

Artículo original

Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico

Marta Noelia Cardona E*, Rosalba María Moros V, Eneida Aurora López L, José Luis Pérez C, Roberto Carlos Hernández

*Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Ministerio del Poder Popular para la Salud
Caracas - Venezuela*

Recibido 31 de agosto de 2007; aceptado 25 de enero de 2008

Resumen: El objetivo del estudio fue evaluar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la leptospirosis humana, utilizando dos pares de iniciadores específicos para las leptospirosis patógenas. Se examinaron por la prueba serológica MAT y la PCR muestras de orina y suero de 73 pacientes con SFIH y epidemiología compatible con leptospirosis. Muestras de 10 pacientes (55,5%) con diagnóstico confirmado de leptospirosis por MAT resultaron positivas por PCR. El 28% de los sueros de pacientes clasificados por serología como casos no confirmados resultó PCR positivo, lo que demuestra el valor de la PCR en el diagnóstico temprano de la leptospirosis humana. La comparación de los resultados de PCR en muestras de orina y suero determinó una mayor sensibilidad de esta técnica en muestras de orina. Considerando las diferentes fases de la leptospirosis en el análisis de los resultados de la PCR, se demostró la utilidad de las muestras de orina en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Se concluye que la PCR es un método sensible y específico que aplicado en muestras clínicas y de manera complementaria a las pruebas serológicas sirve para detectar casos de leptospirosis, especialmente en pacientes graves en los que es necesario hacer diagnóstico diferencial.

Palabras claves: Diagnóstico, leptospirosis, PCR

PCR leptospirosis diagnosis in patients with icteric haemorrhagic fever syndrome

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the usefulness of PCR for the diagnosis of human leptospirosis using two pairs of specific pathogenic *Leptospira* initiators. Urine and serum samples from 73 patients with icteric haemorrhagic fever syndrome (IHFS) epidemiologically compatible for leptospirosis were examined by the MAT serologic test and by PCR. Ten (55.5%) samples from patients with MAT confirmed leptospirosis were also PCR positive. Sera from 28% of patients classified as non serologically confirmed cases were PCR positive, which shows the importance of PCR for the early diagnosis of human leptospirosis. A comparison of the PCR results in urine and serum samples determined the greater sensibility of this technique in urine samples. The usefulness of urine samples for the early diagnosis of leptospirosis was demonstrated by considering the different leptospirosis phases in the analysis of the PCR results. It is concluded that PCR is a sensitive and specific method which, applied to clinical samples and as complement to serological tests, is useful to detect leptospirosis cases, especially in patients with severe symptoms, when it is necessary to reach a differential diagnosis.

Keywords: Diagnosis, leptospirosis, PCR

* Correspondencia:
E-mail: adrinns@hotmail.com

Introducción

La leptospirosis es una zoonosis de amplia distribución mundial, producida por especies patógenas del género *Leptospira*. En el hombre, la enfermedad exhibe un número variable de signos y síntomas que no son característicos, pudiendo ser confundida con otras patologías dentro de los síndromes febriles icterohemorrágicos (SFIH) tales como paludismo, dengue, hepatitis, influenza, infecciones ric-

kettsiales y fiebres hemorrágicas virales. Este cuadro clínico indefinido puede desembocar en complicaciones letales cuando el paciente no recibe tratamiento por falta de un diagnóstico clínico y de laboratorio.

En Venezuela, la leptospirosis es un importante problema de salud pública, aunque se desconoce la prevalencia real de esta patología. A partir de 1998, con el refuerzo de la vigilancia epidemiológica y control de los SFIH, se ha detectado un mayor número de casos. La enfermedad se

mantuvo en constante ascenso hasta el año 2000 cuando, debido a las inundaciones que desataron la tragedia en el Estado Vargas, se registraron 419 casos, los cuales decrecieron en forma gradual hasta 2004 con 98 casos [1].

Existen diferentes métodos de laboratorio que permiten el diagnóstico serológico de la enfermedad. La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la Microaglutinación con Antígenos Vivos (MAT), que se emplea para detectar anticuerpos anti-leptospira en suero [2]. Esta prueba es altamente específica, no obstante, presenta una sensibilidad limitada en la fase aguda, debido a que los anticuerpos son detectables alrededor de los 7-10 días de la aparición de los síntomas y en general se requiere una segunda muestra de suero para confirmar el caso, lo que retarda el diagnóstico y el tratamiento.

