon Internacional, USA), por 30 minutos a 37 °C. Las placas fueron reveladas mediante la adición de 100µl de una solución que contiene TMB

listo para usar (Zymed, USA). Después de 15 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 100µl de ácido sulfúrico 2N y se leyó a 450/630 nm en lector para microplacas de ELISA (MRX II, Dynatech) (Tijssen, 1987).

En la Tabla 5, se resumen las diferencias comparativas más relevantes en las condiciones de cada uno de los diferentes ELISAs desarrollados con los diferentes antígenos.

Tabla 5. Condiciones óptimas definidas para cada ELISA empleando cada antígeno (Extractivo, P1, P2 y Recombinante).

<i>ELISA con antígenos</i>	<i>Extractivo</i>	<i>P1/P2 y (P1+P2)</i>	<i>Recombinante</i>
<i>Buffer sensibilización</i>	<i>PBS pH 7,2</i>	<i>Carbonato/ Bicarbonato pH 9,6</i>	<i>Carbonato/ Bicarbonato pH 9,6</i>
<i>Dilución de las muestras</i>	<i>1:200</i>	<i>1:100</i>	<i>1:100</i>
<i>Tiempo de incubación de muestras</i>	<i>½ hora</i>	<i>1 hora</i>	<i>1 hora</i>
<i>Número de Lavados (1º y 2º)</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>6</i>
<i>Concentración del conjugado</i>	<i>1/40.000</i>	<i>1/50.000</i>	<i>1/50.000</i>
<i>Tiempo de Incubación del conjugado</i>	<i>½ hora</i>	<i>½ hora</i>	<i>½ hora</i>
<i>Tiempo de Revelado</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>	<i>15 min</i>

3. DISCUSIÓN

Tanto el antígeno extractivo seleccionado como todas las cepas probadas como antígenos fueron capaces de reaccionar en muestras de suero que contenían anticuerpos frente a su mismo serogrupo y diferentes a los de la cepa empleada como antígeno. Esto se debería a que la mayoría de los antígenos reaccionantes, independientemente de la cepa empleada, son los mismos antígenos comunes a todas las leptospiras (variedades patógenas y patógenas) por eso denominados género específicos (WHO-ILS, 2003). Por otro lado los anticuerpos que reaccionan frente a estos antígenos, también denominados género específicos (“co-aglutinantes” o de “reactividad cruzada”), son los primeros en aparecer (Cacciapuoti, 1976; WHO-ILS, 2003). Esto indicaría que cualquiera de estos antígenos podría ser empleado en ensayos de ELISA y reaccionaría independientemente de la variedad de *Leptospira* infectante y además, por

detectar anticuerpos género específicos, le aportaría mayor precocidad al método. Este hecho constituye una ventaja adicional para un método de tamiz como el ELISA, ya que sería capaz de detectar una mayor cantidad de casos, incluso algunos cuyos serogrupos no hayan sido empleados en el panel de la MAT. En nuestro país, donde hay pocos antecedentes de aislamientos y menos aún en humanos, este hecho es relevante ya que en el caso de no emplear el panel ampliado de la MAT que incluye 19 cepas podrían existir falsos negativos de la MAT debidos a la existencia de anticuerpos frente a variedades no incluidas en el panel. Haciendo un tamiz con ELISA y luego confirmado por MAT se resolverían los falsos negativos de la MAT y los positivos del ELISA se procesan luego por MAT para confirmar o descartar los casos e intentar conocer el serogrupo presumiblemente infectante.

En la LipL41 no se identificaron regiones antigénicas. Estos resultados coinciden con los obtenidos con la proteína recombinante, que tampoco mostró reactividad en ensayos ELISA con pools de muestras positivas y negativas. Sin embargo, estos resultados no son coincidentes con estudios previos que describen buena antigenicidad para esta proteína (Guerreiro y col., 2001; Natarajaseenivasan y col., 2004; Cullen y col., 2005). Sería necesario entonces profundizar los estudios para poder identificar o descartar zonas reactivas en la LipL41.

Se identificaron dos epitopes de LipL32 de *Leptospira interrogans*. Los péptidos P1 y P2, que contienen los epitopes identificados fueron capaces de reconocer anticuerpos específicos cuando fueron empleados en la prueba de ELISA. Estos hallazgos preliminares sugieren que estos péptidos podrían ser útiles no sólo para el diagnóstico serológico, sino también para un punto de partida para la caracterización y diseño de vacunas.

Los tres casos confirmados que fueron no reactivos al ELISA extractivo fueron reactivos para todas las pruebas de ELISA que empleaban péptidos sintéticos (P1, P2 y P1+P2). Mientras que, los seis casos confirmados que fueron no reactivos al P1-ELISA no estaban incluidos dentro de los ocho casos no reactivos frente al P2-ELISA. Este hecho podría indicar distintas habilidades de los ELISAs con los diferentes antígenos para detectar diferentes pacientes y/o etapas de la enfermedad. Por lo tanto, una combinación de todos los ensayos interpretados en forma paralela podría aumentar la sensibilidad.

Mientras que, las tres muestras reactivas frente al P1 y/o P2 ELISA y cuatro reactivas frente a P1+P2 ELISA correspondientes a no casos de leptospirosis pueden ser producto de una mayor sensibilidad de estos ensayos o de reactividad cruzada frente a otras enfermedades diferente de leptospirosis.

Trabajos previos que describen zonas antigénicas de otras proteínas de leptospirosis patógenas (LigA, OmpL1, y LipL21) para predecir posibles epitopes, utilizan tanto técnicas de bioinformática (Wiwanitkit, 2007; Lin y col., 2008a; Lin y col., 2008b) o péptidos seleccionados al azar de bibliotecas genéricas (Tungtrakanpoung y col., 2006), y su posterior evaluación con muestras de pacientes con serología positiva. Sin embargo, ninguno de estos estudios ha realizado un mapeo completo de LipL32, ni se han sintetizado pequeños fragmentos de proteínas para evaluar su reactividad frente a anticuerpos específicos anti-leptospirosis como se describe en este estudio.

Los resultados hallados en la evaluación de los antígenos sintéticos reorientaron los estudios con las proteínas recombinantes que no habían tenido resultados del todo satisfactorios. La utilización combinada de P1 más P2 en un mismo ELISA, fue la que permitió mayor detección de casos. Sin embargo, como los casos detectados por los ELISAs individuales no fueron iguales a los de la suma obtenida por el ELISA que incluyó ambos antígenos, se decidió realizar la evaluación definitiva de los péptidos P1 y P2 empleando ELISAs en forma separada y no solamente un único ELISA que emplee ambos antígenos. Esto permitía además conocer la utilidad diagnóstica de cada uno de estos péptidos en forma individual.

Estos resultados motivaron la decisión de desarrollar dos ELISAs diferentes (P1-ELISA y P2-ELISA) y evaluarlos luego en forma separada. También se seleccionó y definió la síntesis de una molécula recombinante que contuviese la secuencia de ambos péptidos y evaluar la reactividad combinada de ellos mediante la prueba de ELISA (P1 más P2). Se seleccionó la metodología de ADN recombinante para la obtención de esta molécula, ya que la longitud de la misma era muy extensa y por lo tanto no era adecuada para realizar una síntesis química clásica como la descrita. Así se obtuvo la última proteína recombinante (LipL32 Δ 150N Δ 67C) que fue la empleada en el desarrollo y evaluación del método diagnóstico de ELISA utilizando antígeno recombinante (REC-ELISA) que se

describe en los próximos capítulos de resultados.

Sobre la base de las posibles habilidades diferentes de los ELISA con estos antígenos para detectar diferentes pacientes y/o etapas de la enfermedad observadas en este estudio se decidió también evaluarlos en diferentes etapas de la enfermedad.

Por lo tanto para ampliar los hallazgos de este estudio, se decidió hacer una investigación más profunda para evaluar y conocer la sensibilidad y especificidad de los ELISAs desarrollados con estos antígenos extractivos, sintéticos y el recombinante que contiene la secuencia de ambos. En los próximos capítulos se describen los resultados de su evaluación para el serodiagnóstico humano empleando un panel más amplio y con muestras de otras enfermedades como el dengue, hantavirus, y la fiebre hemorrágica argentina.

4. CONCLUSIONES

- *El antígeno extractivo seleccionado fue un extracto de una mezcla de serovares Pyrogenes (Cepa: Salinem) y Tarassovi (Cepa: Perepelicin) de L. interrogans en partes iguales.*
- *La identificación y análisis de los epitopes sugieren la existencia de dos regiones antigénicas dentro de la LipL32. Estas regiones son altamente conservadas entre las variantes antigénicas de los aislamientos de Leptospira spp. y no muestran homología con secuencias de otros microorganismos. Los péptidos que contienen estas regiones (P1 y P2) mostraron una buena capacidad de reconocimiento de anticuerpos anti-leptospiras. La relevancia de este hallazgo para el serodiagnóstico humano fue estudiada en profundidad y conocida al finalizar este trabajo de tesis, pero podría tener también relevancia potencial como punto de partida para la caracterización de blancos para el diseño de vacunas.*
- *En base a los resultados del mapeo de epitopes de LipL32 se diseñó y obtuvo una proteína recombinante.*
- *Con los cuatro antígenos seleccionados se desarrollaron cinco ensayos de ELISA (ELISA extractivo, P1-ELISA, P2-ELISA, P1+P2-ELISA y REC-ELISA), cuatro de los cuales fueron elegidos para su posterior evaluación en profundidad.*

CAPITULO II

EVALUACIÓN DE UN ELISA CON ANTÍGENO EXTRACTIVO
PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTILEPTOSPIRAS
DE TIPO IgG EN MUESTRAS DE SUERO HUMANO, EN TRES
ETAPAS DIFERENTES DE LA EVOLUCIÓN DE LA
ENFERMEDAD.

1. RESUMEN

Objetivo: Evaluar el ELISA con antígeno extractivo (género específico) para la detección de anticuerpos antileptospiras de tipo (IgG) en muestras de suero humano en diferentes etapas de la enfermedad.

Métodos: Se analizaron 1077 muestras séricas de 812 pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al laboratorio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de la ciudad de Santa Fe, Argentina, entre 1999 y 2005. Cada muestra se clasificó según el tiempo de evolución de la enfermedad en tres etapas: primera (<10 días), segunda (10–25 días) y tercera (>25 días). En el ELISA, se utilizó como antígeno un extracto de una mezcla de las serovariedades Pyrogenes y Tarassovi cultivadas en medio líquido, tratado con ultrasonidos e inmovilizado por adsorción en placas de poliestireno. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. El valor de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA se determinaron utilizando como patrón la definición de casos. Para determinar el valor de corte óptimo se calculó el área bajo la curva de eficacia diagnóstica (curva ROC).

Resultados: A partir de un criterio de definición de casos basado en los resultados de la microaglutinación (MAT), del recuento de leucocitos, y de los valores de neutrofilia, se incluyeron en el estudio 182 casos confirmados (267 muestras), 167 No casos (293 muestras) y 40 casos probables (60 muestras). La sensibilidad de la prueba evaluada aumentó considerablemente en la segunda etapa (93,2%), con respecto a la primera (68,1%), y descendió en la tercera (78,8%). La especificidad aumentó gradualmente desde el 96,3% en la primera etapa hasta el 100% en la tercera.

Conclusiones: Los resultados obtenidos indican que esta prueba de ELISA podría ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis en todas las etapas y en particular para adelantar el diagnóstico de la enfermedad aguda.

2. RESULTADOS

2.1. Vigilancia y casos

Del total de muestras de pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas para diagnóstico al laboratorio del INER, Argentina, desde enero de 1999 a diciembre de 2005, se incluyeron en el estudio sólo las de aquellos que reunieron los requisitos necesarios para ser clasificados según el criterio de definición de casos. De 1077 muestras individuales y pareadas correspondientes a 812 pacientes recibidas en el período en estudio, resultaron **182 Casos confirmados** (267 muestras: 116 de la primera, 118 de la segunda y 33 de la tercera etapa), **167 No casos** (293 muestras: 108 de la primera, 118 de la segunda y 42 de la tercera etapa) y 40 Probables (60 muestras: 25 de la primera, 26 de la segunda y 9 de la tercera etapa). En un estudio preliminar para evaluar si la población de casos era sesgada o no, se incluyeron en el análisis de los datos a los **40 Probables** dentro de los Casos.

2.2. Población estudiada

Las características de los pacientes incluidos en el estudio fueron: edad de entre 1 y 76 años, con una media de 30 y mediana de 28 y 68 pacientes sin información de edad; el 77,4% de los pacientes (301) fueron del sexo masculino y el 22,6% (88) del femenino; los datos clínicos al momento de la derivación de la primera muestra fueron: fiebre en 261 pacientes (67,1%) y 74 sin información, ictericia en 125 pacientes (32,1%) y 79 sin información, cefalea en 233 pacientes (59,9%) y 84 sin información, ojos rojos bilateral en 142 pacientes (36,5%) y 91 sin información, dolores musculares en 212 pacientes (54,5%) y 81 sin información, síndrome respiratorio en 96 pacientes (24,7%) y 96 sin información, síndrome hepático en 115 (29,6%) y 117 sin información, síndrome renal en 89 (22,9%) y 117 sin información, síndrome meníngeo en 34 (8,7%) y 102 sin información, síndrome hemorrágico en 38 pacientes (9,8%) y 126 sin información; residían en 12 provincias de Argentina, siendo las más representativas las de Santa Fe (32,4%), Entre Ríos (29,6%) y Misiones (26,2%), y solo el 11,9% restante provinieron de las provincias de Jujuy, Buenos Aires, Corrientes, Formosa, La Pampa, Mendoza, Neuquén, Río Negro y Salta.

En relación con la duración de la evolución de la enfermedad en los pacientes incluidos en el estudio, en la primera etapa el valor mínimo fue de 0 días, con una media de $(5,6 \pm 2,4)$ días (IC95%: 5,3 - 5,9) y una mediana de 6,0 días (IC95%: 5,3-6,0); en la segunda etapa, la duración media fue de $(15,3 \pm 4,4)$ días (IC95%: 14,8 - 15,9) y la mediana, de 14,0 días (IC95%, 14,0 - 15,0), y en la tercera etapa la duración máxima de la evolución fue de 494 días, con una media de $(72,6 \pm 72,4)$ días (IC95%: 56,3 - 88,9) y una mediana de 37,0 días (IC95%: 33,3 - 47,3).

2.3. Evaluación del ELISA IgG indirecto con antígeno extractivo

La estimación de la sensibilidad aumentó considerablemente en la etapa 2 en relación a la Etapa 1 y en la Etapa 3 descendió nuevamente. La estimación de la especificidad fue elevada en todas la Etapas (desde 96,3 hasta 100%), aumentando gradualmente desde la Etapa 1 a la 3 (Tabla 6).

Tabla 6. Sensibilidad, especificidad, valor de corte del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis en tres etapas de la enfermedad, Argentina (1999-2005).

<i>Etapa</i>	<i>Nº de muestras Casos Confirmados</i>	<i>Nº de muestras No Casos</i>	<i>Punto de corte (DOC)</i>	<i>Sensibilidad (IC95%)</i>	<i>Especificidad (IC95%)</i>	<i>AUC (IC95%)</i>
1	116	108	>2,3	68,1 (58,8-76,4)	96,3 (90,8-99,0)	0,851 (0,797-0,895)
2	118	143	>2,4	93,2 (96,1-99,9)	99,3 (96,1-99,9)	0,978 (0,952-0,992)
3	33	42	>2,3	78,8 (61,1-91,0)	100 (100,0-100,0)	0,947 (0,870-0,985)

Los valores de sensibilidad y especificidad del ELISA estimados luego de incluir los Probables dentro de los Casos fueron muy similares a los obtenidos considerando sólo los Casos. En la primera etapa la Sensibilidad fue de 68,8% (IC95%: 60,5 - 76,3) y la Especificidad de 96,3% (IC95%: 90,8 - 99,0), en la segunda Etapa la Sensibilidad fue de 86,8% (IC 95%, 80,2 - 91,9) y la Especificidad de 99,3% (IC95%: 96,2 - 99,9) y en la tercera Etapa la Sensibilidad fue de 73,8% (IC95%: 58,0 a 86,1) y la Especificidad de 100% (IC95%: 100 - 100).

En las figuras 8, 9 y 10 se presentan los diagramas de puntos y curvas ROC de las muestras con resultados positivos y negativos en el ELISA según el criterio de definición de casos en la primera, segunda y tercera etapa, respectivamente.

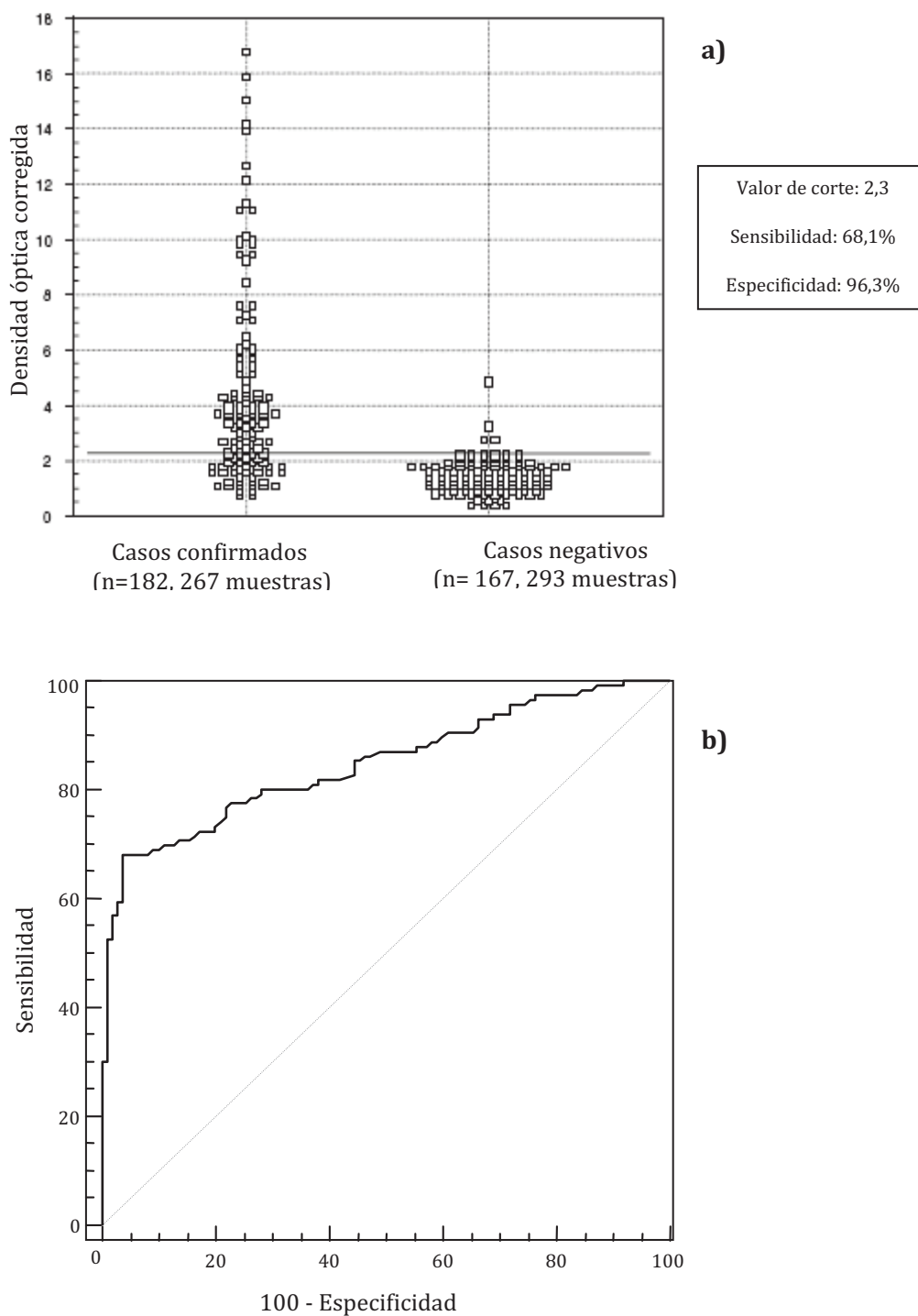


Figura 8. (a) Diagrama de puntos y (b) Curva ROC de los resultados del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis según el criterio de la definición de casos en la etapa 1 de la enfermedad, Argentina (1999-2005).

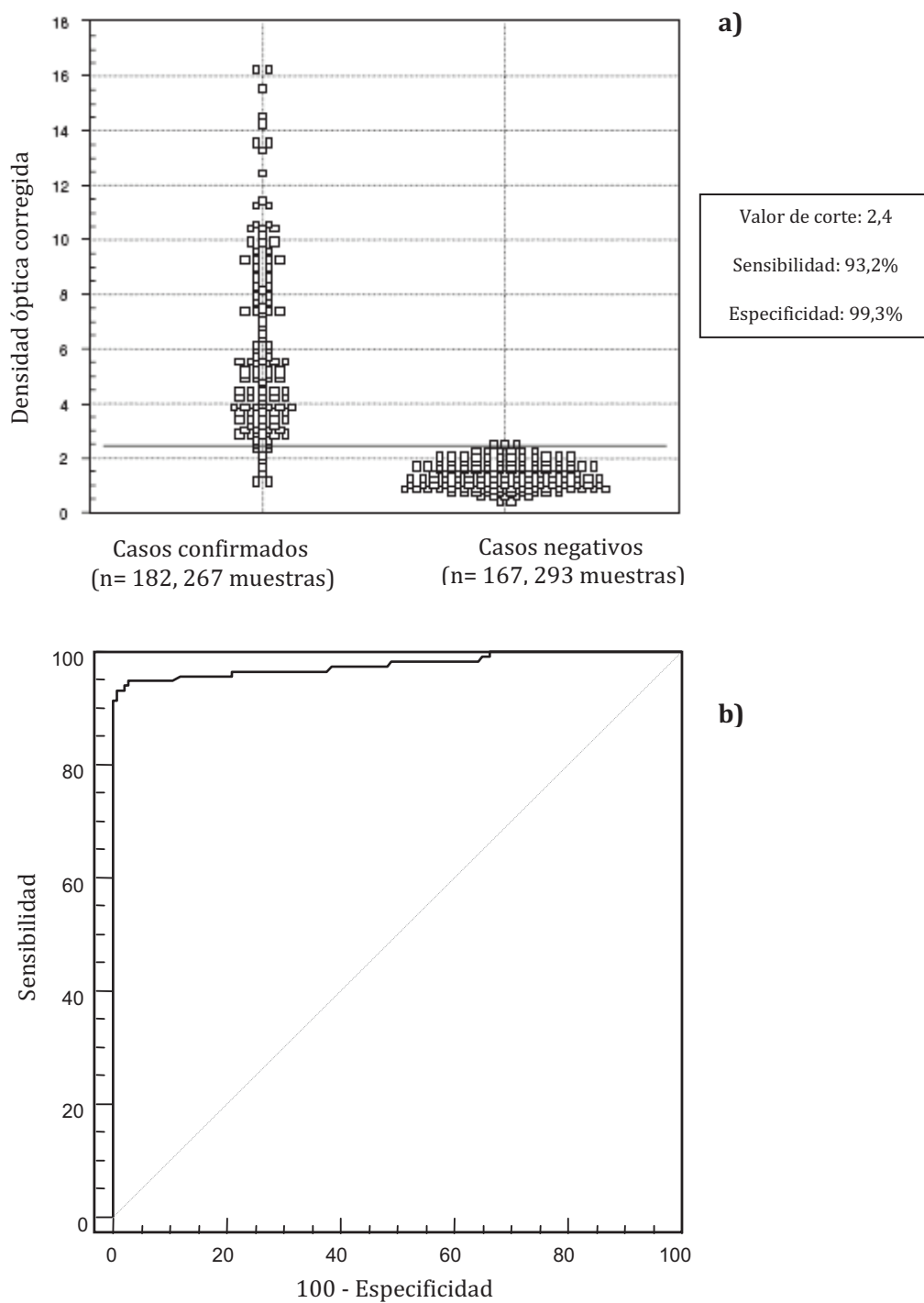


Figura 9. (a) Diagrama de puntos (b) Curva ROC de los resultados del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis según el criterio de la definición de casos en la etapa 2 de la enfermedad en Argentina (1999-2005).

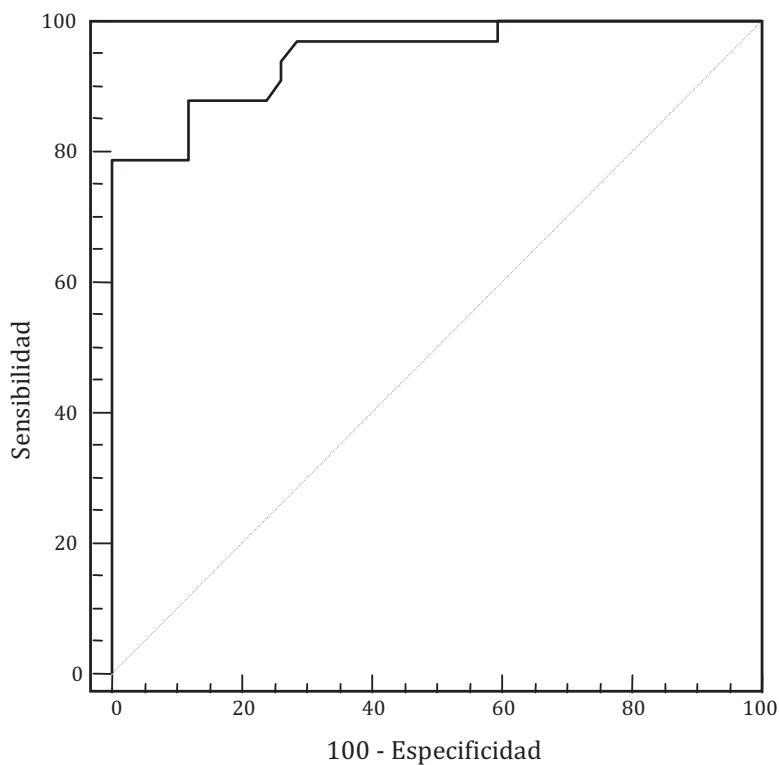
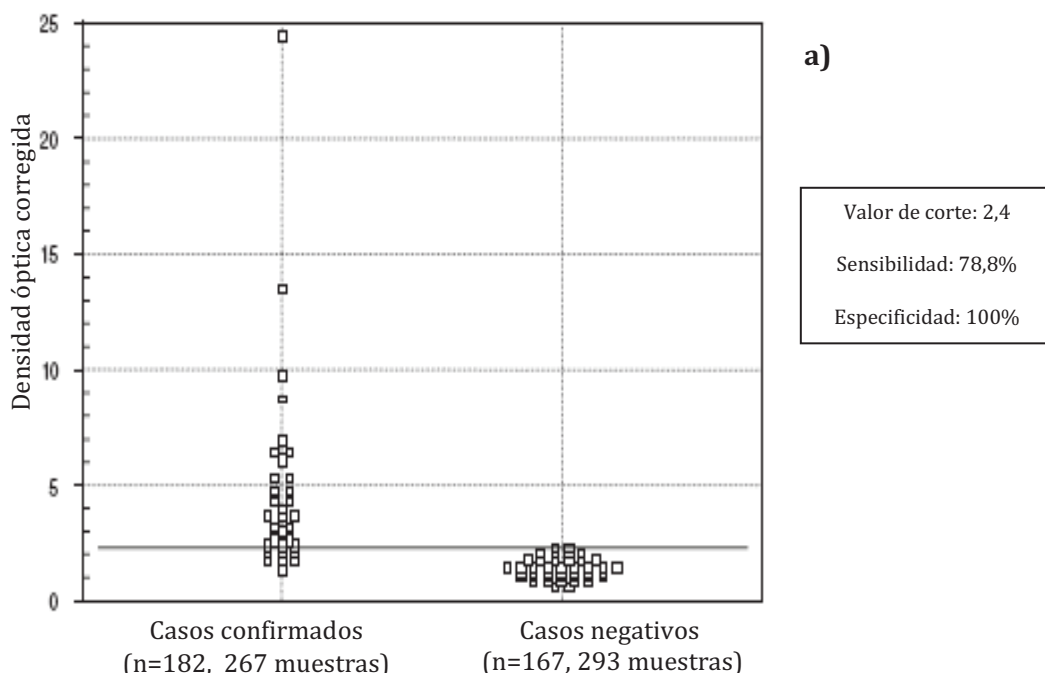


Figura 10. (a) Diagrama de puntos y (b) Curva ROC de los resultados del ELISA IgG para el diagnóstico de leptospirosis según el criterio de la definición de casos en la etapa 3 de la enfermedad, Argentina (1999-2005).

Dentro de la población estudiada se encontraron 16 casos de otras enfermedades que requieren un diagnóstico diferencial de leptospirosis: infección por hantavirus (n = 5), hepatitis A (n =5), dengue (n = 3), sepsis por *Staphylococcus* spp (n = 2), sepsis por *Enterobacter* spp (n = 1) y malaria (n = 1). Las 16 muestras analizadas fueron negativas en el ELISA.

3. DISCUSIÓN

El diagnóstico de leptospirosis es muy complejo, los métodos tradicionales incluyen el cultivo y la detección de anticuerpos por MAT. Ambos procedimientos tienen limitaciones. El cultivo es lento produce resultados retrospectivos y de baja sensibilidad (Lupido y col., 1991; WHO-ILS, 2003; Ahmad y col., 2005). De forma análoga, la MAT requiere gran experiencia para su realización e interpretación (Faine, 1982). Más aún, es de poca utilidad para guiar el manejo clínico temprano de la enfermedad porque los títulos de anticuerpos detectados por MAT aumentan más tarde que los dosados por otras técnicas (Turner, 1968; Cumberland y col., 1999), y porque requiere mucho tiempo hasta detectar la seroconversión entre muestras de fase aguda y de convalecencia (Effler y col., 2002).

La detección de anticuerpos no-aglutinantes dosados por ELISA ha demostrado ser más sensible que la detección de anticuerpos aglutinantes (Adler y col., 1980; Cumberland y col., 1999; Cumberland y col., 2001; Effler y col., 2002). Los títulos de anticuerpos antileptospiras comienzan a ser detectables en sangre a partir de los 5-10 días luego de la aparición de los síntomas de la enfermedad, y a su vez los anticuerpos tipo IgM generalmente aparecen antes que los de tipo IgG (WHO-ILS, 2003). Debido a ello, sería esperable que en la primera etapa la sensibilidad del ELISA IgG evaluado en este estudio fuera baja. Sin embargo, a pesar de que en la primera etapa hubo muestras de pacientes desde cero días de evolución con media y mediana cercanas a los 6 días, la sensibilidad observada del ELISA (68,1%) fue considerablemente elevada, lo cual coincide con resultados obtenidos para otras pruebas de ELISA realizadas por otros autores (Lupido y col., 1991; Flannery y col., 2001, Mc Bride y col., 2007). No obstante, dado que los días de evolución fueron estimados a partir de datos proporcionados por los pacientes, no puede descartarse la presencia del sesgo de memoria, y que la duración de este período haya sido en realidad mayor a la estimada. Sin embargo se debe seguir

trabajando para obtener pruebas que sean capaces de mejorar aún más la sensibilidad en etapas iniciales, ya sea mediante la detección de anticuerpos o de antígenos de leptospiras que permitan un diagnóstico de la enfermedad en las etapas iniciales donde el tratamiento es más efectivo, mejorando así las posibilidades de curación del paciente.

La especificidad del ELISA (96,3%) durante la primera etapa fue muy elevada, lo cual parecería sugerir que un resultado ELISA positivo aunque la MAT aún resultara negativa en esa etapa, podría ser de gran utilidad diagnóstica hasta tanto pueda ser confirmada por esta última en etapas posteriores de la enfermedad. Esto, sumado a la alta especificidad del ensayo frente a muestras de pacientes con otras patologías de sintomatología similar, avalaría la utilidad de este ensayo en etapas iniciales de la leptospirosis.

Durante la segunda etapa se observó la mayor sensibilidad (93,2%) y una muy buena especificidad (99,3%) del ELISA, mientras que las AUC indicaron que un Caso tuvo una mayor probabilidad de tener un valor alto en el ELISA que un No caso. Todo esto sugiere que durante esta etapa el ELISA podría ser muy útil como complemento de la MAT. Más aún en laboratorios donde no se dispone del equipamiento y destreza necesaria para la realización de la MAT, el resultado del ELISA permitiría adelantar el diagnóstico presuntivo hasta tanto pueda ser derivada la muestra a un laboratorio de referencia para ser confirmado por MAT. Este hecho constituye una gran ventaja de este ELISA en relación a otra prueba de tamiz (género específica) que se emplea en Argentina, el TR, ya que este evidencia falsos resultados negativos (Sulzer y col., 1975; Wanyangu y col., 1987; Levett, 2001).

En este estudio las muestras incluidas en la tercer etapa correspondieron a pacientes desde 25 hasta de 494 días de evolución, $x_{\text{medio}} = 72,6$ y $me = 37,0$. La sensibilidad hallada en la tercera etapa (78,5%) se redujo en relación a la segunda. Este hecho podría deberse a un menor nivel de anticuerpos género específicos dosados por el ELISA que podrían haber comenzado a descender a partir de los 25 días de evolución. El diagnóstico presuntivo basado en una única muestra con títulos inicialmente elevados de la MAT es posible, pero el valor umbral o sensibilidad diagnóstica dependerá de la prevalencia de leptospirosis en la

población y la interpretación es aún más complicada debido a la persistencia de anticuerpos aglutinantes, en algunos casos por incluso muchos años, especialmente en zonas de alta endemicidad como algunas provincias de Argentina, donde una elevada proporción de la población puede presentar anticuerpos debidos a infecciones pasadas (Lupido y col., 1991; Cumberland y col., 2001). El descenso de sensibilidad observado en este ELISA en muestras a partir de los 25 días de evolución indicaría que, a diferencia de la MAT, sería de gran utilidad para diferenciar infecciones agudas de pasadas. Más aún si se considera que la especificidad del ELISA fue máxima (100%) en esta etapa.

Aunque el número de pacientes definidos como Probables no fue muy elevado, los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en todas las etapas no variaron mayormente al incluir los Probables dentro de los Casos, sugiriendo que estos últimos constituían una muestra no sesgada de la población de referencia.

En este estudio se evaluó el desempeño de un ELISA IgG (género específico) en diferentes etapas de la enfermedad. Las estimaciones de la sensibilidad y especificidad promedio para todas las etapas fueron elevadas, lo cual indicaría que podría ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis en todas las etapas, y en particular para adelantar el diagnóstico de la enfermedad aguda. Esta prueba constituye un nuevo medio diagnóstico en la Argentina que, conforme a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2000), puede contribuir a un registro más confiable del número de casos de leptospirosis y a una medida más real del impacto de esta enfermedad en la salud pública.

Con el fin de profundizar la evaluación sobre la reactividad cruzada y especificidad de este ELISA con antígeno extractivo frente a otros patógenos, se decidió ampliar el panel de muestras e incluir pacientes con diagnóstico confirmado de patologías que constituyen los principales diagnósticos diferenciales de leptospirosis en Argentina y evaluarlo nuevamente. Esta nueva evaluación no se hizo solo por etapas sino también en forma global, independientemente de las etapas de la enfermedad, y los resultados hallados se describen en los próximos capítulos.

4. CONCLUSIONES

- *Los resultados obtenidos indican que esta prueba de ELISA podría ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis en todas las etapas, y en particular para adelantar el diagnóstico de la enfermedad aguda.*

CAPITULO III

EVALUACIÓN DE LA AGLUTINACIÓN MACROSCÓPICA CON ANTÍGENO TERMORRESISTENTE (TR)

1. RESUMEN

Objetivo. Evaluar la Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR), como tamiz diagnóstico de leptospirosis humana, en diferentes etapas de la enfermedad y su variabilidad inter- e intra-operador.

Métodos: El diseño fue observacional transversal. La definición de casos se basó en la MAT, recuento de leucocitos y neutrofilia. Se incluyeron 218 casos confirmados, 242 no casos y 123 muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de dengue, hantavirus, FHA y hepatitis A. Cada muestra se clasificó según los días de evolución en tres etapas: primera (<10 días), segunda (10-25 días) y tercera (>25 días). La sensibilidad, especificidad, VPN, VPP e IC95% se calcularon empleando Epidat 3.1. Las concordancias intra e inter-operador se midieron mediante el coeficiente Kappa (K).

Resultados. La sensibilidad hallada fue: 71,1%, 93,4% y 95,6% para etapas 1, 2 y 3, respectivamente. La especificidad varió del 79,0 a 69,2%. La variabilidad intra e inter-operador fue moderada. La sensibilidad y especificidad resultantes de la evaluación global del TR, independientemente de las etapas de la enfermedad, fueron del 83,5% (IC95%: 78,3 - 88,6) y 71,8% (IC 95%: 67,0 - 76,5) respectivamente.

Conclusión. La variabilidad del TR demostrada en este estudio, sumada a la baja sensibilidad en la primera etapa y la baja especificidad global y en todas las etapas de la enfermedad, sugieren que sería indispensable la pronta incorporación de nuevos métodos diagnósticos de tamiz para la detección precoz de casos en nuestro país y en países donde aún se apliquen este tipo de métodos.

2. RESULTADOS

Del total de primeras y segundas muestras de pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al Laboratorio del INER, Argentina, desde enero de 2008 a marzo de 2010, 460 (230 pacientes) tuvieron suficiente información y reunieron los requisitos de definición de casos para ser incluidos en este estudio resultando **218 Casos Confirmados y 242 No casos**.

La edad de los 230 pacientes incluidos en el estudio estuvo comprendida entre 1 y 88 años, con una media de 34 años. El 77% (177) de los pacientes era de sexo masculino y 23% (53) de sexo femenino.

2.1. Evaluación del TR en tres etapas de la evolución de la enfermedad.

En la Tabla 7 se describen los resultados de sensibilidad, especificidad, Índice de Youden e IC95% hallados para el diagnóstico por TR en tres etapas de la enfermedad.

Tabla 7. Evaluación del TR como método de tamiz para el diagnóstico de leptospirosis en tres etapas de la enfermedad, Argentina (2008-2010).

	<i>Nº de muestras</i>		<i>Sensibilidad (IC95%)</i>	<i>Especificidad (IC95%)</i>	<i>VPN (IC95%)</i>	<i>VPP (IC95%)</i>	<i>Índice de Youden (IC 95%)</i>
	Casos confirmados	No casos					
Etapa 1 (<10 días)	104	100	71,1 (62,0-80,3)	79,0 (70,5-87,5)	72,48 (63,6-81,3)	77,9 (69,0-86,8)	0,5 (0,4-0,6)
Etapa 2 (10 a 25 días)	91	103	93,4 (87,8-99,0)	73,8 (64,8-82,8)	92,7 (86,4-98,9)	75,9 (67,5-84,3)	0,7 (0,6-0,8)
Etapa 3 (>25 días)	23	39	95,6 (85,1-100)	69,2 (53,5-85,0)	96,4 (87,8-100,0)	64,7 (47,2-82,2)	0,6 (0,5-0,8)

2.2. Evaluación global del TR

En la evaluación global del TR, independientemente de las etapas de la enfermedad, se incluyeron un total de 583 muestras (218 Casos Confirmados y 242 No casos más las 123 muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de otras patologías). Los resultados de la evaluación global del TR se muestran en la Tabla 8.

Para evaluar la reactividad cruzada y especificidad del TR se incluyeron además un total de *123 muestras* de pacientes con diagnóstico confirmado de las

siguientes patologías que constituyen los principales diagnósticos diferenciales de leptospirosis en Argentina: dengue (n=30); hantavirus (n=28); FHA (n=52, muestras provenientes de 26 pacientes) y hepatitis A (n=13); provistas por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH-ANLIS). De las 133 muestras con diagnóstico confirmado de otras patologías disponibles sólo se incluyeron las 123 descriptas, porque hubo 4 muestras de hantavirus y 6 de hepatitis cuyo resultado fue “no interpretable” al TR.

Tabla 8. Evaluación global del TR como tamiz diagnóstico de leptospirosis, Argentina (2008-2010).

<i>Evaluación Global del TR</i>	<i>Valor % (IC95%)</i>
<i>Sensibilidad</i>	83,5 (78,3 - 88,6)
<i>Especificidad</i>	71,8 (67,0 - 76,5)
Valor predictivo Positivo (VPP)	63,9 (58,1-69,6)
Valor predictivo negativo (VPN)	87,9 (84,1-91,8)
<i>Índice de Youden (J)</i>	0,6 (0,5-0,6)

Resultaron reactivas al TR, solo 1 de las 30 muestras de pacientes con dengue, 9 de las 28 muestras de pacientes con hantavirus, 25 de las 52 muestras de pacientes con FHA, y 9 de las 13 muestras de hepatitis.

2.3. Variabilidad intra-operator (repetibilidad) e inter-operadores (reproducibilidad) del TR.

Los resultados de los valores del coeficiente Kappa e IC 95% para las diferentes lecturas de TR realizados con una repetición de un mismo operador y entre diferentes operadores se pueden observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de Kappa (IC 95%) para las diferentes repeticiones del TR

Operadores	Kappa (IC 95%)
Intra-Operador A (repetibilidad)	0,71 (0,56-0,85)
Inter-Operador (A vs. B) (reproducibilidad)	0,64 (0,49-0,80)
Inter-Operador (A vs. C) (reproducibilidad)	0,51 (0,33-0,68)

3. DISCUSIÓN

En este estudio, la menor sensibilidad del TR (71,1%; IC 95%=62,0 - 80,3) fue la correspondiente a la primera etapa de la enfermedad (<10 días de evolución), que es justamente donde se esperaría que sea elevada para permitir la detección precoz de la mayor cantidad de casos, más aún si este método se emplea como tamiz y sólo se derivan los positivos para su confirmación por MAT. Estos resultados confirman las observaciones previas de falsos negativos hallados en nuestro laboratorio, y son coincidentes con los descriptos por otros autores que le atribuyen una baja sensibilidad a este método (Regalado Segui y col., 1990; Levett, 2001). Sin embargo, se contraponen con la elevada sensibilidad del 97,7% o incluso 99,0% respecto de la MAT hallados previamente en el único estudio de evaluación efectuado en Argentina (Seijo y col., 1993). Una de las posibles razones de esta diferencia podría atribuirse a que todas las muestras provenían de pacientes de un Hospital especializado. En estos casos, con muestras tomadas pasados los 10 días de evolución y la mayoría de los pacientes probablemente cursando la fase sindrómica, es de esperar una mayor sensibilidad. Sin embargo, tanto la sensibilidad de la última etapa (95,6%) como la global (83,5%) hallada en el presente trabajo, independientemente de las etapas de la enfermedad, también fueron inferiores a las obtenidas en ese estudio previo de evaluación.

Más aún, es precisamente debido a la baja sensibilidad del TR que surgen las modificaciones a este método (Levett, 2001). Estas modificaciones consisten en diferentes tratamientos a las células enteras, de una o más de una variedad de *Leptospira*, y además algunos de ellos utilizan otros componentes para facilitar la visualización de la aglutinación como partículas de látex o colorantes. Todos estos métodos serológicos, al igual que el TR, son rápidos y género específicos (Bragger y col., 1976; Wanyangu y col., 1987; Brandao y col., 1998; Smits y col., 2000; Levett, 2001).

La sensibilidad fue ascendiendo en la etapa 2 (93,4%), alcanzando su máximo valor (95,6%) en la tercera etapa donde ya no sería tan necesaria la utilización de un método de detección precoz y donde generalmente la muestra ya resulta positiva a MAT.

La sensibilidad de cada método serológico depende del tiempo

comprendido entre el inicio de los síntomas y la fecha de obtención de la muestra. Aunque el TR no fue evaluado previamente en diferentes etapas de la enfermedad, sí lo hicieron con algunos de los métodos de aglutinación descritos posteriormente, y los resultados de sensibilidad y especificidad hallados también son muy variables entre ellos (Bragger y col., 1976; Wanyangu y col., 1987; Smits y col., 2000). Uno de estos métodos es la aglutinación macroscópica modificada por Galton (Levett, 2001), que mostró buena sensibilidad y especificidad global (99%), aunque la reactividad hallada fue del 57% en muestras de hasta 6 días de evolución y del 99% en muestras de 15 días a 2 meses de evolución (Brandao y col., 1998). Otro método, que incorpora varias modificaciones y utiliza colorantes, describe una muy baja especificidad (55%) y, aunque la sensibilidad global descrita es buena (94%), la reactividad hallada en muestras de hasta 7 días de evolución fue sólo del 45,5% (Bragger y col., 1976). El primer estudio del tercer método (ensayo de aglutinación del látex) describe una sensibilidad y especificidad global promedio del 82,3 y 94,6%, respectivamente (Smits y col., 2000), aunque evaluaciones posteriores de este mismo ensayo le atribuyen similar sensibilidad pero una especificidad inaceptable del 10% (Effler y col., 2002; McBride y col., 2007). Mientras que la sensibilidad observada en este mismo método fue del 54,2% en muestras de hasta 10 días, y del 93,8% en muestras de 10 a 30 días de evolución (Bragger y col., 1976). Todos estos antecedentes implican que la baja sensibilidad del TR hallada en este estudio en la etapa 1 (<10 días de evolución), es comparable a la descrita previamente para otros métodos de aglutinación con células enteras (Bragger y col., 1976; Wanyangu y col., 1987; Smits y col., 2000, Effler y col., 2002).

Una revisión reciente sugiere que los métodos que detectan anticuerpos anti-leptospiras enteras (no solo los de aglutinación), pueden presentar baja sensibilidad durante la fase aguda de la enfermedad y baja especificidad en áreas altamente endémicas (McBride y col., 2007). Todos estos resultados indicarían que, en caso de trabajar en el desarrollo de reactivos para aumentar la sensibilidad y especificidad del TR mediante alguna de las modificaciones descritas (por ejemplo partículas de látex), no deberían emplearse células enteras (sin lisar) como antígeno.

La especificidad (del 69,2% al 79,0%) hallada en este estudio en las diferentes etapas de la enfermedad fue baja. Estos resultados coinciden también con las observaciones previas documentadas en nuestro laboratorio y datos publicados para otras aglutinaciones (Wanyangu y col., 1987; Effler y col., 2002); pero se contradicen con la elevada especificidad global (99,4% o incluso 100%) respecto de la MAT hallados en único estudio previo (Seijo y col., 1993). Más aún, la presencia de falsos positivos fue corroborada en este trabajo con muestras de no casos de leptospirosis o pacientes con confirmación de laboratorio de los principales diagnósticos diferenciales de esta enfermedad en nuestro país en la actualidad. La especificidad global del TR incluyendo estas muestras fue del 71,8%. La reactividad cruzada en casos de dengue fue sólo del 3,3%, en hantavirosis del 32,1%, y 48,1% para FHA, siendo la máxima para hepatitis A (69,2%). Estudios posteriores deberán investigar las causas de estas reacciones cruzadas.

La existencia de resultados no interpretables que hicieron que no puedan ser incluidas algunas muestras en la evaluación, es otra limitante de este método ya que requiere de muestras límpidas y perfectamente conservadas para poder observar la aglutinación o ausencia de ella y llegar a un resultado confiable.

El Índice de Youden (J) es un indicador simple de la combinación de la sensibilidad y la especificidad de una prueba y tiene la ventaja de que no se ve afectado por la prevalencia de la enfermedad en la población. Coincidentemente con lo descrito previamente, el peor desempeño del TR medido por este índice (J) fue el correspondiente al de la Etapa 1 (J=0,5). La Etapa 1 sería donde este método presentaría las mayores limitaciones, aunque el desempeño global del TR, independientemente de las etapas (J=0,6), no sería mucho mejor.

La variabilidad tanto intra operador (repetibilidad) como inter operador (reproducibilidad) fue moderada. Lo cual confirma que la interpretación subjetiva podría dificultar la obtención de resultados totalmente comparables y reproducibles entre operadores y por lo tanto entre laboratorios. Esto implica que es necesario reforzar los controles de calidad periódicos y evaluar la concordancia de las lecturas entre los laboratorios que aún emplean este método. La estrategia sugerida para vigilar la calidad del TR es solicitar periódicamente a cada laboratorio descentralizado la derivación del 10% de las muestras no reactivas

para su reprocesamiento y control. Esta estrategia es una práctica habitual en los laboratorios de la RNLL en Argentina. Por otra parte las muestras reactivas, como son derivadas para su confirmación, se controlan en su totalidad cuando se procesan por otros métodos.

El VPN global del ensayo (87,9%) y sobre todo el de la etapa 1 (72,48%) indica que un paciente con leptospirosis, más aún con pocos días de evolución, tiene una alta probabilidad de resultar no reactivo al TR a pesar de estar enfermo. Por esa razón sería necesario implementar además otros métodos de tamiz en los laboratorios descentralizados para permitir la detección precoz de esos casos que serían falsos negativos del TR y por lo tanto no serían tratados oportunamente.

Por otra parte, los bajos VPP: 63,9% global y 77,9%, 75,9%, 64,7% en las etapas 1, 2 y 3 respectivamente indican, además, una probabilidad de entre 22 y 36% de falsos positivos atribuibles a otras patologías. Esto implica que los laboratorios deben conocer esta situación para poder colaborar en la interpretación de los resultados. Esta situación se resolvería, en parte, con la derivación de las muestras TR reactivas al laboratorio de referencia para su confirmación por un método de mayor especificidad como la MAT.

Debido a la necesidad de contar con muestras frescas para una correcta visualización, lectura e interpretación del TR, este estudio debió hacerse con un panel de menor tamaño y diferente del empleado para la evaluación de los otros métodos de ELISA. Por esa razón para este estudio se empleó un panel con muestras de poca antigüedad, descartando aquellas cuyos resultados fueron no interpretables y sólo se incluyeron muestras de los dos años previos al estudio, mientras que el panel empleado para la evaluación de los ELISAs fue más amplio y más representativo ya que incluyó las muestras existentes en el INER desde el año 1999. Por esta razón los resultados de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN hallados en este capítulo para el TR no son totalmente comparables con los resultados de estos mismos parámetros obtenidos en el próximo capítulo para las evaluaciones de todos los métodos de ELISA.

Sólo en la comparación de todos los métodos (directos e indirectos, incluidos el TR y los ELISAs) se procesaron las mismas muestras por todos ellos. Pero este estudio fue solo una comparación y no evaluación, porque solo pudo ser

realizado con una muestra muy reducida de sueros de pacientes de la etapa 1 de la enfermedad, por lo que no se calculó sensibilidad ni especificidad.

CONCLUSIÓN

- *La moderada variabilidad del TR demostrada en este estudio, tanto intra-operador como inter-operador, sumada a la baja sensibilidad en la primera etapa y la baja especificidad global y en todas las etapas de la enfermedad indicarían que no es aconsejable la utilización de este método como única prueba tamiz para el diagnóstico de leptospirosis.*
- *Estos resultados sugieren que es indispensable la pronta incorporación de nuevos métodos diagnósticos de tamiz para la detección precoz de casos en nuestro país y en aquellos donde aún se aplique éste método.*

CAPITULO IV

EVALUACIÓN DE CUATRO ELISAs IgG DESARROLLADOS

1. RESUMEN

Objetivo. Evaluar y comparar cuatro ELISAs desarrollados con antígenos (extractivo, sintéticos y recombinante) en forma global y en diferentes etapas de la enfermedad.