En las dos últimas décadas pruebas rápidas para la detección de anticuerpos en infecciones agudas han sido desarrolladas y evaluadas; entre ellas, el Antígeno Termorresistente, el ensayo ELISA, el Dipstick y el Dri dot [3-6] son las más empleadas. Sin embargo, estas pruebas pueden presentar reacciones cruzadas [7,5]; por lo que es necesaria la confirmación de casos mediante la MAT. El método convencional de aislamiento por cultivo requiere tiempo y no siempre es exitoso, puesto que las leptospiras son de muy lento crecimiento y éste se restringe por una inadecuada toma de la muestra, el tratamiento con antibióticos suministrado al paciente, exposición a la luz y/o pH adverso y contaminaciones por bacterias y hongos.

El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospiras en muestras clínicas. Los métodos basados en el ADN tales como la hibridación Dot blot o Southern blot que emplean secuencias específicas como sondas o la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) han permitido la identificación de especies de leptospiras patógenas y no patógenas [8-10], así como el diagnóstico de infecciones agudas [11]. El presente estudio tuvo por objetivo examinar la utilidad de la PCR en la detección de casos de leptospirosis, a partir de muestras clínicas de pacientes con SFIH, comparando los resultados de PCR con los obtenidos por la prueba serológica convencional MAT.

Materiales y Métodos

Cepas de leptospiras

Se usaron veinticinco cepas patógenas y no patógenas de referencia internacional [12-14], cedidas gentilmente por el Royal Tropical Institute de Holanda (KIT), centro colaborador de la OMS (Tabla 1). Las leptospiras se subcultivaron semanalmente a 30°C en medio EMJH al 10% previamente descrito por Jhonson y Harris [15].

Muestras de pacientes

Entre abril 2001- diciembre 2004 se colectaron muestras de suero y orina de 73 pacientes (tres de ellos fallecidos) provenientes de diferentes regiones de Venezuela, a los cuales se les realizó el diagnóstico diferencial entre patologías con manifestaciones clínicas compatibles con los SFIH. Los pacientes presentaron fiebre, cefalea, mialgias, vómito, diarrea, astenia, decaimiento e ictericia, entre los signos y síntomas más frecuentes y datos epidemiológicos que indicaban contacto con aguas estancadas y ambientes contaminados con orina de animales. Se analizaron 73 muestras de orina (38 se colectaron en la fase aguda y 35 en la fase convaleciente) y 90 muestras de suero de los cuales 56 fueron sueros únicos y 34 sueros pareados, esto es, sueros agudos (S1) y de fase convaleciente (S2) tomados con 10-15 días de diferencia, obtenidos de 17 de los 73 pacientes. Muestras de suero y orina de individuos sanos o pacientes que presentaban otras patologías se utilizaron como controles negativos.

Serología

Las muestras de suero de pacientes se analizaron mediante el método de referencia de MAT en la que se emplearon 24 serovares de leptospiras como antígenos vivos (Tabla 1), de acuerdo a lo recomendado por la OMS/OPS [2,16]. Se consideraron casos confirmados de leptospirosis los sueros únicos con título de anticuerpos mayor o igual a 800, así como la demostración de un incremento de 4 veces el título o la seroconversión entre sueros pareados. Las muestras de sueros únicos positivos con títulos entre 200 y 400 se consideraron casos presuntivos o probables mientras que los sueros únicos negativos se consideraron casos no confirmados [17].

Extracción de ADN

El ADN fue extraído mediante el método descrito en Sambrook, 2001 [18] con algunas modificaciones: 100-200µl de suero, o 200 µl de sedimento de orina o cultivo de leptospiras previamente centrifugados 12000 rpm y lavados con PBS, se mezclaron con buffer de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5% tween 20, 1 % SDS, 250µg/ml proteinasa K) y se incubaron a 56°C durante 2 horas. Posteriormente, se llevó a cabo una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) en proporción 1:1 con el volumen de la muestra y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min. El ADN fue precipitado de la fase acuosa con 1/10 de acetato de sodio 4 M y etanol absoluto frío y se incubó a -20°C toda la noche. Después de centrifugar nuevamente a 12000 rpm por 15 min. se descartó el sobrenadante y el sedimento o ADN se dejó secar. Finalmente el ADN se resuspendió en buffer TE (10mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA) y se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso.