Materiales y Métodos. Se analizaron muestras de suero humano de un panel de casos confirmados y no casos, provenientes de pacientes con sospecha de leptospirosis derivadas al laboratorio del INER, Santa Fe, Argentina. Cada muestra se clasificó según el tiempo de evolución de la enfermedad en tres etapas: primera (< 10 días), segunda (10–25 días) y tercera (> 25 días). En los ELISAs se empleó el antígeno extractivo sonicado que se obtuvo de cultivos de leptospiras patógenas, los péptidos (P1 y P2) que fueron obtenidos mediante síntesis química y el recombinante que contiene ambos péptidos. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. El valor de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA se determinaron utilizando como patrón la definición de casos mediante el análisis del AUC y utilizando el programa Medcalc®. Se usó el índice Kappa para medir la concordancia entre los diferentes ensayos.

Resultados. Se incluyeron en el estudio 229 muestras de Casos confirmados, 180 de No-casos y 49 Controles y 133 muestras de pacientes con diagnóstico confirmado de otras patologías. La sensibilidad de los cuatro ELISAs desarrollados en la etapa 1, fue baja, variando desde 51,4 a 66,1%. En la etapa 2, los cuatro antígenos mostraron un buen desempeño, pero el extractivo evidenció una significativa mayor sensibilidad 95.6% (IC95%, 89.1 - 98.8), especificidad 95.7% (IC95%, 89.2-98.8), VPP 95,7 (IC95%, 89,2 - 98,8), VPN 97,7 (IC95%, 91,9 - 99,7) y AUC 0,974 (IC95%, 0,938 - 0,992). Los resultados de sensibilidad (de 72,8 a 82,4%) y especificidad (de 72,4 a 86,2%) con antígenos sintéticos y recombinante fueron superiores a los hallados en el período agudo. En la etapa 3 los resultados hallados para todos los ELISAs fueron comparables a los de la Etapa 2, siendo el que empleó antígeno extractivo el de mayor AUC. Cuando se analizaron todas las etapas en forma global, los ELISAs con antígeno extractivo y P1 fueron los más sensibles (77,7%) y el REC-ELISA fue el más específico (89,5%) pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En este análisis conjunto, independientemente de las etapas, la relativa mayor especificidad de los ELISAs con antígenos sintéticos y recombinante pudo haber compensado la mayor sensibilidad del extractivo y por ello no se observaron diferencias significativas entre los cuatro ELISAs con los cuatro antígenos diferentes. La concordancia entre lecturas del ELISA con el antígeno extractivo fue excelente, mientras que moderada en los otros tres antígenos.

2. RESULTADOS

2.1. Evaluación de cuatro ELISAs desarrollados en tres etapas de la enfermedad.

En este primer análisis se empleó un panel de 409 muestras de 229 casos confirmados y 180 no casos. Se analizaron 180 muestras de suero humano de la Etapa 1 (109 Casos/71 No casos), 178 de la Etapa 2 (91 Casos confirmados/87 No casos) y 51 de la Etapa 3 (29 Casos confirmados/ 22 No casos).

Los resultados de sensibilidad, especificidad, puntos de corte, valores predictivos y AUCs de los cuatro ELISAs en cada una de las etapas de la enfermedad se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Evaluación de los ELISAs con antígenos Extractivos, P1, P2 y Recombinante en cada una de las etapas de la enfermedad ($n_{\text{total}} = 409$).

<i>Antígenos del ELISA</i>	<i>Punto de corte</i>	<i>Sensibilidad % (IC 95%)</i>	<i>Especificidad % (IC 95%)</i>	<i>VPN % (IC 95%)</i>	<i>VPP % (IC 95%)</i>	<i>AUC (IC 95%)</i>
ETAPA 1 (<10 días) n=180 (109 Casos/ 71 No casos)						
Extractivo	>2,3	62,4 (52,6 - 71,5)	93,0 (84,3 - 97,7)	71,2	89,9	0,777 (0,709 - 0,836)
P1	>1,3	62,4 (52,6 - 71,5)	77,5 (66,0 - 86,5)	67,3	73,5	0,744 (0,674 - 0,806)
P2	>1,8	66,1 (56,4 - 74,9)	87,3 (77,3 - 94,0)	83,9 (73,2-91,6)	72,0 (62,6-80,2)	0,780 (0,713 - 0,838)
Recombinante	>2,1	51,4 (41,6 - 61,1)	94,4 (86,2 - 98,4)	66,4	90,3	0,730 (0,659 - 0,793)
ETAPA 2 (10 a 25 días) n=178 (91 Casos / 87 No casos)						
Extractivo	>2,3	95,6 (89,1 - 98,8)	97,7 (91,9 - 99,7)	97,7 (91,9 - 9,7)	95,7 (89,2 - 98,8)	0,974 (0,938 - 0,992)
P1	>1,2	82,4 (73,0 - 89,6)	72,4 (61,8-81,5)	74,9 (65,1 -83,2)	80,5 (70,1 -88,5)	0,841 (0,779 - 0,892)
P2	>1,7	75,8 (65,7 - 84,2)	78,2 (68,0-86,3)	77,6 (67,4 -85,9)	76,4 (66,3 - 84,7)	0,787 (0,720-0,845)
Recombinante	>2,3	72,8 (62,6- 81,6)	86,2 (77,1-92,7)	84,1 (74,4 - 91,4)	76,0 (66,5 -84,0)	0,828 (0,765-0,881)
ETAPA 3 (>25 días) n: 51 (29 Casos / 22 No casos)						
Extractivo	>2,2	82,8 (54,2 - 94,2)	100 (84,6 -100,0)	100,0 (83,9-100,0)	85,3 (67,2- 95,6)	0,943 (0,840-0,988)
P1	>1,6	79,3 (60,3- 92,0)	86,4 (65,1 - 97,1)	85,3 (64,4-96,5)	80,7 (61,0- 93,2)	0,864 (0,739-0,944)
P2	>1,8	72,4 (52,8 -87,3)	77,3 (54,6 - 92,2)	76,1 (54,5-91,0)	73,7 (52,9 - 88,9)	0,818 (0,685- 0,912)
Recombinante	>1,6	86,2 (68,3 -96,1)	77,3 (54,6 - 92,2)	79,1 (59,3-92,3)	84,9 (63,9 - 96,2)	0,886 (0,765-0,958)

En la Etapa 1 no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las AUC para cada uno de los ELISA con los cuatro antígenos evaluados (Figura 11).

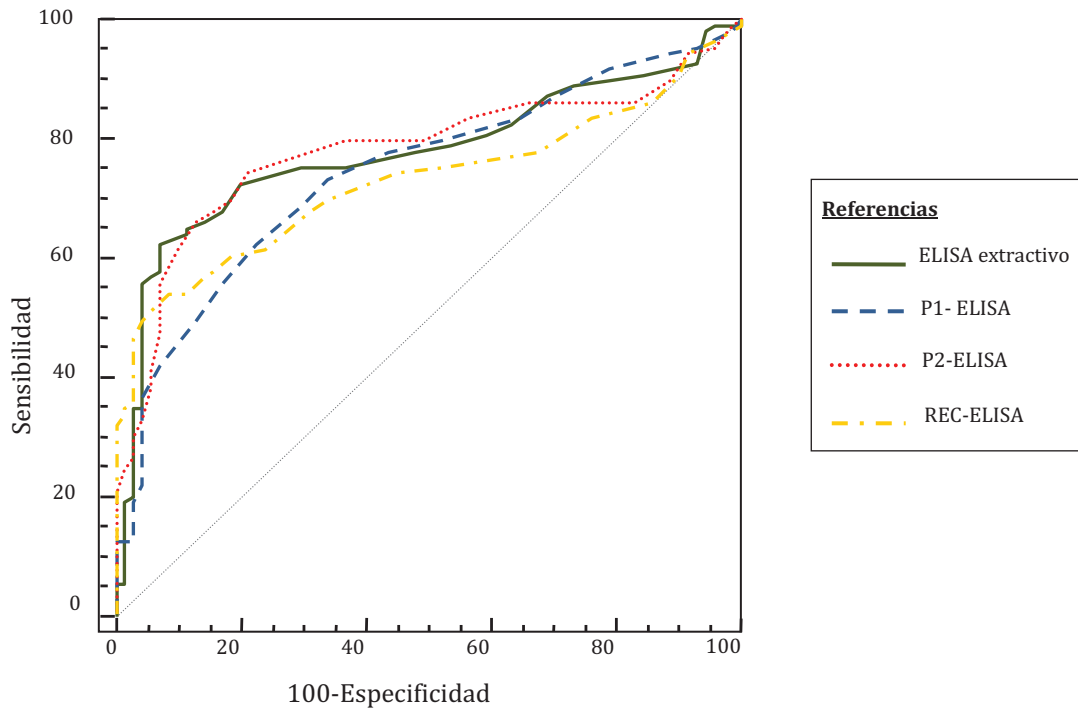


Figura 11. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante en la **etapa 1** de la enfermedad.

En la segunda etapa, el ELISA con antígeno extractivo mostró una significativa mayor AUC ($P < 0.001$) que los otros 3 (Figura 12).

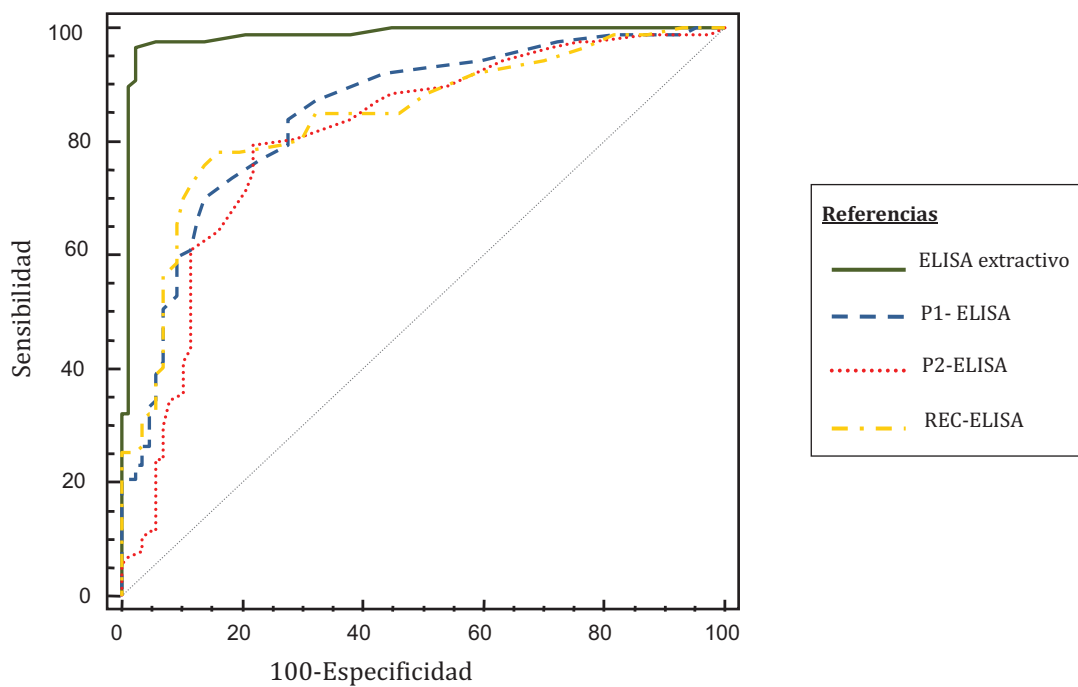


Figura 12. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante en la **etapa 2** de la enfermedad.

En la etapa 3, al igual que en la etapa 1, tampoco se hallaron diferencias significativas entre los cuatro ELISAs con los cuatro antígenos ($P>0,05$) (Figura 13).

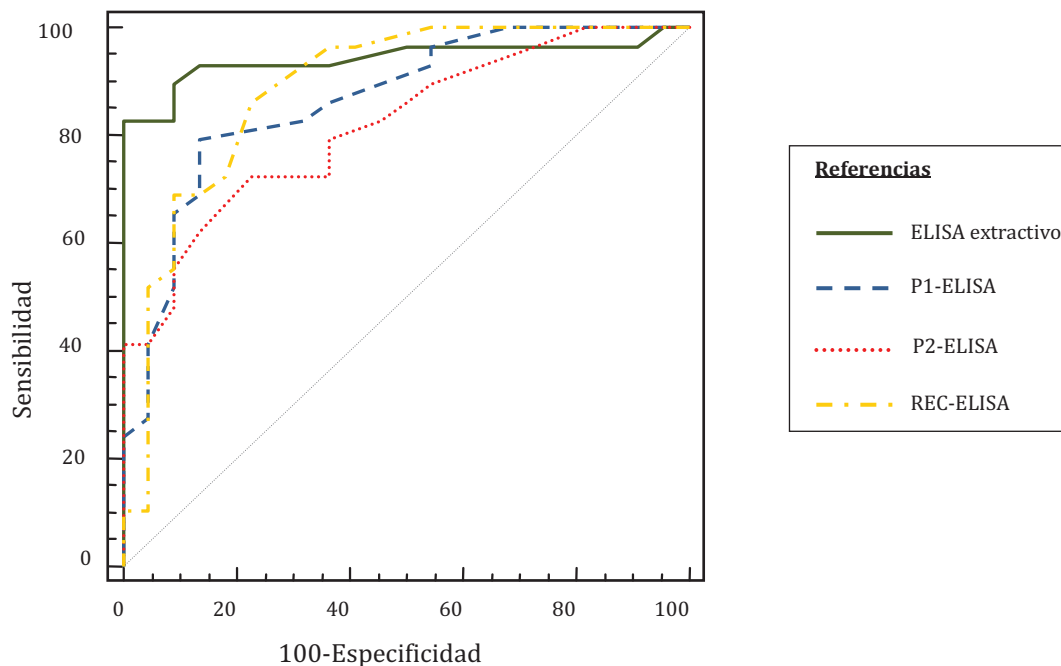


Figura 13. Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante en **etapa 3** de la enfermedad.

2.2. Evaluación global de cuatro ELISAs desarrollados.

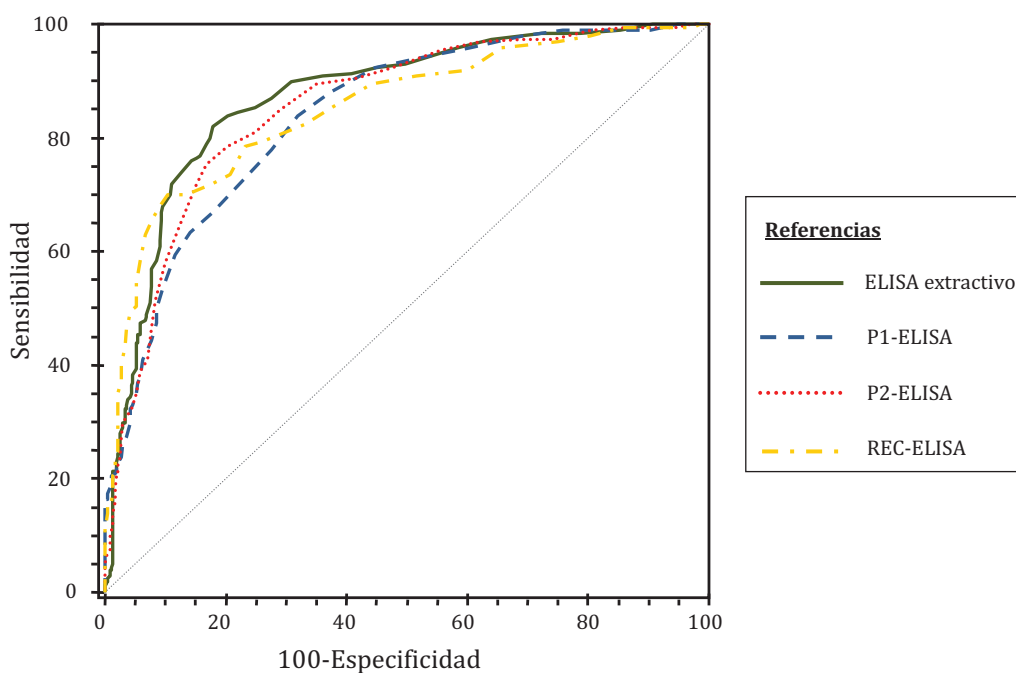
En la evaluación en forma global, sin dividirlos según las etapas de la enfermedad, se estudiaron un total de 591 muestras correspondientes a 229 casos confirmados y 362 no casos. Los no casos incluyeron los mismos 180 no casos del primer análisis más 49 controles (niños < 4 años) y 133 muestras de casos con diagnóstico confirmado de: dengue ($n=30$), FHA ($n= 52$); hantavirus ($n=32$) y hepatitis A ($n=19$).

Los resultados de puntos de corte, sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y AUC se describen en la Tabla 11.

Tabla 11. Evaluación global de cuatro ELISAs desarrollados con antígenos Extractivos, P1, P2 y Recombinante (n= 591).

Antígenos del ELISA	Puntos de corte	Sensibilidad % (IC 95%)	Especificidad % (IC 95%)	VPN % (IC 95%)	VPP% (IC 95%)	AUC (IC 95%)
Extractivo	>2,3	77,7 (71,8 - 82,9)	82,0 (77,7 - 85,9)	78,7 (73,6 - 83,1)	81,2 (76,2 - 85,6)	0,833 (0,801 - 0,862)
P1	>1,2	77,7 (71,8 - 82,9)	68,0 (62,9 - 72,7)	75,3 (69,7 - 80,4)	70,8 (65,5 - 75,7)	0,796 (0,761 - 0,828)
P2	>1,8	69,0 (62,6 - 74,9)	83,15 (78,9 - 86,9)	72,8 (67,8 - 77,5)	80,4 (74,9 - 85,1)	0,802 (0,768 - 0,834)
Recombinante	>2,0	64,35 (57,8 - 70,5)	89,5 (85,9 - 92,5)	71,5 (66,6 - 76,1)	86,0 (80,7 - 90,3)	0,809 (0,775 - 0,840)

Cuando se analizaron todas las etapas en forma conjunta o global no existieron diferencias en la AUC ($P>0,05$) entre los 4 ELISAs con diferentes antígenos (Figura 14).

**Figura 14.** Comparación de las Curvas ROC de los ELISAs con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante, independientemente de las etapas de la enfermedad (n= 591)

2.3. Variabilidad intra-operador (repetibilidad) de cada ELISA.

Para este análisis se compararon, mediante el coeficiente Kappa, los duplicados de los resultados de 550 muestras de suero, procesadas por cada uno de los cuatro ELISAs, por un mismo operador. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concordancia intra-operador (repetibilidad) de cada ELISA con antígenos Extractivo, P1, P2 y Recombinante (n=550).

<i>ELISA con antígeno</i>	<i>Valor de Kappa</i>
Extractivo	0,8
P1	0,4
P2	0,4
Recombinante	0,4

3. DISCUSIÓN

El diagnóstico temprano es imprescindible para comenzar inmediatamente una terapia efectiva y evitar formas más graves de la enfermedad (Farr, 1995; Perani y col., 1998; Kobayashi, 2005; McBride y col., 2005). Las técnicas diagnósticas de referencia para leptospirosis, MAT y el aislamiento, son complejas, anticuadas y no permiten la detección temprana de los casos (Faine y col., 1999; Levett, 2001, WHO-ILS, 2003). El desempeño de los cuatro ELISAs en la primera etapa (<10 días de evolución) fue muy similar independientemente de los diferentes antígenos empleados (AUC de 0,773 a 0,780) y la sensibilidad de todos ellos fue relativamente baja, variando desde 51,4 a 66,1%. Sin embargo, la sensibilidad hallada en este trabajo en esta primera etapa coincide con la descrita para otros ELISAs IgG, y fue incluso superior a la obtenida para la mayoría de los ELISAs IgM en etapas agudas de la enfermedad (Yersin y col., 1999; Cumberland y col., 1999; Sekhar y col., 2000; Smits y col., 2001ab; Effler y col., 2002; Bajani y col., 2003; Seghal y col., 2003; Sehgal y col., 2003; Mc Bride y col., 2005; Blanckell y col., 2006; Aviat y col., 2010). Como estos métodos emplean diferentes tipos de antígenos y detectan diferentes anticuerpos (IgM y/o IgG), la falta de sensibilidad para la detección precoz de los casos sería más bien debida a las limitaciones propias de la serología y el tiempo requerido para la generación de los anticuerpos específicos, que al tipo de antígenos empleados en el ELISA o al tipo de anticuerpos que detectan (IgM o IgG).

Los resultados de sensibilidad hallados en este estudio para el ELISA IgG que emplea antígenos recombinantes o sintéticos de la LipL32 (P1, P2 y REC) en la etapa 1 (62,4%, 66,1 y 51,4 % respectivamente) fueron similares o superiores a los

obtenidos por otros autores: 56% (Flannery y col. 2001), 30,2% (Natarajaseenivasan y col., 2004), 37% (Guerreiro y col., 2001) e incluso sensibilidad nula hallada por Neves y col. (2007).

La baja sensibilidad hallada en esta evaluación para todos ELISAs durante la etapa 1 de la enfermedad evidenciaría que ninguno de ellos sería capaz de resolver individual y completamente el diagnóstico temprano de la leptospirosis. Por ello se decidió realizar un estudio sólo en la etapa 1 de la enfermedad y comparar todos los métodos indirectos o serológicos empleados en este trabajo de tesis (TR, MAT y los 4 ELISAs desarrollados) con métodos directos (PCR y RT-PCR). Este último estudio, cuyos resultados se describen en el próximo capítulo, se realizó con el propósito de comparar el número y el momento de la detección de los casos de leptospirosis por cada uno de estos métodos evaluados en este trabajo de tesis e incluir también en la comparación métodos como la RT-PCR poco evaluados aún a nivel mundial.

En la etapa 2, los cuatro antígenos mostraron mejor desempeño que en la etapa 1, pero el extractivo evidenció la mayor sensibilidad 95.6% (IC95%, 89.1-98.8), especificidad 95.7% (IC95%, 89.2 - 98.8), VPP 95,7% (IC95%, 89,2 - 98,8), VPN 97,7% (IC95%, 91,9 - 99,7). En esta segunda etapa, el antígeno extractivo mostró la mejor eficacia diagnóstica evidenciada por su estadísticamente significativa mayor AUC 0,974 (IC95%, 0,938 - 0,992). La mejor eficacia obtenida con antígeno extractivo, se contrapone con la predicción de que los ELISAs desarrollados con proteínas recombinantes, por utilizar antígenos inmunodominantes que no poseen los motivos no específicos de las preparaciones con extractos crudos celulares, ofrecen mayor sensibilidad y especificidad que los ELISAs que emplean antígenos extractivos (Neves y col., 2007; Lin y col., 2008a,b; Qiu y col., 2008). Este resultado indica que en esta etapa el ELISA con el antígeno extractivo sería la mejor opción.

En la etapa 2, los resultados de sensibilidad (de 72,8 a 82,4%) y especificidad (de 72,4 a 86,2%) con antígenos sintéticos y recombinante (que derivan de la LipL32) fueron superiores a los hallados en el período agudo. Estos hallazgos coinciden también con descripciones previas para muestras de período convalecencia, donde las sensibilidades halladas también para ELISAs de tipo IgG

fueron de 65,1% (Natarajaseenivasan y col., 2004), 84% (Guerreiro y col., 2001) y 94% (Flannery y col., 2001).

En la etapa 3, los resultados hallados para todos los ELISAs fueron comparables y también superiores a los de la etapa 1, siendo el que empleó antígeno extractivo el de mayor AUC, aunque ésta diferencia no fue estadísticamente significativa. Además la sensibilidad hallada para este ELISA descendió luego de la etapa 2. Este hecho podría deberse al descenso de anticuerpos género específicos dosados por el ELISA con antígeno extractivo a partir de los 25 días de evolución. Este descenso coincide con lo obtenido en el Capítulo II, lo que sugiere que este ELISA a diferencia de la MAT, podría diferenciar infecciones agudas o recientes de infecciones pasadas.

Cuando se analizaron todas las etapas en forma global, los ELISAs con antígeno extractivo y P1 fueron los más sensibles (77,7%), mientras que el ELISA que utilizó el recombinante fue el más específico (89,5%). En este análisis conjunto, independientemente de las etapas, la relativa mayor especificidad de los ELISAs con antígenos sintéticos y recombinante pudo haber compensado la mayor sensibilidad del extractivo y por ello no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro ELISAs con los cuatro antígenos diferentes.

La evaluación global, incluyendo un mayor número de muestras con diagnóstico confirmado de otras patologías, se hizo para poder evaluar con profundidad la especificidad de los diferentes ELISAs, y en particular del ELISA con antígeno extractivo previamente evaluado. La elevada especificidad hallada para este último en las etapas 1, 2 y 3 (93,7%, 97,0% y 100% respectivamente), se redujo luego de esta evaluación global a un 82,0%. Este hecho no fue tan notable con los ELISAs que utilizaron antígenos provenientes de LipL32.

La mayor especificidad obtenida para el antígeno recombinante (89,5%), aunque era esperable para antígenos recombinantes y sintéticos porque utilizan una superficie de captura formada solamente por una alta concentración de moléculas que contienen epitopes altamente conservados de leptospiras patógenas (Tijssen, 1985; Neves y col., 2007; Vivian y col., 2009), no fue significativamente superior a la del extractivo (82,0%).

La sensibilidad y especificidad global y en las diferentes etapas de la enfermedad halladas en este estudio sugerirían que la LipL32, a pesar de ser la lipoproteína más abundante, altamente conservada en especies patógenas de leptospiras y ser la que reacciona en el mayor número de individuos (Haake y col, 2000; Gerreiro y col., 2001, Cullen y col, 2005) aparentemente no sería suficiente como para ser empleada como único antígeno en un inmunoensayo.

La concordancia entre lecturas del ELISA con el antígeno extractivo fue excelente, mientras que moderada en los otros tres antígenos, lo cual podría indicar que el ELISA con antígeno extractivo es más robusto evidenciando mayor separación entre resultados positivos y negativos y la existencia de pocos resultados cercanos al valor de corte.

Las evaluaciones de performance de diferentes ELISAs en diferentes situaciones y grupos de pacientes pueden conducir a resultados diferentes. Por esa razón se decidió incorporar como nuevo objetivo de este trabajo de tesis realizar un meta-análisis sobre los métodos de ELISA comerciales o artesanales disponibles en la bibliografía internacional con el fin conocer las principales fuentes de variabilidad entre los diferentes ELISAs evaluados y como afectan su eficacia y exactitud. Esto permitiría comparar los resultados del meta-análisis con los obtenidos en este trabajo y concluir de forma más general.

4. CONCLUSIONES

- *La baja sensibilidad hallada en etapa 1 para los cuatro ELISAs desarrollados evidenciaría que, aunque estos métodos pueden ser muy útiles y pueden colaborar con el diagnóstico, ninguno de ellos sería capaz de resolver individual y completamente el diagnóstico temprano o precoz de la leptospirosis.*

- *El ELISA con antígeno extractivo evidenció: en la etapa 2 la mayor sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y significativa mayor AUC, en la evaluación global independientemente de las etapas evidenció mayor sensibilidad y AUC que los otros, aunque estas diferencias no fueron significativas y evidenció mayor repetibilidad entre sus resultados, lo cual indica que en el caso de seleccionar un solo antígeno sería éste.*

CAPITULO V

COMPARACIÓN DE OCHO MÉTODOS DIAGNÓSTICOS (2
DIRECTOS Y 6 INDIRECTOS), PARA EL DIAGNÓSTICO
PRECOZ DE LEPTOSPIROSIS HUMANA.

1. RESUMEN

Objetivo. Comparar la utilidad de 8 métodos diagnósticos (2 directos y 6 indirectos) de la Etapa 1 (< de 10 días de evolución) para diagnóstico precoz de los casos de leptospirosis humana.

Metodología. Los métodos diagnósticos directos comparados fueron: Real Time PCR (RT-PCR) y PCR Convencional. Los métodos indirectos o serológicos fueron: cuatro ensayos ELISA con diferentes antígenos (extractivo, péptidos sintéticos P1 y P2 y un recombinante REC), TR y MAT. La definición de casos se basó en la MAT, recuento de leucocitos y neutrofilia e incluyó los resultados de aislamiento, o RT-PCR.

Resultados. Se incluyeron 24 muestras de casos confirmados de la Etapa 1. Durante todo el período, ningún método fue capaz de detectar todos los casos. La RT-PCR fue el método que permitió la mayor detección de casos (16 casos) hasta el sexto día y en segundo lugar el ELISA extractivo (11 casos) a partir del cuarto día de evolución. La PCR convencional solo detectó casos hasta el cuarto día, mientras que RT-PCR lo hizo hasta el sexto, debido a la mayor sensibilidad de esta última. Los únicos métodos serológicos que fueron capaces de reaccionar antes del cuarto día de evolución fueron los ELISAs con antígenos sintéticos (P1, P2 y REC), con diferentes patrones de positividad permitieron la detección de 2 casos, siendo aparentemente muy precoces. Dos o más ELISAs sumados permitieron la detección de 13 casos, siendo el que emplea antígeno extractivo el que individualmente mayor número de casos (n=11) detectó. El TR fue reactivo en 9 casos a partir del cuarto día.

Conclusiones. La RT-PCR sería el mejor método para la detección de casos de hasta 6 día de evolución. En segundo lugar se ubicaría el ELISA con antígeno extractivo que sería el método serológico que permitiría la detección del mayor número de casos desde el cuarto día de evolución hasta el final de la primera etapa.

2. RESULTADOS

Los métodos diagnósticos comparados fueron 8 (ocho): dos métodos directos de detección de leptospiras o su material genético: RT-PCR y PCR convencional, y 6 (seis) métodos indirectos, serológicos o de detección de anticuerpos. Los métodos serológicos evaluados fueron: TR, MAT y cuatro ELISAs con diferentes antígenos (ELISA extractivo, P1-ELISA, P2-ELISA y REC-ELISA).

Se incluyeron 24 muestras de la Etapa 1 (<10 días de evolución) de casos confirmados. Los casos confirmados correspondieron a 11 casos fatales y 13 graves provenientes de tres regiones del país que presentaron brotes de leptospirosis durante el período de lluvias (enero a mayo de 2010), todos ellos requirieron internación y presentaron clínica y epidemiología compatible con leptospirosis grave. Los casos presentaron shock, hemorragia pulmonar o requirieron hemodiálisis, internación en Unidad de Terapia Intensiva (UTI) o Asistencia respiratoria mecánica (ARM).

En la Figura 15, se muestran los resultados hallados en los 24 casos por cada método diagnóstico estudiado en toda la etapa 1.

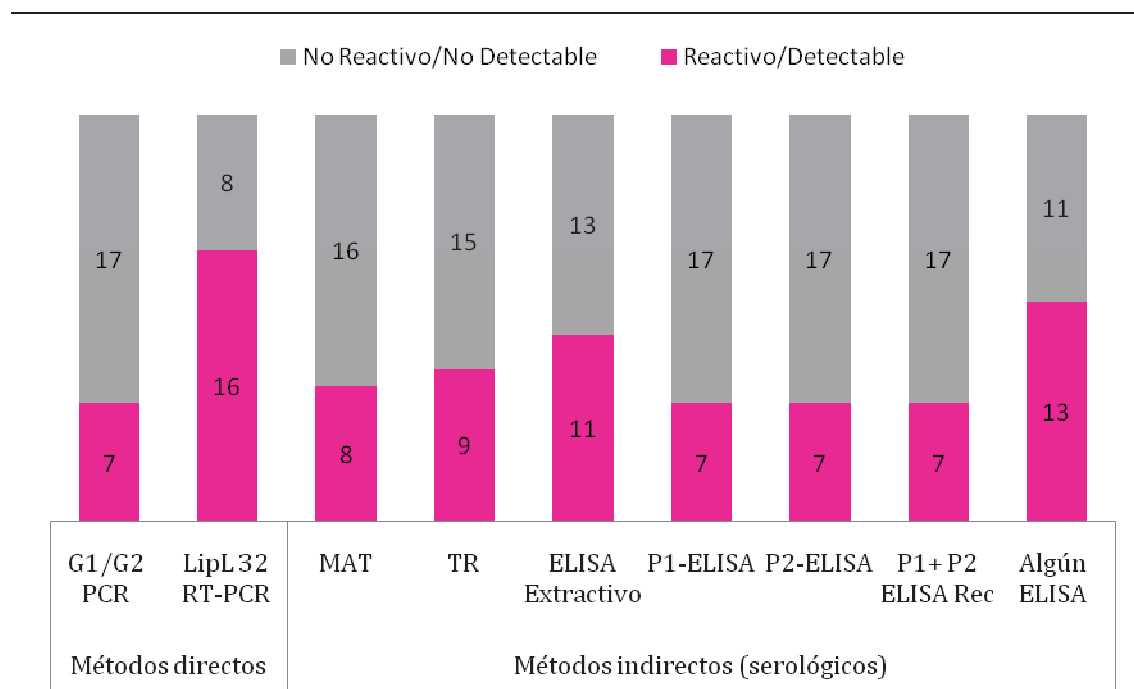


Figura 15. Resultados de los diferentes métodos diagnósticos en muestras de Casos Confirmados (n=24) en la etapa 1 (<10 días de evolución)

En la Figura 16 se detallan cada uno de los casos confirmados detectados por cada uno de los dos métodos directos de acuerdo a los días de evolución de la enfermedad.

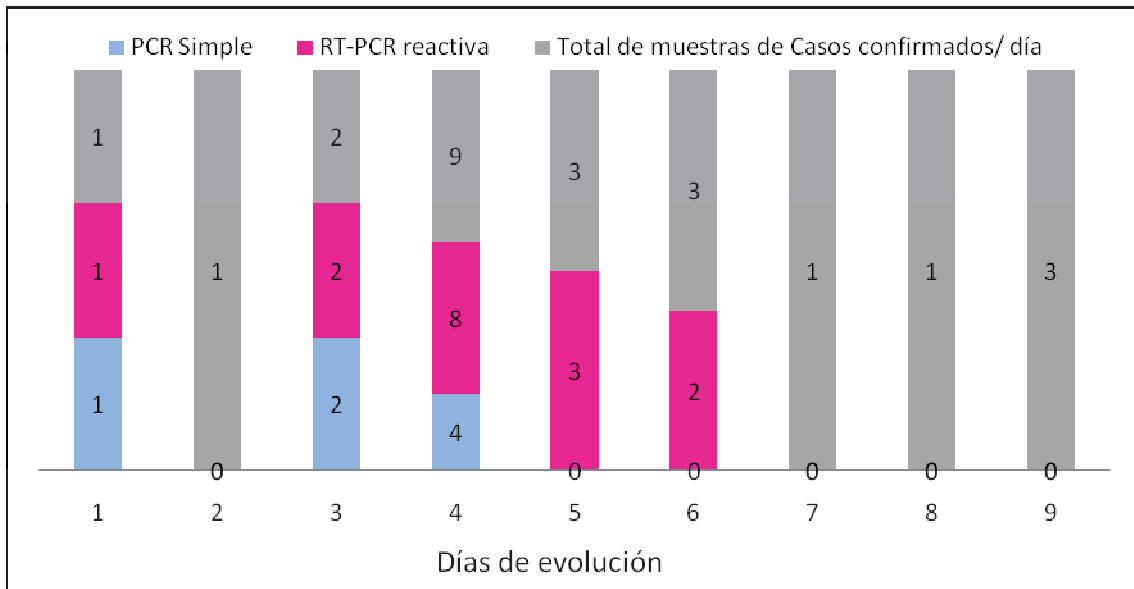


Figura 16. Número de Casos detectados (n=24) por cada uno de los dos métodos directos (PCR convencional y RT-PCR) por día de evolución en la etapa 1.

En la Figura 17 se describe el desempeño de cada método serológico en cada muestra de caso confirmado por cada día de evolución de la Etapa 1.

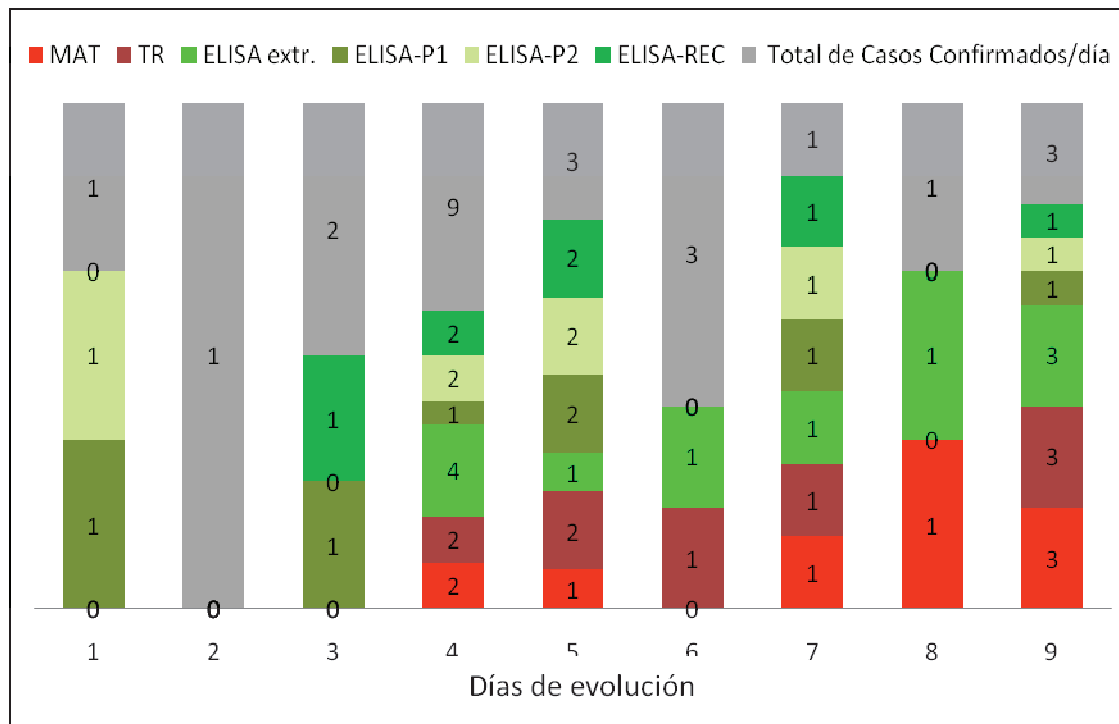


Figura 17. Número de Casos confirmados (n=24) detectados por cada uno de los métodos indirectos (serológicos) por día de evolución de la etapa 1.

No se incluyó el cultivo en la comparación con los otros métodos diagnósticos porque sólo se pudieron obtener cuatro muestras adecuadas de pacientes diferentes como para ser sembradas para cultivo de leptospiras. Resultando una positiva y tres negativas, la única muestra positiva también resultó detectable en ambas PCRs.

3. DISCUSIÓN

En la primera etapa de la enfermedad, ningún método individual fue capaz de detectar todos los casos. La RT-PCR fue el método (directo) que detectó el mayor número de casos (16/24) y en segundo lugar se ubicaría el método (indirecto) ELISA con antígeno extractivo (11/24). Este ELISA fue el método serológico que permitió la mayor detección de casos siendo superior al TR (9/24) y a la MAT (8/24).

Si se considerase la suma de reactividades frente a dos o más de los cuatro ELISAs desarrollados, ésta suma de reactividades permitiría la detección de 13 de los 24 casos. Esto implica que si se emplease y/o interpretase en forma combinada como si fuera un solo método, éste sería el segundo método más sensible o eficiente para el diagnóstico temprano. En el caso de no disponer de RT-PCR, una combinación de ELISAs podría ser una buena opción para la detección precoz de casos de leptospirosis.

La PCR convencional solo detectó casos (7/24) desde el primer día de evolución hasta el cuarto día de evolución, mientras que RT-PCR (16/24) lo hizo hasta el sexto día debido a la mayor sensibilidad de esta última (Stoddard y col., 2009; Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Todos los casos detectados mediante la PCR convencional fueron también detectados mediante la RT-PCR.

A la inversa de lo observado con los métodos directos, y como es esperable en métodos serológicos que requieren de la producción de anticuerpos, éstos presentaron los falsos negativos en las muestras con muy pocos días de evolución, y a medida que éstos aumentaron, la reactividad de los métodos serológicos también aumentó.

Tanto el TR, como el ELISA extractivo y la MAT comenzaron a detectar los

casos desde el cuarto día y lo hicieron hasta el último día de la primera etapa, aunque el número total de casos detectados por cada uno de estos métodos y el tiempo de evolución con que lo hicieron fue diferente. De los tres métodos, el ELISA con antígeno extractivo fue el que detectó más casos y de manera más precoz.

El diagnóstico de leptospirosis se basa generalmente en la MAT, éste método requiere muestras pareadas de sueros y utilización de microscopía de campo oscuro para la observación de reacciones de aglutinación con *Leptospiras* vivas (Adler y col, 1982; Faine y col, 1999; Levett, 2001). La ineficiencia de la MAT es una de las principales razones de la falta de diagnóstico oportuno y precoz, aunque esta técnica continúa siendo el método patrón serológico (WHO-ILS, 2003). Durante toda la primera etapa, la reactividad combinada de todos los ELISAs permitió la detección de un mayor número de casos y de manera más temprana que la de la MAT. Este hecho podría indicar que la baja eficacia hallada para los ELISAs en la Etapa 1 en los capítulos previos de esta tesis podría deberse no solo a las limitaciones propias de los métodos serológicos para la detección precoz, sino también a la baja sensibilidad y precocidad en este período de la MAT empleada como método patrón. Estos resultados indican que la MAT no sería un buen método patrón para la evaluación de otros métodos en etapas muy precoces de la enfermedad.

Los únicos métodos indirectos que fueron capaces de reaccionar antes del cuarto día de evolución fueron los ELISAs con antígenos sintéticos (P1-ELISA, P2-ELISA y REC-ELISA), que con diferentes patrones de positividad permitieron la detección de dos casos, siendo aparentemente muy precoces a pesar de ser serológicos. La elevada precocidad en estos métodos serológicos podría deberse también al sesgo de memoria de los pacientes respecto del inicio de los síntomas, aunque esto se contradice con el hecho de que esas mismas muestras fueron detectables también por algún método directo, lo cual estaría indicando que tendrían un tiempo de evolución que estaría en el límite de detección de ambos métodos y la elevada sensibilidad de los métodos serológicos permitiría la positividad combinada en ambos.

4. CONCLUSIONES

- *La RT-PCR sería el mejor método para la detección de casos de hasta 6 día de evolución.*
- *En segundo lugar se ubicaría el ELISA con antígeno extractivo, que sería el método serológico que permitiría la mayor detección de casos desde el cuarto al último día de la primera etapa.*
- *Durante toda la primera etapa, la reactividad combinada de todos los ELISAs permitió la detección de un mayor número de casos y de manera más precoz que la de la MAT. Esto implica que la MAT no sería un buen método patrón para la evaluación de nuevos métodos en etapas muy precoces de la enfermedad, donde deberían emplearse métodos directos de diagnóstico como la RT-PCR.*

CAPITULO VI

META-ANÁLISIS SOBRE PRUEBAS DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS HUMANA

1. RESUMEN

El diagnóstico de leptospirosis es muy complejo. Los métodos tradicionales son el cultivo y la detección de anticuerpos por MAT pero ambos tienen numerosas limitaciones. Para superarlas se han desarrollado diferentes tests de ELISA. La precisión de estos ELISAs depende de diferentes variables, como etapa de la enfermedad, antígeno usado o tipo de anticuerpo que detecta. Se han realizado muchos estudios para determinar la performance de los ELISAs aplicados en diferentes situaciones, y en diferentes grupos de pacientes.

Objetivo. Evaluar la exactitud del ELISA para la detección de anticuerpos específicos antileptospiras en humanos, así como identificar las fuentes de heterogeneidad que afectan el desempeño de la prueba diagnóstica.

Materiales y Métodos. Luego de una búsqueda bibliográfica, 35 artículos reunieron todos los criterios de inclusión. Los métodos meta-analíticos, incluidos los análisis estratificados y meta-regresión, fueron utilizados para identificar los factores que afectan la precisión del ELISA para el diagnóstico de leptospirosis en humanos.

Resultados. La sensibilidad y especificidad combinadas fueron de 0.779 (IC95%, 0,770 – 0,789) y 0.913 (IC95%, 0,908 – 0,917) respectivamente para la predicción del punto final. El análisis de la curva ROC resumen (SROC) mostró que el área bajo la curva fue de 0.964. Se analizaron diferentes fuentes de heterogeneidad (etapa de la enfermedad, antígeno usado o tipo de anticuerpo detectado), pero ningún resultado de los análisis estratificados explicó completamente la heterogeneidad significativa entre los estudios. En el análisis de meta-regresión, el ELISA aplicado en pacientes en etapas de convalecencia de la enfermedad y el uso de un ELISA que detecta IgM mostraron estar significativamente asociados con una mayor precisión diagnóstica. El tipo de antígeno utilizado en el ELISA (extractivo o específico) no afectaron sustancialmente la precisión del diagnóstico.

Conclusiones. Este meta-análisis identificó al tipo de inmunoglobulinas que detecta el ELISA y la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente, como las dos fuentes más importantes de variabilidad asociadas con una mejora en la eficacia de dichas pruebas para detectar leptospirosis humana. Las pruebas de ELISA presentan mayor eficacia cuando se aplican sobre individuos en fase convaleciente de la enfermedad y cuando la prueba detecta IgM.

2. RESULTADOS

2.1. Resumen de los estudios incluidos

A partir de la búsqueda bibliográfica se identificaron 96 artículos científicos sobre pruebas de ELISA empleadas para detectar anticuerpos contra *Leptospira*. De éstos, 35 artículos cumplieron con los criterios de inclusión fijados para evaluar la eficacia de las técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra *Leptospira* en humanos.

Dentro de los estudios incluidos en el meta-análisis, solamente dos fueron realizados antes del año 1990, 8 de ellos entre 1991 y 2000 y la mayoría fueron posteriores a 2001 (n= 25). Las pruebas de ELISA para la detección de IgM fueron evaluadas en 21 oportunidades, mientras que solamente tres estudios evaluaron pruebas contra IgG. Otros artículos reportaron evaluaciones que involucraron pruebas de ELISA contra IgM e IgG (n= 9) o IgG, IgM e IgA (n= 1). Solamente un estudio evaluó una prueba de ELISA contra IgA.

La etapa de la enfermedad en la que fue evaluada la prueba de ELISA no pudo ser determinada o no fue especificada en 17 estudios. Tres y dos estudios fueron realizados sobre pacientes que padecieron leptospirosis aguda y convaleciente, respectivamente. Treinta estudios fueron realizados con pacientes en ambas etapas de la enfermedad (Tabla 13).

Tabla 13. Descripción de los estudios incluidos en el meta-análisis.

<i>Año</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Tipo de anticuerpo</i>	<i>Fase de la enfermedad</i>	<i>Tipo de antígeno</i>	<i>Referencia</i>
1980	0,948	0,995	IgM	No especificada	Células completas	Terpstra y col.
1988	0,820	0,772	IgM	No especificada	Células completas	Silva y col.
1992	1,000	1,000	IgM	No especificada	Células completas	Silva y Camargo
	0,500	1,000	IgA	No especificada	Células completas	
1995	0,921	0,975	IgM	No especificada	Células completas	Ribeiro y col.
1996	0,899	0,974	IgM	No especificada	Células completas	Ribeiro y col.
1997	0,959	0,462	IgM + IgG	No especificada	Células completas	Polanco y col.
1997	0,984	0,979	IgM	Aguda	Células completas	Da Silva y col.
	0,698	1,000	IgG	Aguda	Células completas	

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

	0,762	0,979	IgA	Aguda	Células completas	
1998	0,991	0,988	IgM	No especificada	Células completas	Brandao y col.
1999	0,360	0,968	IgM	Aguda	Células completas	Yersin y col.
	0,760	0,968	IgM	Convaleciente	Células completas	
1999	0,522	0,952	IgM	Aguda	Células completas	Cumberland y col.
	0,893	0,977	IgM	Aguda	Células completas	
	0,969	0,939	IgM	Convaleciente	Células completas	
2000	0,548	0,969	IgM	No especificada	Células completas	Sekhar y col.
	0,837	0,938	IgM + IgG	No especificada	Células completas	
2001	0,965	0,986	IgM	No especificada	Células completas	Zochowski y col.
	0,930	0,824	IgM	No especificada	Células completas	
2001	0,560	0,911	IgG	Aguda	Recombinante/sintético	Flannery y col.
	0,940	0,911	IgG	Convaleciente	Recombinante/sintético	
2001	0,596	0,958	IgM	Aguda	Células completas	Smits y col. (a)
	0,895	0,992	IgM	Convaleciente	Células completas	
2001	0,570	0,958	IgM	Aguda	Células completas	Smits y col. (b)
	0,844	0,989	IgM	Convaleciente	Células completas	
2002	0,519	0,951	IgM	No especificada	Células completas	Effler y col.
	0,500	0,902	IgM	No especificada	Células completas	
	0,346	0,978	IgM	No especificada	Células completas	
	0,423	0,978	IgM	No especificada	Células completas	
2002	0,975	0,988	IgM	No especificada	Células completas	Céspedes y col.
2002	0,896	0,927	IgG	No especificada	Células completas	Levett y Branch
	0,875	0,964	IgM	No especificada	Células completas	
2003	0,486	0,969	IgM	Aguda	Células completas	Bajani y col.
	0,750	0,969	IgM	Convaleciente	Células completas	
2003	0,500	0,787	IgM	Aguda	Células completas	Sehgal y col.
	0,877	0,872	IgM	Convaleciente	Células completas	
2004	0,835	0,802	IgM	No especificada	Células completas	Nakaran y Pradutkanchana

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

	0,541	0,634	IgG	No especificada	Células completas	
	0,976	0,965	IgM	No especificada	Células completas	
	0,788	0,713	IgG	No especificada	Células completas	
	0,965	0,941	IgM	No especificada	Células completas	
	0,847	0,792	IgG	No especificada	Células completas	
2004	1,000	0,962	IgM	No especificada	Células completas	Vitale y col.
2005	0,875	0,976	IgM	Aguda	Células completas	Tansuphasiri y col.
	0,990	0,939	IgM	Aguda	Células completas	
2006	0,936	0,933	IgM	No especificada	Células completas	Ooteman y col.
2006	0,883	0,891	IgM	No especificada	Células completas	De Abreu Fonseca y col.
2006	0,609	0,656	IgM	Aguda	Células completas	Blacksell y col.
	0,652	0,454	IgM	Convaleciente	Células completas	
2007	0,792	0,950	IgM	Aguda	Células completas	McBride y col.
	0,875	0,875	IgM	Aguda	Células completas	
	0,960	0,950	IgM	Convaleciente	Células completas	
	0,920	0,875	IgM	Convaleciente	Células completas	
	0,755	0,977	IgM	Aguda	Células completas	
2007	0,681	0,963	IgG	Aguda	Células completas	Vanasco y col.
	0,932	0,993	IgG	Convaleciente	Células completas	
	0,788	1,000	IgG	Convaleciente	Células completas	
2008	1,000	0,977	IgM	Convaleciente	Células completas	McBride y col.
2008	0,696	0,968	IgM	Aguda	Recombinante/sintético	Srimanote y col.
	0,667	0,968	IgM	Convaleciente	Recombinante/sintético	
	0,630	1,000	IgG	Aguda	Recombinante/sintético	
	0,861	1,000	IgG	Convaleciente	Recombinante/sintético	
2008	0,898	0,981	IgM	No especificada	Células completas	Honarmand y col.
2008	0,963	0,911	IgM	No especificada	Recombinante/sintético	Dey y col.
2009	0,856	0,993	IgM	Aguda	Recombinante/sintético	Blanco y col.
	1,000	0,993	IgM	Convaleciente	Recombinante/sintético	

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

	0,833	0,993	IgM	Aguda	Recombinante/ sintético	
	0,922	0,993	IgM	Aguda	Recombinante/ sintético	
2009	0,850	0,933	IgM	No especificada	Células completas	Pol y Bharadwaj
2010	0,434	0,882	IgM	No especificada	Recombinante/ sintético	Aviat y col.
	0,943	1,000	IgG	No especificada	Recombinante/ sintético	
	0,777	0,820	IgG	No especificada	Células completas	
	0,777	0,680	IgG	No especificada	Recombinante/ sintético	
	0,690	0,831	IgG	No especificada	Recombinante/ sintético	
	0,642	0,895	IgG	No especificada	Recombinante/ sintético	
	0,624	0,930	IgG	Aguda	Células completas	
	0,624	0,775	IgG	Aguda	Recombinante/ sintético	
	0,661	0,873	IgG	Aguda	Recombinante/ sintético	
2011	0,514	0,944	IgG	Aguda	Recombinante/ sintético	Vanasco y col.
	0,956	0,977	IgG	Convaleciente	Células completas	
	0,824	0,724	IgG	Convaleciente	Recombinante/ sintético	
	0,758	0,782	IgG	Convaleciente	Recombinante/ sintético	
	0,725	0,872	IgG	Convaleciente	Recombinante/ sintético	
	0,828	1,000	IgG	Convaleciente	Células completas	
	0,793	0,864	IgG	Convaleciente	Recombinante/ sintético	
	0,724	0,773	IgG	Convaleciente	Recombinante/ sintético	
	0,862	0,773	IgG	Convaleciente	Recombinante/ sintético	

Treinta estudios fueron realizados sobre pruebas de ELISA desarrollados en la base de antígenos provenientes de células completas y solamente cinco estudios fueron efectuados empleando pruebas de ELISA con antígenos recombinantes/sintéticos.