Tabla 1. Serovares de *Leptospira sp.* utilizados en este estudio.

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	3294
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
	Australis	Lora	Lora
	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
	Pomona	Pomona	Pomona
	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
	Batavie	Batavie	Swart
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Hardjo	Hardjopradjitno
	Sejroe	Wolfii	3705
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia
	Ballum	Castelloni	Castellon 3
	Mini	Mini	Sari
	Sejroe	Sejroe	M84
	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
<i>L. weillii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
	Gryppotyphosa	Gryppotyphosa	Moskva V
	Autumnalis	Bim	1051
<i>L. biflexa</i>	Semaranga*	Patoc*	Patoc I

*Serovar perteneciente a la especie saprofítica *L. biflexa*. En resto de los serovares se incluye dentro de especies patógenas. El serovar Bim sólo se empleó en las pruebas de PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

En este estudio se analizaron por PCR los ADN extraídos de las muestras de orina, los sueros únicos y los sueros agudos (S1) de pacientes con sueros pareados. Igualmente, se analizaron por PCR los ADN de las cepas de leptospiros usadas como controles. Para las amplificaciones de ADN se utilizaron los juegos de iniciadores G1/G2 y B64I/B64II específicos para las especies patógenas de *Leptospira*. [10]. Las amplificaciones de ADN se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp. Cincuenta microlitros de mezcla de reacción (Tris-HCL 20 mM pH 9.0, KCL 50mM, MgCl₂ 2 mM, dNTP_s 250µM, 50 pmoles de cada iniciador, 1U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5 µl de muestra de ADN), se incubaron inicialmente a 95°C por 10 min. y después se sometieron a 34 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió de una etapa de desnaturalización a 95°C por 1min., una etapa de alineación a 55°C por 1 min. y una etapa de extensión 72°C por 2 min. Un control negativo, mezcla de reacción sin ADN, fue incluido cada vez que se realizaba la PCR para vigilar la introducción de ADN contaminante. Los productos de PCR (8 µl) se revelaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio en buffer TBE 1X. Luego de observar el gel en un transiluminador con UV, una muestra se consideró positiva al revelarse la banda de

285 o 563 pb esperadas con los iniciadores G1/G2 y B64I/B64II, respectivamente.

Análisis de Datos

La sensibilidad y especificidad de la PCR en muestras clínicas se evaluó mediante procedimientos convencionales utilizando tablas de contingencia 2 x 2, considerando la MAT como la prueba de referencia. Los casos de infección reciente definidos por MAT con resultado PCR positivo en orina y/o suero son considerados verdaderos positivos, en tanto que los casos negativos confirmados por la misma prueba serológica con PCR negativo se consideraron verdaderos negativos.

Resultados

Serología

El análisis de los sueros de pacientes con SFIH utilizando la prueba MAT, evidenció una seropositividad promedio a *Leptospira* de 31,5%, (23/73). En este grupo se detectaron 18 (24,7%) casos con infección reciente determinados por los altos títulos de anticuerpos (800 a 51200) contra varios serovares de *Leptospira sp.*, 3 casos probables (4,1%) con títulos entre 200 y 400 y dos casos que correspondieron a infección pasada (2,7%). (Tabla 2). De

los dieciocho casos de infección reciente, 10 se diagnosticaron en muestras de sueros únicos y 8 en sueros pareados. Del total de pacientes con sueros únicos, 43/56 (58,9%) resultaron negativos por la MAT, por lo tanto se consideraron casos no confirmados de leptospirosis.

Los sueros de pacientes positivos por la prueba de referencia MAT presentaron mayor reactividad frente a los serovares *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA, *Icterohaemorrhagiae* cepa 3294, *Copenhageni* cepa M20 y *Autumnalis* cepa Akiyami A.

Tabla 2. Clasificación de los casos clínicos de Leptospirosis según los resultados de la prueba MAT. Venezuela, 2001-2004.

CASO	MAT	N° de Pacientes		TOTAL
	Títulos Anticuerpos	Sueros únicos	Sueros pareados	
Infección reciente	≥ 800	10	8	18 (24,7%)
Probable	200- 400	3	0	3 (4,1%)
Infección pasada	$S2 \leq S1$	0	2	2 (2,7%)
No confirmado	S1 neg	43	0	43 (58,9%)
Negativos	S1 neg.	0	7	7 (9,6%)
confirmados	S2 neg.			
	TOTAL	56	17	73 (100%)

Los títulos de anticuerpos antileptospira ≥ 200 se consideran positivos. El cuadro muestra el rango de los títulos de anticuerpos obtenidos con 24 serovares de *Leptospira*. Los casos se definen dependiendo de los diferentes títulos de anticuerpos.