2.2. Estudios excluidos

De los 96 estudios identificados al inicio del meta-análisis, 49 no reunieron uno o más de los criterios de inclusión establecidos. Artículos de revisión y estudios sin la suficiente cantidad de datos requeridos para estimar la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA, fueron eliminados. Doce estudios que habían superado la primer etapa de evaluación fueron eliminados (Figura 5 de materiales y métodos) debido a la falta de información estadística para conducir un meta-análisis, estudios realizados con objetivos diferentes, datos duplicados o estudios realizados en animales.

De los 35 artículos científicos que reunieron los criterios de inclusión, se identificaron 88 estudios (que incluyeron un total de 21.494 pacientes).

2.3. Resultados del análisis de eficacia

El análisis de los 88 estudios arrojó una sensibilidad global de 0,779 (IC 95% 0,770 – 0,789) (Figura 18) y una especificidad global de 0,913 (IC 95% 0,908 – 0,917) (Figura 19) para la predicción final. El coeficiente de probabilidad positivo fue de 12,9 (IC 95% 9,935 – 16,750) mientras que el coeficiente de probabilidad negativo fue de 0,206 (IC 95% 0,175 – 0,243). El ORD global fue de 75,057 (IC 95% 53,181 – 105,930), indicando alta eficacia de las pruebas de ELISA.

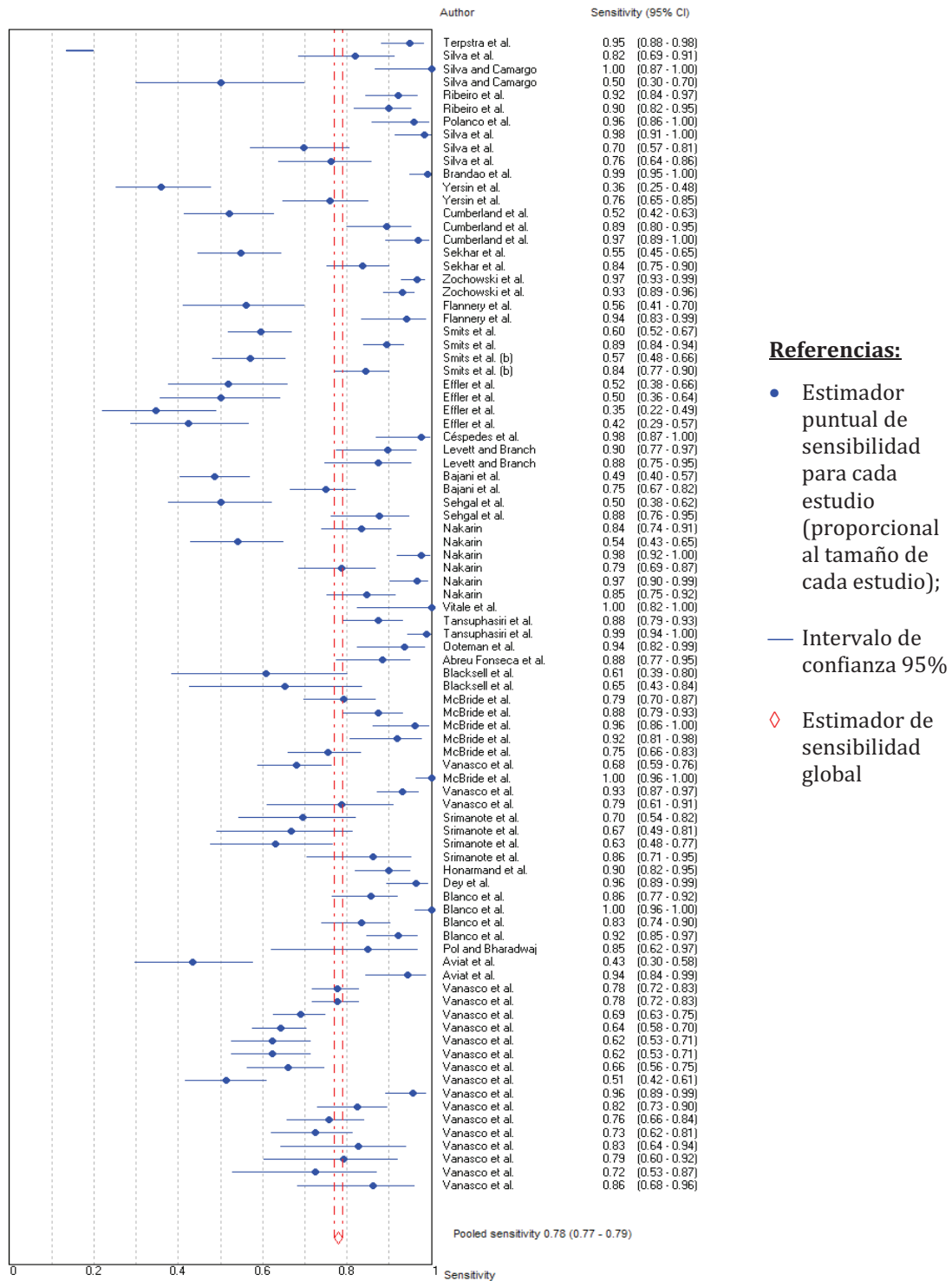
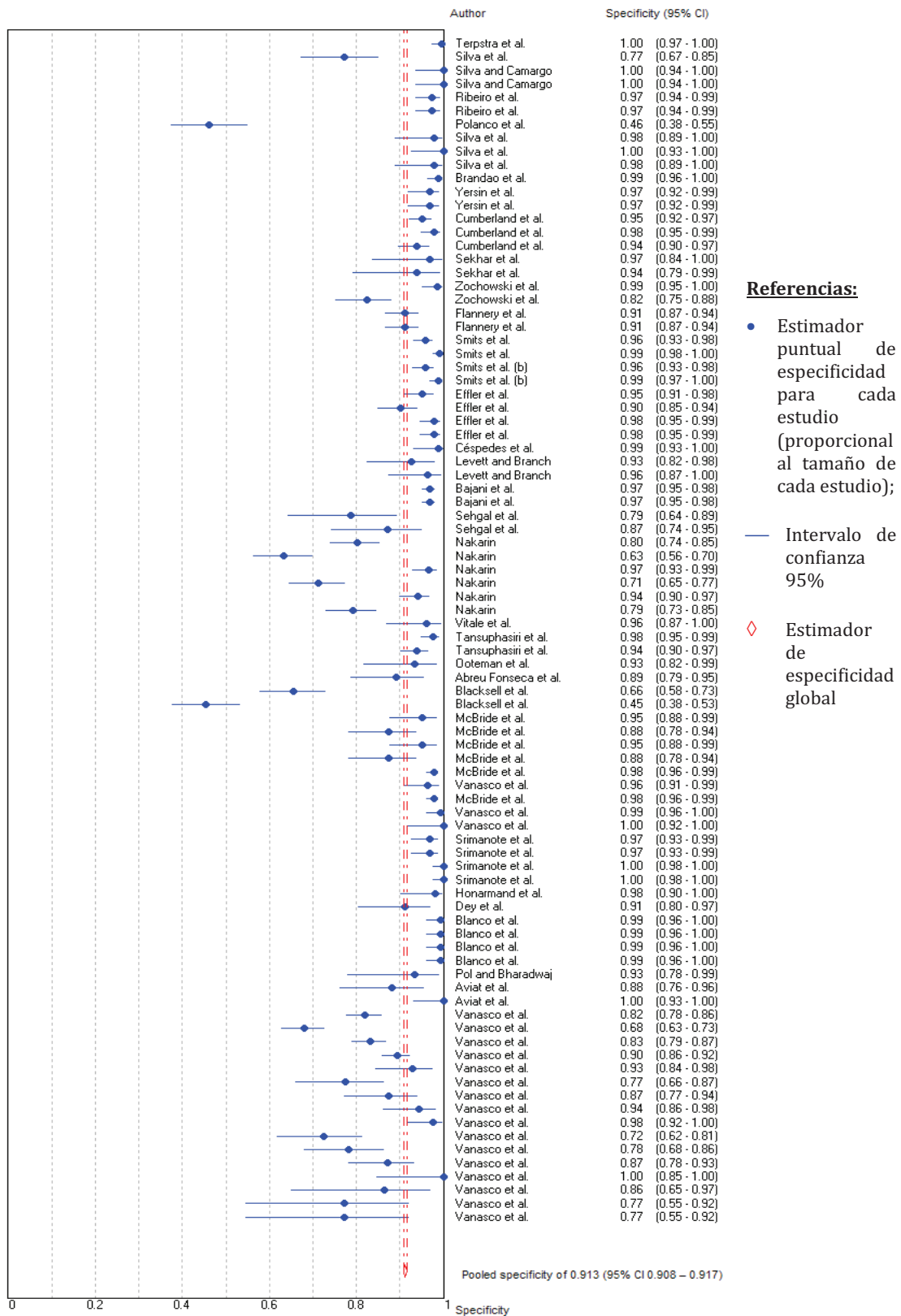


Figura 18. Estimación de sensibilidad (“Forest plot”) de la de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana.

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



Referencias:

- Estimador puntual de especificidad para cada estudio (proporcional al tamaño de cada estudio);
- Intervalo de confianza 95%
- ◇ Estimador de especificidad global

Figura 19. Estimación de la especificidad (“Forest plot”) de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana.

La curva SROC mostró un área bajo la curva de 0,964 con un valor de Q^* de 0,910 (Desviación Estándar (Q^*)= 0,0117). El análisis de la curva SROC asimétrica no mostró diferencias en los resultados, indicando que el ORD es constante independientemente del valor umbral empleado (Figura 20).

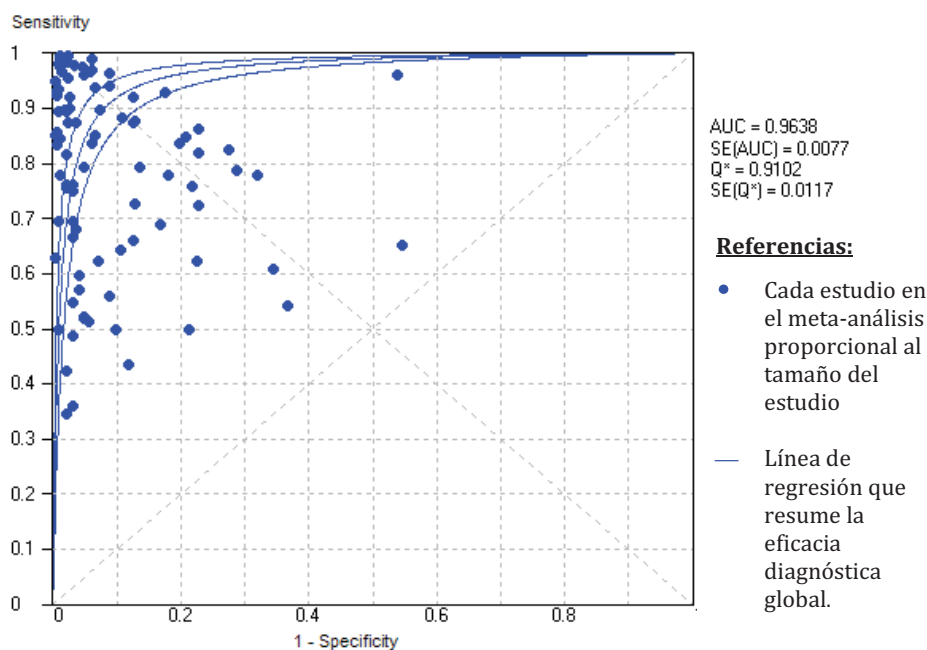


Figura 20. Curva SROC de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana.

2.4. Heterogeneidad y análisis estratificado

Una de las principales causas de heterogeneidad en los estudios de eficacia de las pruebas diagnósticas es el efecto del punto de corte o valor umbral definido por cada estudio para clasificar los individuos como positivos o negativos (Zamora y col., 2006). El coeficiente de correlación de Spearman entre el logit de la sensibilidad y el logit de 1-especificidad no fue significativo ($p= 0,062$), por lo que se descarta la presencia de un efecto umbral.

Los estudios mostraron un alto grado de variabilidad en los estimados de sensibilidad ($P < 0,001$, $I^2 = 93,72\%$) y de especificidad ($P < 0,001$, $I^2 = 95,02\%$). La significativa heterogeneidad en ambos parámetros condiciona su utilidad como medidas de resumen para la determinación clínica. Esta heterogeneidad puede ser el resultado de diferencias en la metodología empleada por cada prueba diagnóstica (ej.: tipos de inmunoglobulinas detectadas, tipo de antígeno empleado para el desarrollo de la prueba de ELISA) o por las características de las

poblaciones (pacientes muestreados en fase aguda o convaleciente). Con el objetivo de identificar factores asociados con la heterogeneidad se realizó un análisis estratificado (Tabla 14).

Tabla 14. Medidas resumen para el análisis estratificado.

Sub-análisis	Efecto global y análisis estratificado	Estudios (n)	Sensibilidad		Especificidad		OD diagnóstico
			Estimado global (IC 95%)	Q (P)	Estimador global (IC 95%)	Q (P)	
	Efecto Global	88	0,779 (0,770-0,789)	<0,001	0,913 (0,908-0,917)	<0,001	75,05 (53,18-105,93)
Fase de la enfermedad	Fases no identificadas	37	0,802 (0,788-0,816)	<0,001	0,869 (0,860-0,878)	<0,001	70,94 (42,33-118,89)
	Aguda	26	0,683 (0,663-0,701)	<0,001	0,946 (0,939-0,952)	<0,001	50,20 (29,11-86,56)
	Convaleciente	25	0,864 (0,847-0,879)	<0,001	0,934 (0,925-0,941)	<0,001	128,40 (58,82-280,30)
Tipo de inmunoglobulina identificada	IgM + IgG	2	0,876 (0,860-0,995)	0,019	0,555 (0,475-0,632)	<0,001	38,63 (10,22-146,01)
	IgM	55	0,804 (0,792-0,815)	<0,001	0,944 (0,939-0,949)	<0,001	123,45 (77,72-196,09)
	IgG	29	0,736 (0,719-0,752)	<0,001	0,848 (0,837-0,859)	0,001	25,85 (16,99-39,33)
	IgA	2	0,685 (0,578-0,780)	0,018	0,990 (0,948-1,000)	0,209	137,33 (25,63-735,70)
Tipo de antígeno	Células completas	63	0,794 (0,783-0,805)	<0,001	0,920 (0,914-0,925)	0,001	95,44 (61,75-147,51)
	Recombinante /sintético	25	0,744 (0,725-0,762)	<0,001	0,890 (0,880-0,901)	<0,001	37,27 (22,55-61,61)

Se evaluaron tres análisis estratificados restringidos a la fase de la enfermedad. Se detectaron 37 estudios que no identificaron la fase de la enfermedad de los pacientes incluidos o que incluyeron pacientes en diferentes etapas de la enfermedad sin identificación. La sensibilidad y especificidad en este grupo fue de 0,802 (IC95% 0,788 - 0,816) y 0,869 (IC95% CI 0,860 - 0,878), respectivamente. Cuando se consideraron los pacientes en fase aguda (n= 26), la sensibilidad global fue de 0,683 (IC 95% CI 0,663 - 0,701) y la especificidad global de 0,946 (IC 95% CI 0,939 - 0,952). No obstante, cuando las pruebas de ELISA fueron aplicadas en pacientes que sufrieron la fase convaleciente de la leptospirosis (n= 25), la sensibilidad fue mayor que la obtenida a partir de muestras colectadas durante la fase aguda (0,863, IC 95% CI 0,847 - 0,879),

mientras que la especificidad permaneció en valores similares (0,934, IC95% 0,925 - 0,941). Todos los análisis estratificados mostraron heterogeneidad significativa, lo que significa que estos factores no pueden explicar la totalidad de la variabilidad existente (Tabla 14).

Se identificaron cuatro grupos de estudio cuando se realizó la estratificación en función del tipo de inmunoglobulina detectada por la prueba de ELISA (IgM, IgG, IgA, o IgM + IgG). Dos ensayos emplearon pruebas de ELISA que detectaban IgM e IgG en la misma prueba, evidenciando una sensibilidad y especificidad global de 0,876 (IC95% 0,86 - 0,995) y 0,555 (IC95% 0,475 - 0,632), respectivamente. La sensibilidad global (0,804, IC95% 0,792 - 0,815) y especificidad global (0,944, IC95% 0,939 - 0,949) fueron mayores en los estudios que usaron IgM en lugar de IgG (sensibilidad= 0,736 y especificidad= 0,848). Otro subgrupo de análisis estuvo restringido solamente a dos ensayos de ELISA basados en IgA, los cuales mostraron una baja sensibilidad (0,685, IC95% 0,578 - 0,780) y mayor especificidad (0,990, IC95% 0,948 - 1,000). No obstante, el análisis estratificado no redujo la heterogeneidad entre los estudios (Tabla 14).

Considerando el tipo de antígenos usados en el desarrollo de cada prueba de ELISA, el análisis estratificado indicó una falta de efecto sobre la sensibilidad cuando se emplearon pruebas de ELISA usando antígenos provenientes de células completas (0,794, IC 95% 0,783 - 0,805) o recombinantes/sintéticos (0,744, IC 95% 0,725 - 0,762). No obstante, aquellos ELISA que usaron antígenos de células completas tuvieron una mayor especificidad (0,920, IC 95% 0,914 - 0,925) en comparación con los ELISA sobre antígenos recombinantes o sintéticos (0,890, IC 95% 0,880 - 0,901). Los resultados mostraron que el tipo de antígeno empleado en la prueba de ELISA no tuvo significancia sobre la heterogeneidad ($P < 0.001$) (Tabla 14).

Ninguno de los análisis estratificados pudo explicar completamente la significativa heterogeneidad a lo largo del meta-análisis. La prueba estadística para heterogeneidad fue significativa aún entre datos del mismo estrato (Tabla 14). Por ello se realizó una meta-regresión para evaluar múltiples factores en un mismo análisis. El resultado de la regresión fue estimado mediante el *odds-ratio* diagnóstico relativo (RDOR) (Tabla 15).

Tabla 15. Meta-regresión para determinar fuentes de heterogeneidad

<i>Covariables</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Significancia</i>	<i>RDOR</i>	<i>IC 95%</i>
<i>Intercepción</i>	7,047	<0,0001	----	----
<i>Valor umbral (S)</i>	0,221	0,1234	----	----
<i>General + Agudo vs. Convaleciente</i>	0,611	0,0385	1,84	(1,03 – 3,28)
<i>IgM vs. IgG</i>	-1,983	0,0008	7,14	(0,04 – 0,43)
<i>Antígeno Células Completas vs. Recombinante/sintético</i>	0,115	0,847	1,12	(0,34 – 3,66)

Referencias: Intercepto: constante del modelo; S: indicador del valor umbral (logit tasa verdaderos positivos + logit tasa falsos positivos)

Los estudios que incluyeron pacientes en fase convaleciente de la enfermedad mostraron un RDOR significativamente mayor (1,84 veces) en comparación con aquellos estudios que emplearon pacientes en fase aguda o en los que no fue posible identificar la fase de la enfermedad que presentaban. Estudios basados en pruebas de ELISA que identificaban IgM produjeron un RDOR que fue significativamente mayor (7,14 veces) que aquellos que identificaban IgG. El tipo de antígeno usado en la prueba de ELISA no produjo un cambio significativo en el RDOR, indicando que el uso de antígenos a partir de células completas o recombinante/sintético no afectó significativamente la eficacia de la prueba.

3. DISCUSIÓN

El presente meta-análisis realizado sobre la base de 88 estudios que evaluaron la eficacia de diferentes técnicas de ELISA para la detección de pacientes con leptospirosis mostró una curva SROC con un área del 96,3%, indicando una alta eficacia para estas pruebas. Sin embargo, la alta heterogeneidad en los estimados de sensibilidad y especificidad global condiciona su utilidad como medidas de resumen para la determinación clínica.

Para intentar explicar la variabilidad observada, se realizó un análisis estratificado, identificando tres grandes fuentes de variabilidad: 1) fase de la enfermedad en los pacientes (no identificada, aguda y convaleciente); 2) tipo de inmunoglobulina detectada por la prueba de ELISA (IgM, IgG, IgA, o IgG); y 3) tipo de antígenos usados en el desarrollo de cada prueba de ELISA, de células completas o recombinantes/sintéticos. La heterogeneidad en los resultados

estratificados continuó por lo que no pudo ser completamente explicada a partir de dichas fuentes reconocidas de variabilidad.

La variabilidad existente en el diseño de los estudios y la calidad de los mismos puede ser una fuente de heterogeneidad de los resultados. No obstante, en este estudio no se realizó una categorización de la calidad de los estudios evaluados por no contar con los elementos suficientes para realizarlo. Otra de las variables que podría generar la heterogeneidad hallada en los métodos diagnósticos analizados son las diferentes características y composiciones de las poblaciones de pacientes testeados; tales como aspectos demográficos (edad y sexo), aspectos clínicos (severidad, co-morbilidad), diferencias regionales (razas, climas, entre otras). Estas fuentes no pudieron ser cuantificadas o medidas en este estudio por no estar disponible la información requerida. El estudio de la influencia de estos factores de variabilidad debería ser el objetivo de futuros estudios.

De cualquier modo, el análisis de meta-regresión permitió resaltar algunas variables que parecen influenciar sobre los estimadores de eficacia en las pruebas de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis humana. Estas técnicas cuando son aplicadas en pacientes en fase convaleciente de la enfermedad mostraron una eficiencia significativamente mayor en comparación con aquellos estudios que emplearon pacientes en fase aguda o en los que no fue posible identificar la fase de la enfermedad. Es esperable un mejor desempeño de cualquier método serológico en etapas convalecientes de la enfermedad debido a que la aparición de anticuerpos en el suero de los pacientes luego cada infección (cinética de anticuerpos) requiere de un tiempo y a medida que éste transcurre se espera un aumento en la sensibilidad de detección (Fainboim y Geffner 2005).

Otro factor que presentó una gran influencia sobre la eficacia de las técnicas de ELISA fue el tipo de anticuerpo identificado. Aquellas pruebas de ELISA que identificaban anticuerpos de tipo IgM fueron más eficientes (7 veces más eficientes de acuerdo a su RDOR) que los que identificaban IgG. Esta marcada diferencia a favor de la IgM sobre la IgG indicaría que, en la mayoría de los estudios, tanto la sensibilidad como la especificidad de IgM fue significativamente mayor que la de IgGs. En el caso particular de *Leptospira* se sabe que usualmente

los anticuerpos de tipo IgM aparecen antes que los de IgG y permanecen dosables por meses o años pero a bajo título, mientras que la detección de IgG es más variable y puede, en algunas oportunidades, no ser detectable nunca o serlo sólo por períodos cortos de tiempo o persistir por varios años (WHO-ILS, 2003). La mayor sensibilidad de los ELISAs que detectan IgM, más aún en la fase aguda, podría ser debido a la mayor precocidad de aparición de este tipo de anticuerpos en cualquier respuesta inmune y a la ausencia de IgG detectable descrita en algunos casos de leptospirosis. Algunas de estas características de la respuesta inmune de *Leptospira* son comunes a otros microorganismos pero otras son propias y muy particulares, como ser la persistencia de IgM por años o la ausencia de la detección IgG. Sin embargo, la mayor especificidad de la IgM respecto de la IgG aparentemente presente en la leptospirosis es más difícil de explicar. La IgM se caracteriza por una menor afinidad por los antígenos que la IgG (Fainboim y Geffner, 2005). Una posible hipótesis que podría justificar esta mayor especificidad en la detección de ELISA IgM podría darse si se considera el caso de pacientes confirmados de otras patología febriles con anticuerpos IgG detectados. En este sistema compiten los anticuerpos de tipo IgM e IgG del paciente y como los anticuerpos IgG tienen mayor afinidad con los antígenos se unen más rápidamente a la superficie de inmunocaptura y por lo tanto la IgM inespecífica no puede unirse siendo ésta no detectable. De este modo, la IgG inespecífica constituye un resultado falso positivo por IgG que no es observado para IgM. Es decir, lo que representa una clásica ventaja de la detección de IgG se podría convertir en una desventaja que favorecería indirectamente a la IgM.

Finalmente, el tipo de antígeno usado en la prueba de ELISA no produjo un cambio significativo en el RDOR, indicando que el uso de células completas o recombinantes/sintéticos no afectó significativamente la eficacia de la prueba. Estos resultados son coincidentes con los estudios hallados en este mismo trabajo de tesis (Capítulo IV) que sugieren que antígenos recombinantes y sintéticos no lograrían superar la eficiencia diagnóstica del antígeno extractivo, que es un antígeno obtenido de un lisado de un cultivo de célula completa de *Leptospira*. Más aún, podrían explicar, en parte, la ausencia de diferencias significativas halladas entre las eficacias de los cuatro ELISAs en las etapas 1, 3 y en la evaluación global en el mismo capítulo.

3.1. Impacto sobre el campo de aplicación

Frente a un caso con sospecha clínico-epidemiológica de leptospirosis, se recomienda la solicitud de una prueba de ELISA por tener una buena eficacia, no siendo de gran relevancia la elección del tipo de antígeno empleado. Cualquiera sea la etapa en que se encuentre el paciente (aguda o convaleciente) el ELISA IgM sería la mejor elección. Si el paciente tiene pocos días de evolución de la enfermedad (fase aguda) y las pruebas de ELISA aplicadas (IgG o IgM) son negativas, no podrá descartarse el diagnóstico de leptospirosis ya que se deberá considerar la posibilidad de posibles falsos negativos de cualquiera de estos métodos en fases precoces de la enfermedad. En este caso es recomendable solicitar una segunda muestra o aplicar algún método directo de diagnóstico (no serológicos) como ser la RT-PCR.

4. CONCLUSIONES

- *El tipo de antígeno usado (células completas o recombinantes/sintéticos) no afectó significativamente la eficacia de la prueba de ELISA.*
- *Este meta-análisis identificó al tipo de inmunoglobulinas que detecta el ELISA y la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente, como las dos fuentes más importantes de variabilidad asociadas con una mejora en la eficacia de dichas pruebas para detectar leptospirosis humana.*
- *Las pruebas de ELISA presentan mayor eficacia cuando se aplican sobre individuos en fase convaleciente de la enfermedad y cuando la prueba detecta IgM*
- *Estos resultados sugieren que debería evaluarse el desarrollo de reactivos de ELISA que detecten anticuerpos de tipo IgM con el fin de mejorar su eficacia.*
- *Se deberían conducir estudios adicionales para analizar el efecto de otras fuentes potenciales de variabilidad, especialmente aquellas relacionadas con aspectos regionales (regiones geográficas, raza, clima, alimentación, entre otras).*

CAPITULO VII

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS Y FACTORES DE RIESGO DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA EN ARGENTINA

1. RESUMEN

Los **objetivos** del presente capítulo fueron examinar la carga de la leptospirosis en la Argentina, describir los hallazgos de vigilancia, evaluar la presentación clínica de los casos e identificar factores de riesgo para la adquisición de la enfermedad.

Materiales y Métodos. Desde enero de 1999 hasta diciembre de 2005, fueron remitidos al laboratorio de referencia nacional 812 casos sospechosos, de los cuales 182 y 463 fueron diagnosticados como casos confirmados y no confirmados, respectivamente. El diagnóstico de leptospirosis fue descartado en 167 casos.

Resultados. El serogrupo infeccioso que presuntivamente prevaleció fue Icterohaemorrhagiae, seguido por los serogrupos Pomona, Ballum y Canicola. La mayoría de los casos se presentaron durante los meses cálidos y lluviosos. Los casos confirmados fueron predominantemente adultos y de sexo masculino, quienes se presentaron con fiebre, dolores de cabeza y mialgias. Otras manifestaciones clínicas incluyeron ictericia, insuficiencia renal aguda, síntomas respiratorios y hemorragia. La inyección conjuntival, un signo clínico distintivo de la leptospirosis, se observó en el 55% de los casos confirmados pero también en el 43% de los casos con diagnóstico descartado. Luego del análisis multivariado, se detectó que ser mayor de 30 años (OR= 2.16; 1.05 - 4.41), trabajar en ambientes rurales (OR= 3.41; 1.45-8.06), estar en contacto con aguas contaminadas (OR= 2.17; 1.01-4.68) y con inundaciones (OR= 4.49; 1.17-17.25) estuvieron significativamente asociados con la leptospirosis.

Conclusión. A pesar de que las actividades asociadas a los trabajos rurales implican factores de riesgo en Argentina, estar en contacto con eventuales inundaciones ha emergido como el mayor factor de riesgo de leptospirosis en Argentina.

2. RESULTADOS

2.1. Vigilancia

Desde Enero de 1999 hasta Diciembre de 2005, se recibieron en el laboratorio del INER las muestras y los datos correspondientes a 812 casos sospechosos de leptospirosis. De éstos, 182 (22%) y 463 (57%) fueron identificados como casos confirmados de leptospirosis y no confirmados, respectivamente. El diagnóstico de leptospirosis fue descartado (No casos) en 167 (21%) de los casos sospechados.

Entre los 182 casos confirmados, el serogrupo presumiblemente infectante fue *L. interrogans*, serogrupos Icterohaemorrhagie (57 casos, 31%) y Pomona (27, 15%), *L. borgpetersenii* serogrupo Ballum (25, 14%), *L. interrogans* serogrupo Canicola (18, 10%), *L. borgpetersenii* serogrupo Sejroe (8, 4%) y Tarassovi (4, 2%). Los títulos más altos fueron dirigidos contra múltiples serogrupos (coaglutinación) en 43 casos confirmados (24%).

Durante ese período de siete años, se detectó que entre mediados del verano y fines del otoño ocurrieron el 76% de los casos, en coincidencia con un clima cálido y lluvioso. La vigilancia detectó dos brotes, en el año 2001 en Eldorado, Misiones, y en el 2003 en la ciudad de Santa Fe. Estos se produjeron después de grandes lluvias e inundaciones (Figura 21).

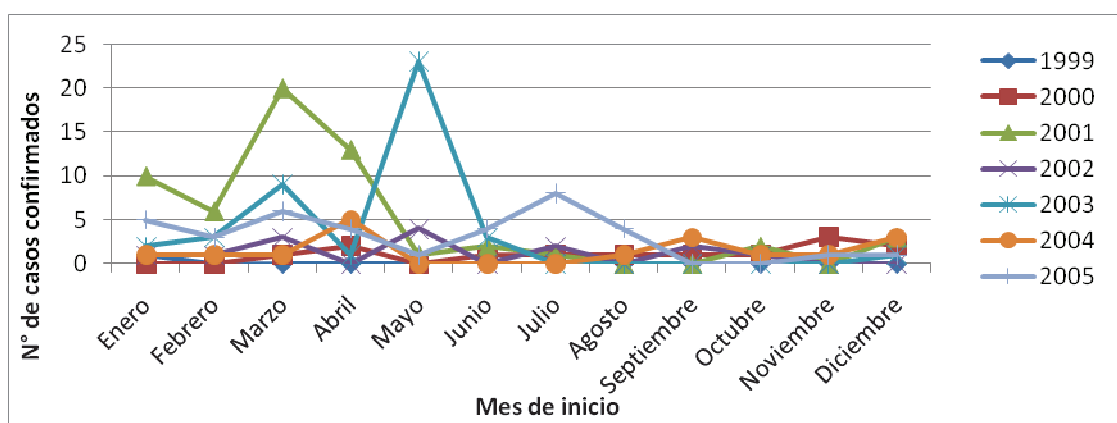


Figura 21. Distribución mensual de los 182 Casos Confirmados de leptospirosis, Argentina (1999-2005).

En el brote detectado en el año 2001 el mayor número de casos se dio durante el otoño (en los meses de marzo y abril), después de un período de fuertes lluvias producidas en enero de ese año. Mientras que, en el brote del año 2003, el

pico de detección sucedió al final del otoño (mayo) luego de grandes inundaciones ocurridas en el mes de abril.

Los 182 casos confirmados provenían de 12 provincias, concentrando la mayoría de los casos las provincias de mayor actividad agrícola, como Santa Fe (32%), Entre Ríos (30%) y Misiones (26%). El resto de los casos fueron registrados en Jujuy (3%), La Pampa (3%), Neuquén (3%) y las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Formosa, Mendoza, Río Negro y Salta (3%) (Figura 22).

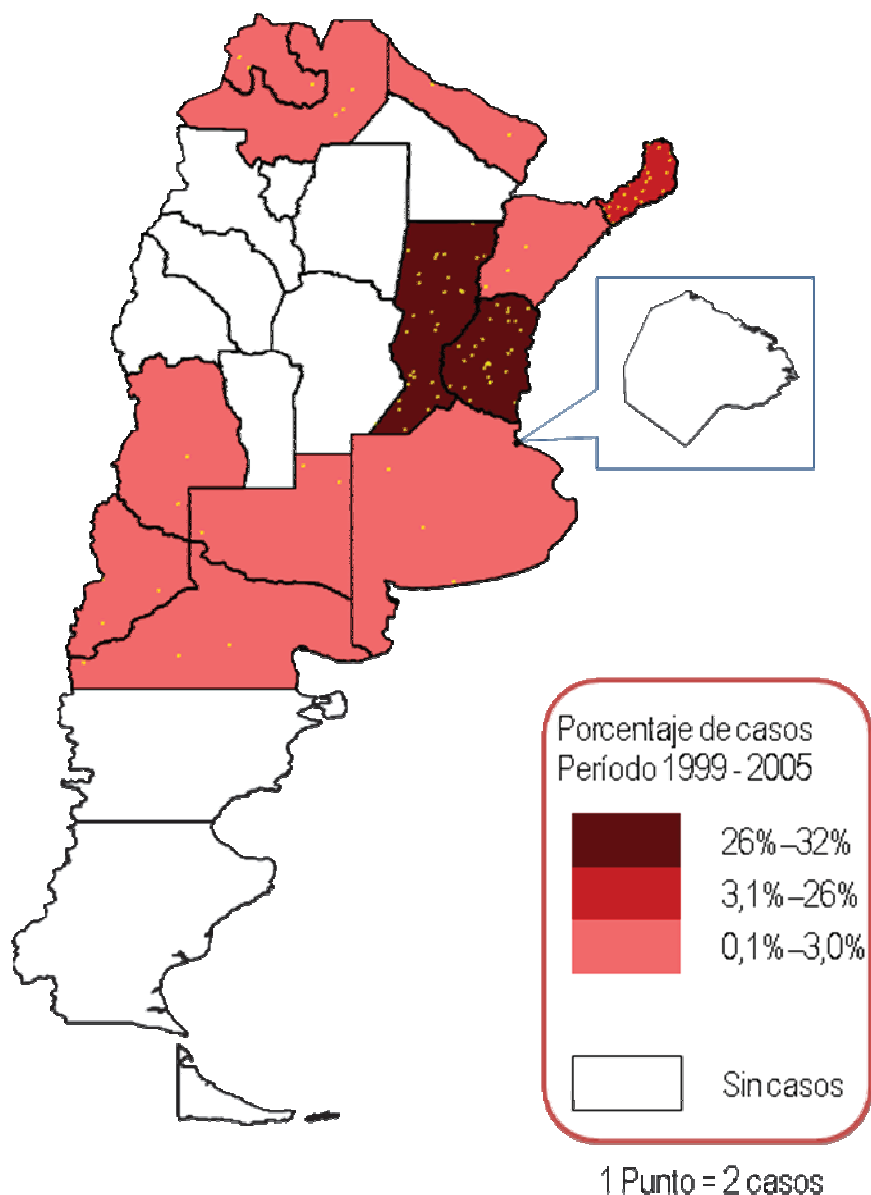


Figura 22. Distribución geográfica de las proporciones de Casos Confirmados de leptospirosis en las 11 provincias argentinas (1999-2005).

2.2. Presentación clínica de los casos de leptospirosis.

Los casos confirmados de leptospirosis fueron predominantemente personas adultas ($32 \pm 16,2$ años) y de sexo masculino (155 de 182 casos, 87%). Estos casos estuvieron más relacionados con la presencia de síntomas inespecíficos como fiebre, mialgias y dolores de cabeza, o complicaciones más severas, que los casos con un diagnóstico descartado (No casos) de leptospirosis ($p < 0,006$).

Mientras que la frecuencia de inyección conjuntival fue mayor en los casos confirmados (55%) que en los casos con un diagnóstico descartado (No casos) (43%) ($p = 0,036$). Contrariamente, los síntomas respiratorios fueron más prevalentes en los casos con el diagnóstico descartado (No casos) (41%) que en los Casos confirmados (22%) ($p = 0,001$) (Tabla 16).

Los casos confirmados también tuvieron mayores valores de bilirrubina sérica y urea en sangre y menores valores de transaminasas durante la fase inicial o presentación de la enfermedad que los No casos ($p < 0,005$) (Tabla 16).

Tabla 16. Presentación clínica y resultados de laboratorio de Casos Confirmados y No casos, Argentina (1999-2005).

<i>Características</i>	<i>Diagnóstico confirmado</i>		<i>Diagnóstico descartado (No casos)</i>		<i>Valor de P</i>
	<i>Nº de respuestas</i>	<i>Nº de Positivos o medias ± DS</i>	<i>Nº de respuestas</i>	<i>Nº de Positivos o medias ± DS</i>	
Resultados clínicos					
<i>Fiebre</i>	139	131 (94.2)	148	108 (73.0)	<0.000
<i>Dolores de cabeza</i>	136	118 (86.8)	143	97 (67.8)	<0.000
<i>Mialgias</i>	134	105 (78.3)	147	93 (63.3)	0.006
<i>Ictericia</i>	134	67 (50.0)	150	51 (34.0)	0.006
<i>Inyección conjuntival</i>	130	71 (54.6)	143	60 (42.9)	0.036
<i>Síntomas respiratorios</i>	125	28 (22.4)	143	59 (41.2)	0.001
<i>Insuficiencia renal</i>	116	52 (44.8)	129	29 (22.5)	<0.000
<i>Hemorragia</i>	109	18 (16.5)	131	16 (12.2)	0.341
<i>Signos meníngeos</i>	123	16 (13.0)	138	16 (11.6)	0.606
Resultados de laboratorio					
<i>Bilirrubina directa sérica (mg/dL)</i>	78	5.2 ± 7.2	67	2.8 ± 3.9	<0.000
<i>Plaquetas (10³/mm³)</i>	63	162 ± 115	77	191 ± 109	0.329
<i>Transaminasa pirúvica - GPT- (UI/L)</i>	96	66.8 ± 80.7	113	147.7 ± 384.6	<0.000
<i>Urea en sangre (g/dL)</i>	100	63.4 ± 304.4	98	25.2 ± 100.5	<0.000

2.3. Factores de riesgo para leptospirosis

Entre los 105 casos confirmados de leptospirosis que incluían información sobre la ocupación de las personas, 74 (70%) ejercían actividades rurales las cuales significaban factores de riesgo para la enfermedad, como trabajo agrícola, (n=42), producción lechera (n= 13), pescadores (n= 9), matarifes (n= 5), criadores de cerdos (n= 3), forestadores/deforestadores (n= 2), apicultores (n= 1) y veterinarios (n=1). El resto de los 31 rubros cuyos casos confirmados no estuvieron relacionados a actividades rurales fueron comercio (n=8), jubilados (n=4), amas de casa (n=4), desempleados (n=3), empleados relacionados a la construcción de viviendas (n=3), choferes de camiones (n=2), docentes (n=1), estudiantes (n=1), enfermeros (n=1), y panaderos (n=1).

El análisis univariado identificó como factores de riesgo para leptospirosis poseer una edad mayor a 30 años, ser de sexo masculino, no residir en centros urbanos, trabajar en ámbitos rurales expuestos a la ganadería, y estar en contacto con aguas superficiales contaminadas e inundaciones antes de la aparición de la enfermedad (Tabla 17).

No se encontraron riesgos estadísticamente significativos asociados a serogrupos presumiblemente infecciosos específicos y la exposición potencial al riesgo. El trabajo en ámbitos rurales fue significativamente correlacionado con el sexo masculino y la exposición a aguas contaminadas y al contacto con el ganado.

En el análisis multivariado, poseer más de 30 años, trabajar en ambientes rurales, y estar en contacto con aguas superficiales contaminadas e inundaciones resultaron factores de riesgo independientes de leptospirosis humana (Tabla 17).

Tabla 17. Factores de riesgo de leptospirosis humana, Argentina (1999-2005).

Variable	Diagnóstico confirmado		Diagnóstico descartado (No Casos)		OD (IC 95%)	
	Nº de respuestas	Nº (%)	Nº de respuestas	Nº (%)	Sin ajustar	Ajustada ¹
Edad > a 30 años	134	103 (77)	158	55 (35)	1.87 (1.17-3.00)	2.16 (1.05-4.41)
Sexo masculino	182	158 (87)	167	115 (69)	2.98 (1.73-5.10)	-
Residencia en centros urbanos	144	72 (50)	155	115 (74)	-2.88 (1.71-4.84)	-
Trabajar en ambientes rurales	105	65 (62)	120	22 (18)	5.91 (3.20-10.90)	3.41 (1.41-8.06)
Exposición a:						
Roedores	107	55 (51)	135	68 (50)	0.96 (0.56-1.65)	-
Perros	106	64 (60)	135	76 (56)	0.85 (0.49-1.47)	-
Ganado	117	61 (52)	135	38 (28)	2.78 (1.65-4.68)	-
Aguas contaminadas	107	80 (75)	136	57 (42)	2.14 (1.23-3.71)	2.17 (1.01-4.68)
Inundaciones	125	34 (27)	147	22 (15)	2.12 (1.16-3.87)	4.49 (1.17-17.25)

¹ Desviación= 189.86; P = 0.066; GL= 162. Los criterios de convergencia se encontraron luego de tres iteraciones.

3. DISCUSIÓN

Este estudio fue una de las primeras evaluaciones de las características clínicas y factores de riesgo para la leptospirosis en humanos en Argentina.

Como fue reportado hace más de treinta años, *Icterohaemorrhagiae* (31.3%) continúa siendo el serogrupo más seroprevalente en seres humanos en Argentina (Cacchione y col., 1980). Este serogrupo fue frecuentemente aislado de ratas (AAVLD, 2002), y uno de los más identificados en perros, caballos, ovejas, cerdos y cabras (Cacchione y col., 1975; Cacchione y col., 1980; AAVLD, 2002). *Pomona* (14,4%) está frecuentemente asociado a cerdos y bovinos (Cacchione y col., 1980; AAVLD, 2002), mientras que ha sido demostrado que *Ballum* (13,7%) puede ser transmitido por roedores urbanos (Vanasco y col., 2000a; Vanasco y col., 2003; Rosetti y col., 2004). Aunque el serovar *Hardjo* (Sejroe serogrupo) es el más prevalente en el ganado, en Argentina este serovar ha sido únicamente aislado de caballos y bovinos sanos (Myers y col., 1975; Myers, 1976; AAVLD, 2002). En este estudio, ocho de los casos confirmados (4,4%) obtuvieron el mayor título MAT contra este serovar. La mayor proporción de casos con título de aglutinación contra múltiples serogrupos o presencia de coaglutinación en la MAT (23,6%) está en concordancia con reportes anteriores (Cacciapuoti, 1976; Yersin y col., 1998; Vanasco y col., 2002).

Se detectó el mayor número de casos durante los meses cálidos y lluviosos, cuando fueron más frecuentes las inundaciones y los brotes de leptospirosis (Vanasco y col., 2000b; AAVLD, 2002; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2004). La única excepción fue un segundo pico observado en el año 2005, el cual estuvo relacionado a un brote rural en la provincia de Entre Ríos. Las diferencias entre el número de casos diagnosticados entre las diferentes provincias pueden estar relacionadas al riesgo de leptospirosis en cada una de ellas, pero también puede deberse a una mayor o menor sospechosa clínica de la leptospirosis, y al diferente acceso y envío de muestras al laboratorio de referencia. Las presentaciones clínicas más comunes incluyeron síntomas no específicos como fiebre, dolores de cabeza, y mialgias, lo que coincidió con resultados previos en Argentina y otros países (Yersin y col., 1998; Ko y col., 1999; Vanasco y col., 2000b; Levett, 2001; Vanasco y col., 2002; Vanasco y col., 2004; Yang y col., 2005).

Se registró una alta proporción de casos de leptospirosis que presentaron complicaciones severas como ictericia, insuficiencia renal aguda y síntomas respiratorios. Esto puede reflejar la tendencia de los médicos a identificar leptospirosis basándose en el reconocimiento de manifestaciones clásicas severas, una observación que es frecuentemente reportada entre sistemas de vigilancia en varias regiones del mundo (Zaki y col., 1996; Yersin y col., 1998; Levett, 2001; Sarkar y col., 2002). A pesar de que la presencia de inyección conjuntival se encuentra muy relacionada a la identificación de casos positivos de leptospirosis, esto fue también reportado en una gran proporción de los casos con un diagnóstico descartado de leptospirosis (43%), indicando que los médicos pueden no identificar correctamente leptospirosis en casos donde se presenta este síntoma.

Este estudio tuvo limitaciones asociadas con el laboratorio nacional de vigilancia (por ejemplo, la determinación pasiva de casos, la remisión de muestras de casos e información a un laboratorio de referencia y la representatividad de los casos identificados), lo que podría introducir sesgos en los resultados hallados. Por otra parte, el número verdadero de casos confirmados podría ser mayor a los 182 casos identificados, ya que no se obtuvieron muestras pareadas de suero en todos los casos y el panel de serovares usado en la evaluación MAT podría no haber incluido todos los serogrupos circulantes.

Las variables como el sexo masculino, no habitar en zonas urbanas y contacto con otros animales de ganado estuvieron fuertemente correlacionadas con el trabajo rural de los casos confirmados de leptospirosis. Esto puede explicar por qué, en el análisis univariado, estas tres variables estuvieron significativamente asociadas al riesgo de contraer leptospirosis, pero no fueron significativas en el modelo de regresión lineal. Mientras que luego de ajustar las tasas el riesgo de enfermar de leptospirosis fue más de 3 y de 4 veces mayor en aquellos individuos que realizaban tareas o trabajos rurales y los que estuvieron expuestos a inundaciones respectivamente. Los pacientes mayores a 30 años de edad en contacto con aguas contaminadas, tuvieron el doble de riesgo de convertirse en un caso confirmado de leptospirosis. En publicaciones previas realizadas durante una epidemia urbana en Brasil (Ko y col., 1999; Sarkar y col.,

2002), se reportaron asociaciones entre la edad y la letalidad de leptospirosis, como también el contacto con agua contaminada y la adquisición de leptospirosis.

4. CONCLUSIONES

- *El serogrupo más reaccionante a la MAT y presumiblemente infectante más frecuente en seres humanos en Argentina continúa siendo Icterohaemorrhagiae (31.3%), seguido de Pomona (15%), Ballum (14%) y Canicola (10%). El mayor número de casos (76%) se detectó durante los meses cálidos y lluviosos (mediados del verano y fines del otoño). La mayoría de los casos se concentraron en las provincias de mayor actividad agrícola, como Santa Fe (32%), Entre Ríos (30%) y Misiones (26%).*

- *Los casos confirmados:*

- *fueron predominantemente personas adultas (32 ± 16,2 años) y de sexo masculino (87%).*

- *estuvieron más relacionados con la presencia de síntomas inespecíficos como fiebre, mialgias y dolores de cabeza, o complicaciones más severas, que los casos con un diagnóstico descartado (No casos) de leptospirosis (p<0,006).*

- *tuvieron mayores valores de bilirrubina sérica y urea en sangre y menores valores de transaminasas durante la fase inicial o presentación de la enfermedad que los No casos (p<0,005).*

- *En el presente estudio se detectó que aunque las actividades asociadas al trabajo rural siguen siendo factores importantes factores de riesgo en Argentina y el contacto prolongado con inundaciones fue el factor de riesgo más importante para la leptospirosis humana.*

5 CONCLUSIONES GENERALES

En base a los tres objetivos generales planteados para esta tesis se presentan las siguientes conclusiones generales que relacionan los principales resultados y conclusiones de cada uno de los capítulos.