S1: Primer suero de un paciente.

S2: Segundo suero de un paciente colectado después de 10-15 días de la toma del S1.

Especificidad de la PCR

Con el fin de verificar la especificidad de los iniciadores, se examinaron por PCR los ADN de las cepas de leptospiras patógenas y no patógenas utilizadas como controles (Tabla 1). Al amplificar con los iniciadores G1/G2 se observó una banda de 285 pb en todas las cepas pertenecientes a las especies de leptospiras patógenas, a excepción de las pertenecientes a la especie *L. kirschneri* (serovar *Cynopteri* cepa 3522 C, serovar *Bim* cepa 1051 y serovar *Grippothyphosa* cepa *Moskva V*), las cuales sólo amplificaron con los iniciadores B64I/B64II. El serovar *Patoc* cepa *Patoc I* utilizado como control de cepas no patógenas no amplificó con ninguno de los iniciadores. Todas las muestras de orina y suero de pacientes sanos o con otras patologías utilizadas como controles en el transcurso de este estudio, resultaron negativas.

PCR en muestras clínicas

En el total de muestras analizadas, la PCR detectó ADN de *Leptospira* en el 32,8% (24/73) de las muestras de orina y en el 21,9% (16/73) de los sueros agudos. Todas las muestras de pacientes PCR positivas amplificaron con los iniciadores G1/G2 y no con los iniciadores B64I/B64II (Figura 1). En relación con el total de pacientes positivos por serología, 10 de ellos (43,5%) resultaron PCR positivos en orina y 4 positivos (17,4 %) en sueros.

De los dieciocho casos de leptospirosis clasificados como infección reciente por la prueba MAT, se logró con

firmar diez casos (55,5%) mediante la PCR: 6 casos positivos

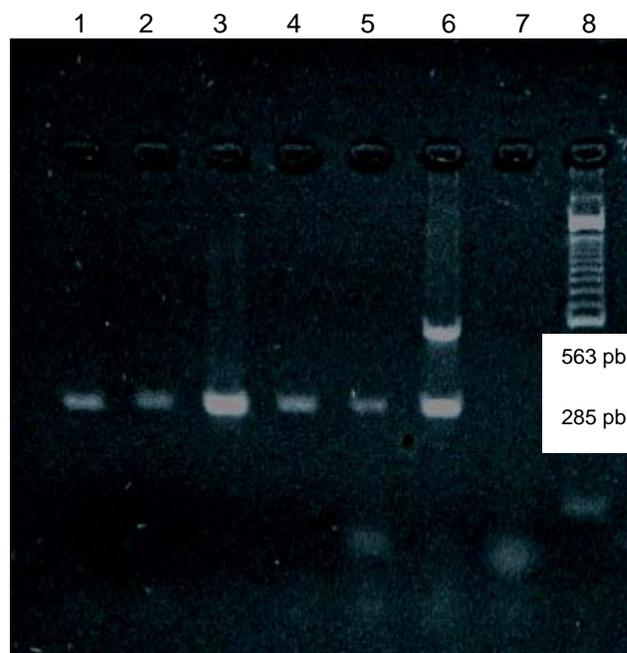


Figura 1. Electroforesis de los productos de amplificación de *Leptospira* sp. empleando los iniciadores específicos G1/G2-B64I/B64II en muestras clínicas. Carriles: 1-5) Muestras de pacientes. 6) Control positivo (ADN extraído de cultivos de leptospiras, serovares *Cynopteri* y *Hebdomadis*). 7) Control negativo (mezcla de reacción sin ADN). 8) ADN 100 bp Ladder.

en orina, 2 casos positivos tanto en orina como en suero y 2 casos positivos sólo en suero, para un total de 12 muestras positivas. Por otra parte, la PCR demostró la presencia de leptospiras en la orina de un paciente considerado caso probable y otro considerado infección pasada.

Tabla 3.

En el total de pacientes examinados se encontraron tres fallecidos. Uno de ellos fue un caso de leptospirosis determinado por serología que luego se confirmó por PCR en una muestra de suero; otro resultó negativo por serología pero mostró un resultado PCR positivo en orina. El tercer

paciente fallecido fue negativo por serología y PCR. Las muestras de los fallecidos que se encontraron positivos por PCR, se tomaron en la fase temprana de la enfermedad.