En relación al primer objetivo general se desarrollaron cinco ELISAs para la detección de anticuerpos antileptospiras de tipo IgG en muestras de suero humano, empleando los antígenos obtenidos, identificados y seleccionados en este trabajo de tesis. Se eligieron cuatro de ellos para su evaluación en profundidad: el ELISA con antígeno extractivo, dos con sintéticos (P1 y P2) y uno con el recombinante que incluye la secuencia de ambos péptidos (P1 mas P2).

Con respecto al segundo objetivo se evaluó el error sistemático para cada uno de los cuatro ELISAs y la macroaglutinación (TR) en forma global y en tres etapas de la enfermedad. Se evaluó también el error aleatorio o variabilidad (intra-operador) de cada ELISA y la variabilidad (intra e inter-operador) del TR.

El ELISA desarrollado con antígeno extractivo: a) permitió mayor detección de casos que el TR, la MAT y los otros tres ELISAs detectando casos desde el cuarto al último día de la etapa 1; b) en la etapa 2 evidenció mayor sensibilidad, especificidad y AUC ($P < 0,05$) que los otros tres ELISAs; c) en la etapa 3, presentó mayor AUC ($P > 0,05$) que los otros, no obstante su sensibilidad descendió respecto de la etapa anterior, lo que sugiere que a diferencia de la MAT, podría diferenciar infecciones recientes de pasadas; d) en la evaluación global independientemente de las etapas evidenció mayor AUC ($P > 0,05$) que los otros ELISAs e) mostró una concordancia o repetibilidad excelente entre sus resultados, mientras que en los otros tres ELISAs fue moderada. Todos estos hallazgos indican que en el caso de seleccionar un solo antígeno el extractivo sería la mejor opción. Esta prueba de ELISA constituye una nueva herramienta para el diagnóstico de leptospirosis en Argentina y puede contribuir a una detección más oportuna de los casos, un registro más confiable del número de casos y una medida más real del impacto de esta enfermedad en la salud pública en este u otros países.

Las AUCs de los cuatro ELISAs evaluados fueron mayores en las etapas 2 y 3 de la enfermedad, que en la etapa 1 (<10 días de evolución), donde la sensibilidad de todos ellos fue baja. Esto coincide con lo hallado en el meta-análisis que identificó que las pruebas de ELISA presentan mayor eficacia cuando se aplican sobre individuos en fase convaleciente de la enfermedad.

La baja sensibilidad del TR en la primera etapa, la baja especificidad global y en todas las etapas de la enfermedad, sumada a su variabilidad demostrada en este estudio, tanto intra-operador como inter-operador, indicarían que no es aconsejable su utilización como única prueba tamiz para el diagnóstico de leptospirosis. Estos resultados sugieren que es indispensable la pronta incorporación de nuevos métodos diagnósticos para la detección precoz de casos en nuestro país y en aquellos donde aún se aplique éste método.

Por lo expuesto, ningún método serológico sería capaz de resolver individual y completamente el diagnóstico en los primeros 9 días de la enfermedad. En esta primera etapa, la RT-PCR fue el método que permitió la mayor detección de casos, seguido del ELISA extractivo. Estos resultados avalan la conclusión de que un método directo, como la RT-PCR, detecta los casos de leptospirosis de forma más temprana que los métodos serológicos. Se concluye entonces en primer lugar, que RT-PCR sería el mejor método para la detección precoz de casos en muestras de hasta seis días de evolución. Luego una combinación de RT-PCR y ELISA extractivo resolvería el problema del diagnóstico en esta etapa en forma global. Finalmente si las muestras son de entre 6 y 9 días de evolución el ELISA extractivo sería la mejor opción.

El meta-análisis también identificó que los ELISAs presentan mayor eficacia cuando detectan IgM, lo cual sugiere que el desarrollo de pruebas de ELISA IgM podría mejorar su eficacia diagnóstica. Aunque la sensibilidad y especificidad hallada en este estudio para todos los ELISAs IgG evaluados fueron comparables e incluso superiores a las descriptas en la bibliografía para la mayoría los ELISA IgM.

Se concretó también el tercer objetivo general formulado para esta tesis y se evaluó la presentación clínica y epidemiológica de los casos de leptospirosis e identificaron y cuantificaron los principales factores de riesgo

para la adquisición de la enfermedad por primera vez en Argentina.

El serogrupo presumiblemente infectante más frecuente en seres humanos en Argentina continuaría siendo Icterohaemorrhagiae seguido de Pomona, Ballum y Canicola. La mayoría de los casos ocurrieron durante los meses cálidos y lluviosos (verano y otoño). La mayoría de los casos se concentraron en las provincias de mayor actividad agrícola, como Santa Fe, Entre Ríos y Misiones.

Los casos confirmados, predominantemente personas adultas y de sexo masculino, se presentaron con síntomas inespecíficos como fiebre, mialgias y dolores de cabeza. Otras manifestaciones clínicas incluyeron ictericia, insuficiencia renal aguda, síntomas respiratorios y hemorragia. Los Casos confirmados tuvieron mayores valores de bilirrubina sérica y urea en sangre y menores valores de transaminasas durante la fase inicial de la enfermedad que los No casos.

Luego del análisis multivariado, se detectó que ser mayor de 30 años (OR= 2,16; 1,05-4,41), trabajar en ambientes rurales (OR= 3,41; 1,45-8,06), estar en contacto con aguas contaminadas (OR= 2,17; 1,01-4,68) y con inundaciones (OR= 4,49; 1,17-17,25) estuvieron significativamente asociados con leptospirosis.

En conclusión, el presente estudio detectó que, aunque las actividades asociadas al trabajo rural continúan siendo factores de riesgo en este país, el contacto prolongado con inundaciones fue el factor de riesgo más importante para la leptospirosis humana. Por lo tanto, las medidas de prevención y control deberían reorientarse a prevenir la infección en esos dos grupos de riesgo. Además en las áreas y en los períodos donde puedan producirse inundaciones, se debería disponer de métodos para realizar el diagnóstico precoz y permitir el tratamiento oportuno de los pacientes reduciendo así la mortalidad de esta enfermedad.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Acha, P.; Szyfres, B. (1983) Leptospirosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. O.P.S. Washington DC, USA. p. 112-120.
- Adler, B.; Faine, S. (1978) *The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection*. J. Med. Microbiol. 11:387-400.
- Adler, B.; Murphy, S.; Locardini, S.; Faine, S. (1980) *Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. J. Clin. Microbiol. 11:452-457.
- Adler, B.; Faine, S. (1983) *Species and genus-specific antigens in Leptospira, revealed by monoclonal antibodies and enzyme immunoassay*. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A. 255(2-3):317-322.
- Adler, B.; de la Peña Moctezuma, A. (2010) *Leptospira and Leptospirosis*. Vet. Microbiol. 140:287-296.
- Ahmad, S. N.; Shah, S.; Ahmad, F. M. (2005) *Laboratory diagnosis of Leptospirosis*. J. Postgrad. Med. 51(3):195-200.
- Ahmed, N.; Devi, S. M.; Valverde, M. de L.; Vijayachari, P.; Machang'u, R. S.; Ellis, W. A.; Hartskeerl, R. A. (2006) *Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species*. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5:28.
- Alexander, A. D. (1960) *La distribución de la leptospirosis en América Latina*. Bol. Of. San. Panam. 39:149-164.
- AAVLD. (1994) *Manual de Leptospirosis*. Comisión científica permanente sobre leptospirosis. pp. 55.
- AAVLD) (1998) XIIa Reunión Científico Técnica. Mar del Plata. p.116-125.
- AAVLD (Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico) (2002) *Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina*. Comisión Científica sobre Leptospirosis. Serie Enfermedades Transmisibles. Ed. Fundación Mundo Sano. pp.36.
- Atherton, E.; Sheppard, R. (1989) *Solid Phase peptide synthesis: A practical approach (The Practical Approach series)*. IRL. Oxford, UK. pp.203.
- Aviat, F.; Rochereau-Roulet, S.; Branger, C.; Estavoyer, J. M.; Chatrenet, B.; Orsonneau, J. L.; Thorin, C.; Andre-Fontaine, G. (2010) *Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis*. Comp. Immunol. Microbiol. 33(5):375-387.
- Babudieri, B. (1958) *Animal reservoirs of leptospire*. Annals of the New York Academy of Sciences. 70:393-413.

- Bajani, M. D.; Ashford, D. A.; Bragg, S. L.; Woods, C. W.; Aye, T.; Spiegel, R. A.; Plikaytis, B. A.; Perkins, M. P.; Levett, P. N.; Robbin S.; Weyant, R. W. (2003) *Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 41(2):803-809.
- Bal, A. E.; Gravekamp, C.; Hartskeerl, R. A.; De Meza-Brewster, J.; Korver, H.; Terpstra, W. J. (1994) *Detection of Leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 32(8):1894-1898.
- Banfi, E.; Cinco, M.; Delia, S.; Castagnari, L.; Vullo, V.; Mastroianni, C. M.; Contini, C. (1984) *New trends in the rapid serodiagnosis of Leptospirosis*. Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. A. 257(4):503-507.
- Bharti, A. R.; Nally, J. E.; Ricaldi, J. N.; Matthias, M. A.; Diaz, M. M.; Lovett, M. A.; Levett, P. N.; Gilman, R. H.; Willig, M. R.; Gotuzzo, E.; Vinetz, J. M. (2003) *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Lancet. Infect. Dis. 3:757-771.
- Blacksell, S. D.; Smythe, L.; Phetsouvanh, R.; Dohnt, M.; Hartskeerl, R.; Symonds, M.; Slack, A.; Vongsouvath, M.; Davong, V.; Lattana, O.; Phongmany, S.; Keolouangkot, V.; White, N. J.; Day, N. P. J.; Newton, P. N. (2006) *Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of Leptospira immunoglobulin M antibodies in Laos*. Clin. Vaccine. Immunol. 13(10):1166-1169.
- Blanco, R. M.; Takei, K.; Romero, E. C. (2009) *Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human Leptospirosis*. Lett. Appl. Microbiol. 49(2):267-273.
- Bolin, C. A.; Koellner, P. (1988) *Human-to-human transmission of Leptospira interrogans by milk*. J. Infect. Dis. 158(1):246-247.
- Bomfim, M. R.; Ko, A.; Koury, M. C. (2005) *Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine Leptospirosis*. Vet. Microbiol. 109(1-2):89-94.
- Bragger, J. M.; Adler, B. (1976) *A card test for the serodiagnosis of human Leptospirosis*. J. Clin. Pathol. 29(3):198-202.
- Brandao, A. P.; Camargo, E. D.; da Silva, E. D.; Silva, M. V.; Abrao, R. V. (1998) *Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human Leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 36(11):3138-3142.
- Branger, C.; Chatrenet, B.; Gauvrit, A.; Aviat, F.; Aubert, A.; Bach, J. M.; André-Fontaine, G. (2005) *Protection against Leptospira interrogans sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1*. Infect. Immun. 73(7):4062-4069.

- Brenner, D. J.; Kaufmann, A. F.; Sulzer, K. R.; Steigerwalt, A. G.; Rogers, F. C.; Weyant R. S. (1999) *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*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49(2):839-858.
- Cacchione, R.; Bulgini, M.; Castelli, E.; Martinez, E.; Vidal, J. (1961) *Aislamiento de una cepa de Leptospira de un ovino en la República Argentina*. Revista de Investigaciones Ganaderas. 11:39-40
- Cacchione, R. A. (1973) *Enfoques de los estudios de las Leptospirosis humana y animal en América Latina*. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 5:36-53.
- Cacchione, R.; Castelli, M.; Martinez, E. (1975) *Encuesta serológica sobre Leptospirosis humana en Argentina*. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 7:21-27.
- Cacchione, R.; Castelli, E.; Saraví, M. A.; Martinez, E. (1980) *Difusión e importancia de la Leptospirosis animal y humana en la Argentina*. Med. Vet. 61:236-245.
- Cacciapuoti, B. (1976). *Co-antibodies in human Leptospirosis*. Boll. Ist. Sieroter. Milanese. 55: 495-509.
- Canale-Parola, E (1977) *Physiology and evolution of Spirochetes*. Bacteriol. Rev. 41(1):181-204.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1997) *Outbreak of Leptospirosis among white-water rafters--Costa Rica, 1996*. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 46:577-579.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1998) *Update: Leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons--Illinois and Wisconsin, 1998*. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 47(32):673-6.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2001) *Update: outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000--Borneo, Malaysia, 2000*. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 50(2):21-24.
- Cerqueira, G. M.; Picardeau, M. (2009) *A century of Leptospira strain typing*. Infect. Genet. Evol. 9(5):760-768.
- Cerqueira, G. M.; McBride, A. J.; Hartskeerl, R. A.; Ahmed, N.; Dellagostin, O. A.; Eslabão, M. R.; Nascimento, A. L. (2010) *Bioinformatics describes novel Loci for high resolution discrimination of Leptospira isolates*. PLoS One. 5(10):e15335.
- Céspedes, M.; Glenny, M.; Vidal, F. A.; Balda, L.; Suárez, V. (2002). *Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana*. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica. 19(1):1-6.
- Chappel, R. J.; Goris, M.; Palmer, M. F.; Hartskeerl, R. A. (2004) *Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of Leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 42(12):5484-5488.

- Collins, R. A. (2006) *Leptospirosis*. *The Biomedical Scientist*. 50:116-121.
- Connell F. A., Koepsell T.D. (1985) *Measures of gain in certainty from a diagnostic test*. *Am. J. Epidemiol.* 121(5):744-53.
- Cullen, P. A.; Cordwell, S. J.; Bulach, D. M.; Haake, D. A.; Adler, B. (2002) *Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrogans serovar Lai*. *Infect. Immun.* 70(5):2311-2318.
- Cullen, P. A.; Haake, D. A.; Adler, B. (2004) *Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes*. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(3):291-318.
- Cullen, P. A.; Xu, X.; Matsunaga, J.; Sanchez, Y.; Ko, A. I.; Haake, D. A.; Adler, B. (2005) *Surfaceome of Leptospira spp.* *Infect. Immun.* 73(8):4853-4863.
- Cumberland, P.; Everard, C. O. R.; Levett, P. N. (1999) *Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute Leptospirosis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(5):731-734.
- Cumberland, P.; Everard, C. O. R.; Wheeler, J. G., Levett, P. N. (2001) *Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989*. *Eur. J. Epidemiol.* 17(7):601-608.
- Da Silva, M. V.; Nakamura, P. M.; Camargo, E. D.; Batista, L.; Vaz, A. J.; Romero, E. C.; Brandao, A. P. (1997) *Immunodiagnosis of human Leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(6):650-655.
- De Abreu Fonseca, C.; Teixeira de Freitas, V. L.; Romero, E. C.; Spinosa, C.; Arroyo Sanches, M. C.; Da Silva, M. V.; Shikanai-Yasuda, M. A. (2006) *Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human Leptospirosis*. *Trop. Med. Int. Health.* 11(11):1699-1707.
- Dey, S.; Mohan, C. M.; Kumar, T. M.; Ramadass, P.; Nainar, A. M.; Nachimuthu, K. (2004) *Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine Leptospirosis*. *Vet. Microbiol.* 103(1-2):99-106.
- Dey, S.; Mohan, C. M.; Ramadass, P.; Nachimuthu, K. (2008) *Diagnosis of Leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA*. *Indian. J. Med. Res.* 128:172-177.
- Easton, A. (1999) *Leptospirosis in Philippine floods*. *Br. Med. J.* 319:212.
- Effler, P. V.; Bogard, A. K.; Domen, H. Y.; Katz, A. R.; Higa, H. Y.; Sasaki, D. M. (2002) *Evaluation of eight rapid screening tests for acute Leptospirosis in Hawaii*. *J. Clin. Microbiol.* 40(4):1464-1469.
- Ellinghausen, H. C.; McCullough W. G. (1965) *Nutrition of Leptospira pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80*. *Am. J. Vet. Res.* 26:45-51.

- Fainboim, L.; Geffner, J. (2011) *Capítulo 17: Respuesta inmunitaria frente a las infecciones parasitarias*. En: *Introducción a la inmunología humana*. 6^{ta} Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. pp.584.
- Faine, S. (1982) *Guidelines for the control of Leptospirosis*. World Health Organization (WHO Offset Publ. No.67). Geneva, Italia. pp.161.
- Faine, S. (1994) *Leptospira and Leptospirosis. Edición ilustrada*. Boca Raton / CRC Press. London, UK. pp.354.
- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P.; (1999) *Leptospira and Leptospirosis 2nd Ed.* MedSci. Melbourne, Australia. pp.272.
- Faisal, S. M.; Yan, W. W.; Chen, C. S.; Palaniappan, R. U.; McDonough, S. P.; Chang, Y. (2008) *Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters*. *Vaccine*. 26(2):277-287.
- Faria Filho, D. E.; Torres, K. A. A.; Faria, D. E.; Campos, D. M. B.; Rosa, P. S. (2006) *Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis*. *Braz. J. Poultry Sci.* 8(2):89-98.
- Farr, R. W. (1995) *Leptospirosis*. *Clin. Infect. Dis.* 21:1-8.
- Flannery, B.; Costa, D.; Pinheiro Carbalho, F.; Guerreiro, H.; Matsunaga, J.; Da Silva, E. D.; Gomes Pinto Ferreira, A.; Riley, L. W.; Reis, M. G.; Haake, D. A.; Ko, A. I. (2001) *Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of Leptospirosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39(9):3303-3310.
- Flores, L. L.; Madhukar, P.; Colford, J. M.; Riley, L. W. (2005) *In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression*. *BMC Microbiol.* 5:55-64.
- Frank, R. (1992) *Spot-Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support*. *Tetrahedron*. 48(42):9217-9232.
- Frank, R.; Overwin, H. (1996) *SPOT-synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes*. En: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 66. Epitope Mapping Protocols. (Morris, G. E.). Humana Press. Totowa. 149-169.
- Gouveia, E. L.; Metcalfe, J.; Carvalho, L. A.; Aires, T. S. F.; Villasboas-Bisneto, J.; Queiroz, A.; Santos, A.; Salgado, K.; Reis, M. G.; Ko, A. (2008) *Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil*. *Emerg. Infect. Dis.* 14(3):505-508.

- Gravekamp, C.; Van de Kemp, H.; Franzen, M.; Carrington, D.; Schoone, G. J.; Van Eys, G. J.; Everard, C. O.; Hartskeerl, R. A.; Terpstra, W. J. (1993) *Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers*. J. Gen. Microbiol. 139(8):1691-700.
- Guerreiro, H.; Croda, J.; Flannery, B.; Mazel, M.; Matsunaga, J.; Galvao Reis, M.; Levett, P. N.; Ko, A. I.; Haake, D. A. (2001) *Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to Leptospirosis in humans*. Infect. Immun. 69(8):4958-4968.
- Grune, S.; Scialfa, E.; Rago, V.; Romero, G.; Auteri, C.; Samartino, L.; Brihuela, B. (2011) *Study of Leptospirosis in Argentina*. VII Reunión de la Sociedad Internacional de Leptospirosis. Merida, Yucatán, México, 19 al 22 de Septiembre de 2011. M8
- Guidugli, F.; Castro, A. A.; Atallah, A. N. (2000) *Antibiotics for treating Leptospirosis*. Cochrane Database Syst. Rev. (2):CD001306.
- Haake, D. A. (2000a) *Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis*. Microbiology. 146:1491-1504.
- Haake, D. A.; Chao, G.; Zuerner, R. L.; Barnett, J. K.; Barnett, D.; Mazel, M.; Matsunaga, J.; Levett, P. N.; Bolin, C. A. (2000b) *The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection*. Infect. Immun. 68(4):2276-2285.
- Haake, D. A.; Dundoo, M.; Cader, R.; Kubak, B. M.; Hartskeerl, R. A.; Sejvar, J. J.; Ashford, A. (2002) *Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis*. Clin. Infect. Dis. 34(9):40-43.
- Hanley, J. A.; McNeil, B. J. (1982) *The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve*. Radiology. 143(1):29-36.
- Hartskeerl, R. A.; Terpstra, W. J.; (1996) *Leptospirosis in wild animals*. Vet. Quart. 18(3):149-150.
- Hartskeerl, R. A.; Collares-Pereira, M.; Ellis, W. A. (2011) *Emergence, control and re-emerging Leptospirosis: dynamics of infection in the changing world*. Clin. Microbiol. Infect. 17(4):494-501.
- Hauk, P.; Macedo, F.; Romero, E. C.; Vasconcellos, S. A.; de Moraes, Z. M.; Barbosa, A. S.; Ho, P. L. (2008) *In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin*. Infect. Immun. 76(6):2642-2650.
- Herrmann, J. L.; Bellenger, E.; Perolat, P.; Baranton, G.; Saint Girons, I. (1992) *Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification*. J. Clin. Microbiol. 30(7):1696-1702.
- Higgins, J. P. T.; Thompson, S. G.; (2002) *Quantifying heterogeneity in a meta-analysis*. Stat. Med. 21(11):1539-1558.

- Hoke, D. E.; Egan, S.; Cullen, P. A.; Adler, B. (2008) *LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of Leptospira spp. and Pseudoalteromonas tunicata*. Infect. Immun. 76(5):2063-2069.
- Holt, S. C. (1978) *Anatomy and chemistry of spirochetes*. Microbiol. Rev. 42(1):114-160.
- Honarmand, H.; Tabalvandi, M. N.; Heidarzadeh, A.; Soltani, B.; Mirzajani, E.; Asmar, M. (2008) *Evaluation an in-house IgM-ELISA for the diagnosis of human Leptospirosis*. J. Semnan University of Medical Sciences, 9(4):309-314.
- Hui, S. L.; Walter, S. D. (1980) *Estimating the error rates of diagnostic tests*. Biometrics. 36:167-171.
- International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae* (2008) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:1049-1050.
- Jayaraman, K. S. (1998) *India urged to act against Leptospirosis*. Nature. 392(6671):4.
- John, T. J. (2005) *The prevention and control of human Leptospirosis*. J. Postgrad. Med. 51(3):205-9.
- Johnson, R. C.; Harris, V. G. (1967) *Differentiation of pathogenic and saprophytic letospirees. I. Growth at low temperatures*. J. Bacteriol. 94(1):27-31.
- Kmety, E.; Dikken, H. (1993) *Classification of the species Leptospira interrogans and history of its serovars*. Univ. Press. Groningen. Netherlands. pp.104.
- Ko, A. I.; Galvao Reis, M.; Ribeiro Dourado, C. M.; Johnson, W. D. Jr; Riley, L. W. (1999) *Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group*. Lancet. 354(9181):820-852.
- Kobayashi, Y. (2001) *Clinical observation and treatment of Leptospirosis*. J. Infect. Chemother. 7(2):59-68.
- Kobayashi, Y. (2005) *Human Leptospirosis: Management and Prognosis*. J. Postgrad. Med. 51(3):201-204.
- Koizumi, N.; Watanabe, H. (2005) *Leptospirosis vaccines: past, present, and future*. J. Postgrad. Med. 51(3):210-214.
- Landis, J. R.; Koch, G. G. (1977) *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics. 33(1):159-174.
- Lau, C.; Smythe, L.; Weinstein, P. (2010) *Leptospirosis: an emerging disease in travellers*. Travel. Med. Infect. Dis. 8(1):33-39.
- Lean, I. J.; Rabiee, A. R.; Duffield, T. F.; Dohoo, I. R. (2009) *Use of meta-analysis in animal health and reproduction: Methods and applications*. J. Dairy. Sci. 92(8):3545-3565.

- Lesley, A.; Brugg, T.; Louw, N. (1984) *Addition of rabbit serum to EMJH medium improves isolation of Leptospira interrogans serovar Hardjo*. Onderstepoort J. Vet. Res. 52(1):53-54.
- Levett, P. N. (2001) *Leptospirosis*. Clin. Microbiol. Rev. 14(2):296-326.
- Levett, P. N.; Branch, S. L. (2002) *Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute Leptospirosis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66(6):745-748.
- Levett, P.N. (2003) *Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe Leptospirosis*. Clin. Infect. Dis. 36(4):447-452.
- Levett, P. N.; Morey, R. E.; Galloway, R.; Steigerwalt, A. G.; Ellis, W. A. (2005) *Reclassification of Leptospira parva Hovind-Hougen et al. 1982 as Turneriella parva gen. nov., comb. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55(4):1497-1499.
- Levett, P. N.; Morey, R. E.; Galloway, R. L.; Steigerwalt, A. G. (2006) *Leptospira broomii sp. nov., isolated from humans with Leptospirosis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56(3):671-673.
- Levett, P. N. (2007) *Sequence-based typing of Leptospira: epidemiology in the genomic era*. PLoS Negl. Trop. Dis. 1(2):e120.
- Lin, X.; Chen, Y.; Yan, J. (2008a) *Recombinant multiepitope protein for diagnosis of Leptospirosis*. Clin. Vaccine Immunol. 15(11):1711-1714.
- Lin, X.; Pan, J.; Lou, Y.; Mao, Y.; Li, L.; Yan, J. (2008b). *Prediction and immunologic identification of antigenic epitopes in genus-specific outer membrane protein LipL41 of Leptospira interrogans*. Chin. J. Microbiol. Immunol. 28, 343-347.
- Lottersberger, J.; Pauli, R.; Vanasco, N. B. (2002) *Development and validation of an ELISA for diagnosis of bovine Leptospirosis*. Arch. Med. Vet. 34(1): 89-95.
- Lottersberger, J.; Salvetti, J. L.; Beltramini, L. M.; Tonarelli, G. (2004). *Antibody recognition of synthetic peptides mimicking immunodominant regions of HIV-1 p24 and p17 proteins*. Revista Argentina de Microbiología. 36:151-157.
- Lupidi, R.; Cinco, M.; Balinzin, D.; Delprete, E.; Varaldo, P. E. (1991) *Serological follow-up of patients in a localized outbreak of Leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 29(4):805-809.
- Maciel, E. A.; de Carvalho, A. L.; Nascimento, S. F.; de Matos, R. B.; Gouveia, E. L.; Reis, M. G.; Ko, A. I. (2008) *Household transmission of Leptospira infection in urban slum communities*. PLoS Negl. Trop. Dis. 2(1):e154.
- Mailloux, M.; Mazzonelli, J.; Mazzonelli, G. D. (1974) *Thermoresistant antigen in Leptospira. Possibility of a macroscopic diagnosis of Leptospirosis with a single antigen*. Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A. 229(2):238-241.

- Majed, Z.; Bellenger, E.; Postic, D.; Pourcel, C.; Baranton, G.; Picardeau, M. (2005) *Identification of variable-number tandem-repeat loci in Leptospira interrogans sensu stricto*. J. Clin. Microbiol. 43(2):539-545.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA. pp.545.
- Martinez, R.; Obregon, A. M.; Perez, A.; Baly, A.; Díaz, M.; Baró, M.; Menendez, R.; Ruiz, A.; Sierra, G.; Urbino, A. (1998) *Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la Leptospirosis humana*. Rev. Cubana Med. Trop. 50(2):159-166.
- Martinez, R.; Perez, A.; Baro, M.; Alvarez, A. M.; Menendez, J.; Díaz, J.; Cruz de La Paz, R.; de los Reyes, G.; Montoya, B.; Sierra, G.; Armesto Del Río, M.; Saltarén, A.; Sabournin, M. (2000) *Evaluación de la efectividad de una nueva vacuna contra la Leptospirosis humana en grupos en riesgo*. Rev. Panam. Salud Pública. 8(6):385-392.
- Martinez, R.; Perez, A.; Quiñones, M. del C.; Cruz, R.; Álvarez, A.; Armesto, M.; Fernández, C.; Menéndez, J.; Rodríguez, I.; Baró, M.; Díaz, M.; Rodríguez, J.; Sierra, G.; Obregón, A. M.; Toledo, M. E.; Fernández, N. (2004) *Eficacia y seguridad de una vacuna contra la Leptospirosis humana en Cuba*. Rev. Panam. Salud Pública. 15(4):149-255.
- Mazzonelli, J.; Mazzonelli, G. D.; Mailloux, M. (1974) *Antigene thermoresistant chez les Leptospire*. Ann. Microbiol. 125A:125-126.
- McBride, A. J.; Athanazio, D. A.; Reis, M. G.; Ko, A. I. (2005). *Leptospirosis*. Curr. Opin. Infect. Dis. 18(5):376-386.
- McBride, A. J.; Santos, B. L.; Queiroz, A. (2007) *Evaluation of four whole-cell Leptospira-based serological tests for diagnosis of urban Leptospirosis*. Clin. Vaccine Immunol. 14(9):1245-1248.
- Meites, E.; Jay, M. T.; Deresinski, S.; Shieh, W. J.; Zaki, S. R.; Tompkins, L.; Smith, D. S. (2004) *Reemerging Leptospirosis, California*. Emerg. Infect. Dis. 10(3):406-412.
- Merien, F.; Baranton, G.; Perolat, P. (1995) *Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of Leptospirosis*. J. Infect. Dis. 172(1):281-285.
- Meslin, F. X. (1997) *Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective*. Emerg. Infect. Dis. 3(2):223-228.
- Metz, C. E. (1978) *Basic principles of ROC analysis*. Semin. Nucl. Med. 8(4):283-298.
- Morey, R. E.; Galloway, R. L.; Bragg, S. L.; Steigerwalt, A. G.; Mayer, L. W.; Levett, P. N. (2006) *Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing*. J. Clin. Microbiol. 44(10):3510-3516.

- Myers, D. M.; Jelambi, F. (1975) *Isolation and identification of Leptospira hardjo from cattle in Argentina*. Trop. Geogr. Med. 27(1):63-70.
- Myers, D. M. (1976) *Serological studies and isolations of serotype hardjo and Leptospira biflexa strains from horses of Argentina*. J. Clin. Microbiol. 3(6):548-555.
- Nakaran, J.; Pradutkanchana, S. (2004) *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect hemagglutination assay for detection of leptospiral antibody by using three different antigens*. J. Med. Assoc. Thai., 87(10):1218-1224.
- Nalam, K.; Ahmed, A.; Devi, S. M.; Francalacci, P.; Baig, M.; Sechi, L. A.; Hartskeerl, R. A.; Ahmed, N. (2010) *Genetic affinities within a large global collection of pathogenic Leptospira: implications for strain identification and molecular epidemiology*. PLoS One. 5(8):e12637.
- Nascimento, A. L.; Verjovski-Almeida, S.; Van Sluys, M. A.; Monteiro-Vitorello, C. B.; Camargo, L. E.; Digiampietri, L. A.; Harstkeerl, R. A.; Ho, P. L.; Marques, M. V.; Oliveira, M. C.; Setubal, J. C.; Haake, D. A.; Martins, E. A. L. (2004) *Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni*. Braz. J. Med. Biol. Res. 37(4):459-477.
- Natarajaseenivasan, K.; Vijayachari, P.; Sugunan, A. P.; Sharma, S.; Sehgal, S. C. (2004) *Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human Leptospirosis*. Indian. J. Med. Res. 120:151-159.
- Neves, F. O.; Abreu, P. A.; Vasconcellos, S. A.; de Moraes, Z. M.; Romero, E. C.; Nascimento, A. L. (2007) *Identification of a novel potential antigen for early phase serodiagnosis of Leptospirosis*. Arch. Microbiol. 188(5):523-532.
- Ooteman, M.; Ravara Vago, A.; Cota Koury, M. (2006). *Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human Leptospirosis*. J. Microbiol. Methods. 65(2):247-257.
- OPS (1997) *Manual para el control de las Enfermedades Transmisibles*. Organización Panamericana de la Salud. Pub. científica 564, 16va Ed. Washington, DC. USA. pp 294-297.
- Perani, V.; Farina, C.; Maggi, L.; Michetti, G.; Moiola, F.; Pizzocaro, P.; Pugliese, C. (1998) *Pneumonia due to Leptospira spp.: results of an epidemiological and clinical study*. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2(9):766-770.
- Perez, J.; Goarant, C. (2010) *Rapid Leptospira identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia*. BMC Microbiol. 10:325.
- Perolat, P.; Chappel, R. J.; Adler, B.; Baranton, G.; Bulach, D. M.; Billingham, M. L.; Letocart, M.; Merien, F.; Serrano, M. S. (1998) *Leptospira fainei sp. nov., isolated from pigs in Australia*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48(3):851- 858.
- Plank, R.; Dean, D. (2000) *Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans*. Microbes Infect. 2(10):1265-1276.

- Pol, S.; Bharadwaj, R. (2009) *Evaluation of high performance liquid chromatography purified leptospiral antigen for the diagnosis of Leptospirosis*. Jpn. J. Infect. Dis. 62(6):428-431.
- Polanco, J.; Aguirre, L.; Marcano, E.; Pantoja, A. (1997) *Diagnóstico de la Leptospirosis humana mediante el uso de la técnica DOT-ELISA*. Vet. Trop. 22(1): 65-75.
- Qiu, X. F.; Xu, H. F.; Guo, Z. Q.; Wang, J.; Yan, J. (2008) *Establishment and application of ELISAs based on rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of Leptospira interrogans*. Zhejiang Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban. 37(6):592-598.
- Ramadass, P.; Jarvis, B. D.; Corner, R. J.; Penny, D.; Marshall, R. B. (1992) *Genetic characterization of pathogenic Leptospira species by DNA hybridization*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42(2):215-219.
- Regalado Segui, J. D.; López Acosta, C.; Pedroso Peña, P.; Ramos Pérez, L. R. (1990) *Estudio serológico de pacientes con Leptospirosis mediante el antígeno TR*. Rev. Cuba Med. Trop. 42(2):208-18.
- Ribeiro, M. A.; Souza, C. C.; Almeida, S. H. P. (1995) *Dot-ELISA for human Leptospirosis employing immunodominant antigen*. J. Trop. Med. Hyg. 98(6):452-456.
- Ribeiro, M. A.; Brandao, A. P.; Romero, E. C. (1996) *Evaluation of diagnostic test for human Leptospirosis*. Braz. J. Med. Biol. Res. 29(6):773-777.
- Rossetti, C. A.; Vanasco, B. N.; Pini, N.; Carfagnini, J. C. (2004) *Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*)*. Pesq. Vet. Bras. 24(1):6-10.
- Sanders, E. J.; Rigua-Perez, J. G.; Smits, H. L.; Deseda, C. C.; Vorndam, V. A.; Aye, T.; Spiegel, R. A.; Weyant, R. S.; Bragg, S. L. (1999) *Increase in Leptospirosis in dengue-negative patients, after a hurricane in Puerto Rico, 1996 [correction of 1966]*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(3):399-404.
- Sarkar, U.; Nascimento, S. F.; Barbosa, R.; Martins, R.; Nuevo, H.; Kalafanos, I.; Grunstein, I.; Flannery, B.; Dias, J.; Riley, L. W.; Reis, M. G.; Ko, A. I. (2002) *Population-based case-control investigation of risk factors for Leptospirosis during an urban epidemic*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66(5):605-610.
- Schoonjans, F.; Zalata, A.; Depuydt, C. E.; Comhaire F. H. (1995) *Med-Calc: a new computer program for medical statistics*. Computer Methods and Programs in Biomedicine. 48(3):257-262.
- Sehgal, S C. (1996) *Human Leptospirosis—an emerging public health problem in India*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 10:477-478.
- Sehgal, S. C.; Vijiyachari, P.; Murhekar, M. V.; Sugunan, A. P.; Sharma, S.; Singh, S. S. (1999) *Leptospiral infection among primitive tribes of Andaman and Nicobar Islands*. Epidemiol. Infect. 122(3):423-428.

- Sehgal, S. C.; Vijayachari, P.; Sugunan, A. P.; Umapathi, T. (2003) *Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of Leptospirosis*. J. Med. Microbiol. 52(10):897-901.
- Seijo, A. C.; Mazzonelli, J. (1993) *Evaluación del antígeno termorresistente en el diagnóstico de la Leptospirosis humana*. Acta Bioq. Clín. Lat. 27(4):487-491.
- Sekhar, W. Y.; Soo, E. H.; Gopalakrishnan, V.; Devi, S. (2000) *Leptospirosis in Kuala Lumpur and the comparative evaluation of two rapid commercial diagnostic kits against the MAT test for the detection of antibodies to Leptospira interrogans*. Singapor Med. J. 41(8):370-375.
- Silva, M. V.; Camargo, E. D.; Vaz, A. J.; Carbalho de Souza, A. M.; Ueda, M.; Sakata, E. E. (1988) *Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgM na leptospirose humana*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 30:95-100.
- Silva, M. V.; Camargo, E. D. (1992) *Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgA na leptospirose humana*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 34(3):239-242.
- Slack, A. T.; Symonds, M. L.; Dohnt, M. F.; Smythe, L. D. (2006) *The epidemiology of leptospirosis and the emergence of Leptospira borgpetersenii serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004*. Epidemiol. Infect. 134:1217-1225.
- Slack, A. T.; Kalambaheti, T.; Symonds, M. L.; Dohnt, M. F.; Galloway, R. L.; Steigerwalt, A. G.; Chaicumpa, W.; Bunyaraksyotin, G.; Craig, S.; Harrower, B. J.; Smythe, L. D. (2008) *Leptospira wolffii sp. nov., isolated from a human with suspected Leptospirosis in Thailand*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58(10):2305-2308.
- Slack, A. T.; Khairani-Bejo, S.; Symonds, M. L.; Dohnt, M. F.; Galloway, R. L.; Steigerwalt, A. G.; Bahaman, A. R.; Craig, S.; Harrower, B. J.; Smythe, L. D. (2009) *Leptospira kmetyi sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(4):705-708.
- Smits, H. L.; Van Der Hoorn, M. A.; y Goris, M. G. (2000a) *Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human Leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 38(3):1272-1275.
- Smits, H. L.; Hartskeerl, R. A.; Terpstra, W.J. (2000b) *International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human Leptospirosis*. Trop. Med. Int. Health. 5(2):124-128.
- Smits, H. L.; Chee, H. D., Eapen, C. K.; Kuriakose, M.; Sugathan, S.; Hussein Gasem, M.; Yersin, C.; Sakasi, D.; Lai-a-Fat, R. F. M.; Hartskeerl, R. A.; Liesdek, B.; Abdoel, T. H.; Goris, M. G. A.; Gussenhoven, G. X. (2001a) *Latex based, rapid and easy assay for human Leptospirosis in a single test format*. Trop. Med. Int. Health. 6(2):114-118.

- Smits, H. L.; Chee, H. D.; Eapen, C. K.; Sugathan, S.; Kuriakose, M.; Hussein Gasem, M.; Yersin, C.; Sakasi, D.; Pujianto, B.; Vesterling, M.; Abdoel, T. H.; Gussenhoven, G. X. (2001b) *Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human Leptospirosis*. Clin. Diag. Lab. Immunol. 8(1):166-169.
- Sistema Nacional de vigilancia en Salud. Ministerio de Salud, Argentina (SNVS). (2011) Disponible en: www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/boletines-online/se-48
- Soutullo, A.; Santi, M. N.; Perin, J. C.; Beltramini, L. M.; Borel, I. M.; Frank, R.; Tonarelli, G. G. (2007) *Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein*. J. Mol. Recognit. 20(4):227-237.
- Srimanote, P.; Wongdeethai, N.; Jieanampunkul, P.; Samonkiert, S.; Leepiyasakulchai, C.; Kalambaheti, T.; Prachayasittikul, V. (2008) *Recombinant ligA for Leptospirosis diagnosis and ligA among the Leptospira spp. clinical isolates*. J. Microbiol. Meth., 72(1):73-81.
- Staneck, J. L.; Henneberry, R. C.; Cox, C. D. (1973) *Growth requirements of pathogenic Leptospira*. Infect. Immun. 7(6):886-897.
- Stoddard, R. A.; Gee, J. E.; Wilkins, P. P.; Mccaustland, K.; Hoffmaster, A. R. (2009) *Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64(3):247-255.
- Suarez, H. M.; Martinez, S. R.; Posada, F. P. E.; Vidal, G. I.; Bravo, F. F.; Sanchez, S. A. (1999) *Brotos de Leptospirosis humana en la provincia de Ciego de Avila, Cuba*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32(1):13-18.
- Sulzer, C. R.; Glosser, J. W.; Jones, W. L.; Frix, M. (1975) *Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human Leptospirosis*. J. Clin. Microbiol. 2(3):218-221.
- Suputtamongkol, Y.; Niwattayakul, K.; Suttinont, C.; Losuwanaluk, K.; Limpai boon, R.; Chierakul, W.; Wuthiekanun, V.; Triengrim, S.; Chenchittikul, M.; White, N. J. (2004) *An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe Leptospirosis*. Clin. Infect. Dis. 39(10):1417-1424.
- Suputtamongkol, Y.; Pongtavornpinyo, W.; Lubell, Y.; Suttinont, C.; Hoontrakul, S.; Phimda, K.; Losuwanaluk, K.; Suwancharoen, D.; Silpasakorn, S.; Chierakul, W.; Day, N. (2010) *Strategies for diagnosis and treatment of suspected Leptospirosis: a cost-benefit analysis*. PLoS Negl. Trop. Dis. 4(2):e610.
- Surujballi, O.; Mallory, M. (2004) *An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple Leptospira serovars*. Can. J. Vet. Res. 68(1):1-6.

- Szklo, M.; Nieto, J. (2003) *Epidemiología intermedia y aplicaciones*. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España. pp.464.
- Tahiliani, P.; Kumar, M. M.; Chandu, D.; Kumar, A.; Nagaraj, C.; Nandi, D. (2005) *Gel purified LipL32: a prospective antigen for detection of Leptospirosis*. J. Postgrad. Med. 51(3):164-168.
- Tangkanakul, W.; Kingnate, D. (1998) *Leptospirosis epidemic in north-eastern provinces of Thailand, 1997*. Health Sci. 7:386-395.
- Tangkanakul, W.; Smits, H. L.; Jatanasen, S.; Ashford, D. A. (2005) *Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 36(2):281-288.
- Tansuphasiri, U.; Deepradit, S.; Phulsuksombati, D.; Tangkanakul, W. (2005) *Two simple immunoassays using endemic leptospiral antigens for serodiagnosis of human Leptospirosis*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 36(2):302-311.
- Tarabla, H. (2000) *Epidemiología diagnóstica*. Ediciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. pp.120.
- Terpstra, W. J.; Ligthart, G. S.; Schoone, G. J. (1980) *Serodiagnosis of human Leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)*. Zentralbl. Bakteriol. A. 247(3):400-405.
- Thaipadungpanit, J.; Wuthiekanun, V.; Chierakul, W.; Smythe, L. D.; Petkanchanapong, W.; Limpiboon, R.; Apiwatanaporn, A.; Slack, A. T.; Suputtamongkol, Y.; White, N. J.; Feil, E. J.; Day, N. P. J.; Peacock, S. J (2007) *A dominant clone of Leptospira interrogans associated with an outbreak of human Leptospirosis in thailand*. PLoS Negl. Trop. Dis. 1(1):e56.
- Tijssen, P. (1985) *Practice and theory of enzyme immunoassays*. (Burdon, R. H.; Van Knippenberg, P. H.). Elsevier Science. Pub. BV Amsterdam, The Netherlands. pp 549.
- Tonarelli, G.; Lottersberger, J.; Salvetti, J. L.; Jacchieri, S.; Silva-Lucca, R. A.; Beltramini, L.M. (2000) *Secondary structure-improved bioaffinity correlation in elongated and modified synthetic epitope peptides from p24 HIV-1 core protein*. Letters in Peptide Science. 7(4):217-224.
- Trevejo, R. T.; Rigua-Perez, J. G.; Ashford, D. A.; McClure, E. M.; Jarquin-Gonzalez, C.; Amador, J. J.; de los Reyes, J. O.; Gonzales, A.; Nasci, R. S.; Weyant, R. S.; Bolin, C. A.; Bragg, S. L.; Perkins, B. A.; Spiegel, R. A. (1998) *Epidemic Leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage—Nicaragua, 1995*. J. Infect. Dis. 178(5):1457-1463.

- Tungtrakanpoung, R.; Pitaksajakul, P.; Na-Ngarm, N.; Chaicumpa, W.; Ekpo, P.; Saengjaruk, P.; Froman, G.; Ramasoota, P. (2006) *Mimotope of Leptospira from phage-displayed random peptide library is reactive with both monoclonal antibodies and patients' sera*. Vet. Mic. 115(1-3):54-63.
- Turner, L. H. (1968) *Leptospirosis II: Serology*. Trans. R. Trop. Med. Hyg. 62(6):880-899.
- Vanasco, N. B.; Rossetti C.; Sequeira, G.; Sequeira, M.; Calderón, G.; Tarabla H. (2000a) *First isolations of leptospire serogroup Ballum serovar arborea in Argentina*. Vet. Rec. 147:246-247.
- Vanasco, N. B.; Sequeira, G.; Dalla Fontana, M. L.; Fusco, S.; Sequeira, M. D.; Enría, D. (2000b) *Descripción de un brote de Leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998*. Rev. Panam. Salud Publica. 7(1):35-40.
- Vanasco, N. B.; Lottersberger, J.; Sequeira, M.; Tarabla, H. (2001) *Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents*. Vet. Mic. 82(4):321-330.
- Vanasco, N. B.; Fusco, S.; Zanuttini, J. C.; Dalla Fontana, L.; Manattini, S.; Prez, J.; Cerrano, D.; Sequeira, M. D. (2002) *Brote de Leptospirosis humana luego de una inundación. Reconquista (Santa Fe), 1998*. Rev. Arg. Microbiol. 34(3):124-131.
- Vanasco, N. B.; Sequeira, M. D.; Sequeira, G.; Tarabla, H. D. (2003) *Associations between Leptospirosis in rodents, reservoir and environmental characteristics*. Prev. Vet. Med. 60(3):227-235.
- Vanasco, N. B.; Kemerer, R.; Oliva, M. E. (2004) *Brote de Leptospirosis rural en un tambo de la provincia de Entre Ríos, Argentina, febrero-marzo 2003*. Salud (i) Ciencia. 12(4):26-31.
- Venkataraman, K.; Nedunchellian, S. (1992) *Epidemiology of an outbreak of Leptospirosis in man and dog*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 15(4):243-247.
- Vijayachari, P.; Sugunan, A. P.; Shriram, A. N. (2008) *Leptospirosis: an emerging global public health problem*. J. Biosci. 33(4):557-569.
- Vinetz, J. M.; Glass, G. E.; Flexner, C. E.; Mueller, P.; Kaslow, D. C. (1996) *Sporadic urban Leptospirosis*. Ann. Intern. Med. 125(10):794-798.
- Vinetz, J. M. (2001). *Leptospirosis*. Curr. Opin. Infect. Dis. 14:527-538.
- Vitale, G.; La Russa, C.; Galioto, A.; Chifari, N.; Mocciaro, C.; Caruso, R.; Micalizzi, A.; Mansueto, P.; Di Rosa, S.; Mansueto, S. (2004) *Evaluation of an IgM-ELISA test for the diagnosis of human Leptospirosis*. New Microbiol. 27(2):149-154.

- Vivian, J. P.; Beddoe, T.; McAlister, A. D.; Wilce, M. C.; Zaker-Tabrizi, L.; Troy, S.; Byres, E.; Hoke, D. E.; Cullen, P. A.; Lo, M.; Murray, G. L.; Adler, B.; Rossjohn, J. (2009) *Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic Leptospira spp.* J. Mol. Biol. 387(5):1229-1238.
- Waitkins, S. A. (1986) *Leptospirosis as an occupational disease.* Br. J. Ind. Med. 43(11):721-725.
- Wang, Z.; Jin, L.; Wegrzyn, A. (2007). *Leptospirosis vaccines.* Microbial Cell Factories. 6:39
- Wanyangu, S. W.; Palmer, M. F.; Zochowski, W. J.; Waitkins, S. A. (1987) *Comparison of the DIFCO and Patoc 1 slide antigen in the screening of Leptospirosis.* Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 10(2):155-161.
- Welling, G. W.; Weijer, W. J.; Van Der Zee, R.; Welling-Wester S. (1985) *Prediction of sequential antigenic regions in proteins.* FEBS 188(2):215-218.
- Wiwanitkit, V. (2007) *Predicted epitopes of Lig A of Leptospira interrogans by bioinformatics method: A clue for further vaccine development.* Vaccine. 25(15):2768-2770.
- WHO (1999) *Leptospirosis worldwide, 1999.* Wkly. Epidemiol. Rec. 74(29):237-242.
- WHO (World Health Organization) (2000) *Weekly Epidemiological Record.* 27(75):217-224.
- WHO-ILS (2003) *Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control.* NLM classification: WC 420. Malta. pp.109.
- Yan, Y.; Chen, Y.; Liou, W.; Ding, J.; Chen, J.; Zhang, J.; Zhou, W.; Ghao; Ye X. y Xiao Y. (2003) *An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to Leptospira.* J. Chin. Med. Assoc. 66:224-230.
- Yang, H. Y.; Hsu, P. Y.; Pan, M. J.; Wu, M. S.; Lee, C. H.; Yu, C. C.; Hung, C. C.; Yang, C. W. (2005) *Clinical distinction and evaluation of Leptospirosis in Taiwan - A case-control study.* J. Nephrol. 18(1):45-53.
- Yasuda, B. H.; Steigerwalt, A. G.; Sulzer, K. R.; Kaufmann, A. F.; Rogers, F.; Brenner, D. J. (1987) *Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven serogroups new Leptospira species.* Int. J. Syst. Bacteriol. 37(4):407-415.
- Yersin, C.; Bovet, P.; Merien, F.; Wong, T.; Panowsky, J.; Perolat, P. (1998) *Human Leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study.* Am. J. Trop. Med. Hyg. 59(6):933-940.
- Yersin, C.; Bovet, P.; Smits, H. L.; Perolat, P. (1999) *Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human Leptospirosis in the Seychelles.* Trop. Med. Int. Health. 4(1):38-45.

- Zaki, S. R.; Shieh, W. J. (1996) *Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua.* Lancet. 347(9000):535-536.
- Zamora, J.; Abraira, V.; Muriel, A.; Khan, K.; Coomarasamy, A. (2006) *Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data.* BMC Med. Res. Methodol. 6:31-42.
- Zhang, X. Y.; Yu, Y.; He, P.; Zhang, Y. X.; Hu, B. Y.; Yang, Y.; Nie, Y. X.; Jiang, X. G.; Zhao, G. P.; Guo, X. K. (2005) *Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospire.* Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai). 37(10):649-656.
- Zochowski, W. J.; Palmer, M. F.; Coleman, T. J. (2001) *An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK.* J. Clin. Pathol. 54(1):25-30.
- Zuerner, R. L.; Knudtson, W.; Bolin, C. A.; Trueba, G. (1991) *Characterization of outer membrane and secreted proteins of Leptospira interrogans serovar Pomona.* Microb. Pathog. 10(4):311-322.
- Zuerner, R. L.; Bolin, C. A. (1997) *Differentiation of Leptospira interrogans isolates by IS1500 hybridization and PCR assays.* J. Clin. Microbiol., 35(10):2612-2617.
- Zunino, M. E.; Pizarro, P. R. (2007) *Leptospirosis. Puesta al día.* Rev. Chilena Infectol. 24(3):220-226.
- Zweig, M. H.; Campbell, G. (1993) *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine.* Clin. Chem. 39(4):561-577.