La sensibilidad de la PCR en suero fue 22% y en orina 44%. En ambos tipos de muestras la especificidad fue 100%. La sensibilidad de la PCR en la detección de casos combinando suero y orina fue 55%. La eficiencia obtenida fue 60% y 44% para muestras de orina y suero, respectivamente. El valor predictivo positivo calculado para los casos no confirmados fue 40% en sueros y 36% en orina.

Tabla 3. Resultados de la PCR en los diferentes casos clínicos de leptospirosis evaluados por la prueba MAT. Venezuela, 2001-2004.

CASO	Nº de Pacientes	PCR positivos		PCR Negativos	
		Orina	Suero	Orina	Suero
Infección Reciente	18	8	4	10	14
Probable	3	1	0	2	3
No confirmado	43	14	12	29	31
Infección Pasada	2	1	0	1	2
Negativo	7	0	0	7	7
TOTAL	73	24	16	49	57

Al analizar por PCR las muestras de orina y suero únicos del grupo de pacientes clasificados como casos no confirmados por la prueba MAT, se logró detectar leptospiras en 32,6% (14/43) de las muestras de orina y en 28% (12/43) de los sueros.

Las muestras de orina y suero se colectaron en diferentes fases de la enfermedad. Quince muestras de orina PCR positivas (62,5%) se colectaron en la fase aguda (aproximadamente de 0-15 días contados a partir del inicio de los

síntomas) y 8 (33,3%) en fase convaleciente. Cuatro casos confirmados por la MAT resultaron PCR positivos en orina tomada durante la fase aguda, en tanto que de los casos no confirmados por esta prueba serológica, 11 resultaron positivos en orina tomada en fase aguda y 3 en orina de pacientes convalecientes. Tabla 4.

Tabla 4. Relación Orina- PCR positivo y Fase de la enfermedad. Venezuela, 2001-2004.

CASOS	Orinas PCR positivas		
	Período de Toma		
	0-15 días	> de 15 días	TOTAL
Casos confirmados	4	4	8
Casos no confirmados	11	3	14
Casos probables	0	1	1

PCR positivos en muestras de orina tomadas a pacientes en diferentes fases de la enfermedad (0-15 días, fase aguda; > 15 días, fase convaleciente) en casos confirmados, no confirmados y probables definidos por MAT. Se observa un mayor número de muestras PCR positivas en la fase aguda.

Discusión

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la habilidad de la PCR para detectar ADN de leptospira en muestras clínicas de pacientes con epidemiología y manifestaciones clínicas compatibles con leptospirosis, comparando

esta técnica con la prueba MAT, utilizada en la confirmación de casos, pues es considerada la prueba "Gold Standard" o de referencia [19, 2].

Han sido descritos diferentes iniciadores para la detección de leptospiras mediante PCR, algunos basados en secuencias génicas específicas, como son los genes 16S y

23S ARNs y otros en elementos repetitivos [9, 11, 20]. En este estudio se utilizaron los iniciadores G1/G2 y B64I/B64II evaluados a nivel clínico y epidemiológico en trabajos previos [21-24]. El dúo G1/G2 amplifica una secuencia específica del gen *secY* de las especies patógenas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weillii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. meyeri*, mientras que B64I/B64II, asociado al gen *flabB*, sólo amplifica cepas pertenecientes a la especie *L. kirschneri*. Por lo tanto, es necesario el uso de ambos dúos para amplificar la mayoría de las especies de leptospiras conocidas.

En este estudio, la PCR con los juegos de iniciadores usados presentó una especificidad de 100% en muestras controles y en muestras clínicas.

La PCR detectó ADN de *Leptospira* en el 21,9% (16/73) del total de sueros agudos examinados. No obstante, fue positiva sólo en 4 de las 18 muestras de sueros de pacientes considerados casos de infección reciente por la prueba MAT, exhibiendo una sensibilidad de 22%. Esta sensibilidad puede ser debida al efecto de agentes inhibidores o a la ausencia de leptospiras en la muestra de suero. En este caso, la ausencia de leptospiras puede relacionarse con una corta leptospiremia y/o al hecho de no coleccionar la muestra de sangre en la fase de la enfermedad más adecuada, como ya señalaron Costa y col. [25]. A diferencia de los casos de infección reciente, la PCR resultó positiva en 12 (28%) muestras de suero de casos no confirmados. Este resultado, en concordancia con el valor predictivo positivo de 40%, indica que la PCR es capaz de detectar leptospiras en sangre antes que los anticuerpos puedan ser detectados por la prueba MAT, lo que afianza la hipótesis que relaciona el período de leptospiremia como la fase de toma más adecuada y el éxito de la PCR en sueros.

La PCR resultó positiva en el 32,8% de las muestras de orina de los 73 pacientes examinados. La eficiencia de la PCR fue mayor en muestras de orina que en suero. Igualmente, la PCR fue más sensible (44%) en muestras de orina al diagnosticar los casos de infección reciente (8 orinas vs 4 sueros) y para definir un caso probable diagnosticado por la MAT como un caso de infección activa o reciente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bal y col. [21] y recientemente por Fonseca y col. [26], los cuales indican que las muestras de orina son frecuentemente más positivas que los sueros en el diagnóstico de la leptospirosis por PCR, pues se ha demostrado que las leptospiras son excretadas desde la fase aguda de la enfermedad y por lo tanto este tipo de muestra puede ser empleada en el diagnóstico a partir de la fase temprana sin esperar la fase convaleciente. A pesar de las ventajas que ofrecen las muestras de orina, es importante considerar dos aspectos: 1) las leptospiras son excretadas intermitentemente en la orina por lo que es necesario coleccionar muestras seriadas de los pacientes, 2) es posible detectar leptospiras en pacientes con infecciones pasadas como se describió en Bal y col. [21] y en este estudio.

Por otra parte, Gravepkamp y col. [10] han asociado una baja tasa de sueros positivos por PCR con la especie de serovar infectante. Ellos observaron que en infecciones severas con serovares aislados pertenecientes al serogrupo

Icterohaemorrhagiae o con el serovar Bim, la PCR era frecuentemente positiva, mientras que en las infecciones producidas por Pomona, Hardjo y Grippotyphosa era frecuentemente negativa. Esto los llevó a sugerir que en pacientes con infecciones leves el número de leptospiras en sangre es bajo y por lo tanto, baja la sensibilidad de la PCR. Nuestras observaciones contrastan con esta hipótesis ya que de los 18 casos de leptospirosis agrupados como infección reciente, nueve presentaron reacción con altos títulos de anticuerpos frente al serogrupo Icterohaemorrhagiae, indicando la alta probabilidad de infección con serovares pertenecientes a este serogrupo; todos estos casos resultaron negativos por PCR en suero, mientras que cinco de ellos resultaron PCR positivos en orina. Nuevamente, esto parece ser un reflejo de la fase de la enfermedad. Al iniciar la fase inmune o convaleciente incrementan de manera significativa los títulos de anticuerpos, los cuales pueden ser detectados por la prueba MAT y simultáneamente se acelera la excreción de las leptospiras del organismo. En consecuencia, se reduce la probabilidad de detección de leptospiras en sangre.

Evaluando el presente protocolo de PCR con ADN extraído de muestras de orina y suero, la PCR pudo confirmar 55,5% de los casos de leptospirosis diagnosticados por la prueba MAT. Se considera este nivel de sensibilidad aceptable en vista de que el mismo puede ser un reflejo de las fases de la enfermedad. Además, se ha empleado un protocolo de PCR convencional sin la necesidad de usar pruebas de hibridación que incrementan la sensibilidad [21, 22].

El valor diagnóstico de la PCR es determinado generalmente por su capacidad para confirmar casos durante la fase aguda de la enfermedad, antes que los anticuerpos sean detectados por las pruebas serológicas. En este estudio, la PCR logró detectar ADN de leptospiras en muestras de suero y orina tomadas en fase aguda, lo que confirma su utilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Esto es importante ya que permite al médico aplicar el tratamiento de antibiótico oportuno, lo que reduce la morbilidad por leptospirosis.

Para lograr un diagnóstico exitoso por PCR es necesario coleccionar la muestra de sangre y/o orina para el examen durante la primera semana del establecimiento de los síntomas y si es posible antes de la terapia con antibióticos. Por esto, es esencial entrenar al personal de salud sobre el reconocimiento de esta patología dentro de los SFIH o con epidemiología compatible para que hagan una toma de muestra en la fase más adecuada. La PCR es una herramienta molecular útil para el diagnóstico de la leptospirosis que sumada a las pruebas serológicas sirve para esclarecer casos de pacientes graves en los que es necesario hacer diagnóstico diferencial. También es de gran utilidad en la dilucidación de brotes y casos de fallecidos que permite implementar medidas de control epidemiológico.

Agradecimiento

A las licenciadas Sofía Toro y Sandra Fernández por el apoyo brindado en la ejecución de este estudio.

Este trabajo fue financiado por las gerencias de Docencia e Investigación y Diagnóstico y Epidemiología del INHRR.

Referencias

- MS_OPS-OMS. Estrategia de cooperación de OPS-OMS con Venezuela 2006-2008. http://www.ops-oms.org.ve/site/pwr/docs/CCS_MS_OPS.pdf. Acceso: 15 de agosto 2007.
- Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization (WHO). Geneva 1982.
- Mazzonelli J, Dorta de Mazzonelli G. Evaluación de los resultados serológicos de ELISA y TR en Leptospirosis humana. Cien Tec Agric. 1987; 9(2): 7-13.
- Terpstra W J, Lighthart GS, Schoone G J. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. J Gen Microbiol. 1985; 13:377-85.
- Levett P N. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 296-326.
- Smits H L, van der Hoorn M A, Goris M G, Gussenhoven G C, Yersin C, Sasaki D M *et al*. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1272-75.
- Winslow W E, Merry D J, Pirc M L, Devine P L. Evaluation of a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol. 1997; 35: 1938-42.
- Van Eys G J J M, Gravekamp C, Gerritsen M J, Quint W, Cornelissen M T E, ter Schegget J and Terpstra W J. Detection of leptospira in urine by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27(10):2258-2262.
- Hookey J V. Detection of *Leptospiraceae* by amplification of 16S ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1992; 69: 267-74.
- Gravekamp C, Van De Kemp H, Franzen M, Carrington, D, Schoone G J, Van Eys G J J M *et al*. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol. 1993; 139:1691-700.
- Merien F, Baranton, G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis. 1995; 172: 281-85.
- Yasuda P H, Steigerwalt A G, Sulzer K R, Kaufmann A F, Rogers F, Brenner D J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol. 1987; 37: 407-15.
- Ramadass P, Jarvis B D W, Corner R J, Penny D, Marshall R B. Genetic characterisation of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42: 215-19.
- Brenner D J, Kaufmann A F, Sulzer K R, Steigerwalt A G, Rogers F C, Weyant R S. 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. 1999; 49: 839-58.
- Johnson R C, Harris V G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. J Bacteriol. 1967; 94:27-31.
- Hartskeerl R A, Smits H L, Korver H, Goris M G, Terpstra W J. International course on laboratory methods for diagnosis of leptospirosis. Royal Tropical Institute, Dept of Biomedical Research. Amsterdam 2001.
- Myers D M. Manual de Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS. Nota técnica N° 30. 1985.
- Sambrook J, D W Russel. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor. Laboratory Press. 2001.
- Sulzer C R, Jonus W L. Leptospirosis. Methods in laboratory diagnosis. US Dept Health. Public Health Service. Center for Disease Control, HEW Publ N° (CDC) 78-8275. Atlanta 1976.
- Barocchi M A, Ko A I, Ferrer S R, Faria M T, Reis M G, Riley L W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira*. J Clin Microbiol. 2001; 39: 191-95.
- Bal A E, Gravekamp C, Hartskeerl R A, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra W J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1894-98.
- Brown P D, Gravekamp C, Carrington D G, Van De Kemp H, Hartskeerl R A, Edwards C N *et al*. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol. 1995; 43:110-14.
- Sugathan S, Varghese T P. Multiplex PCR on leptospiral isolates from Kolenchery, Kerala, India. Indian J Med Microbiol. 2005; 23:114-6.
- Cermakova Z, Pliskova L, Ryskova O. Laboratory diagnosis of leptospirosis. Folia Microbiol. 2005; 50:345-7.
- Costa O M, Ravara V A, Cota K. M. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR for the diagnosis of human leptospirosis. J Microbiol Methods. 2006; 65:247-57.
- Fonseca de A C, Teixeira M M, Romero E C, Tengan F M, Silva M V, Shikanai-Yasuda M A. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. J Infect. 2006; 52: 15-21.