



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

TESIS
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

MANUAL DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
DE

Leptospira interrogans.



PRESENTA:

Janeth Godínez Santos

CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

DIRECTOR DE TESIS

M en C. ROBERTO CRUZ GOZÁLEZ MELÉNDEZ

Opción de titulación: Apoyo a la docencia

MEXICO, D.F.

Diciembre de 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

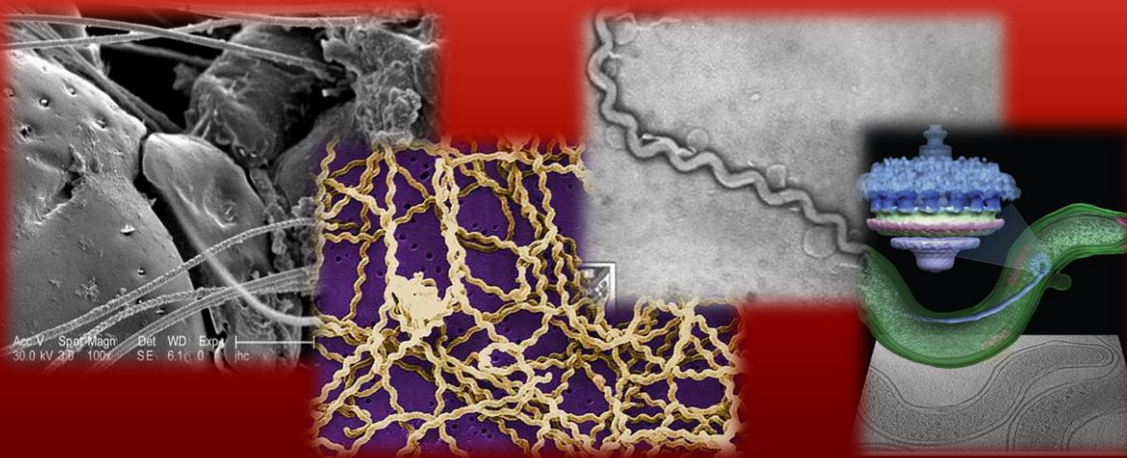


***MANUAL DE
DIAGNÓSTICO
MICROBIOLÓGICO
DE
Leptospira interrogans***

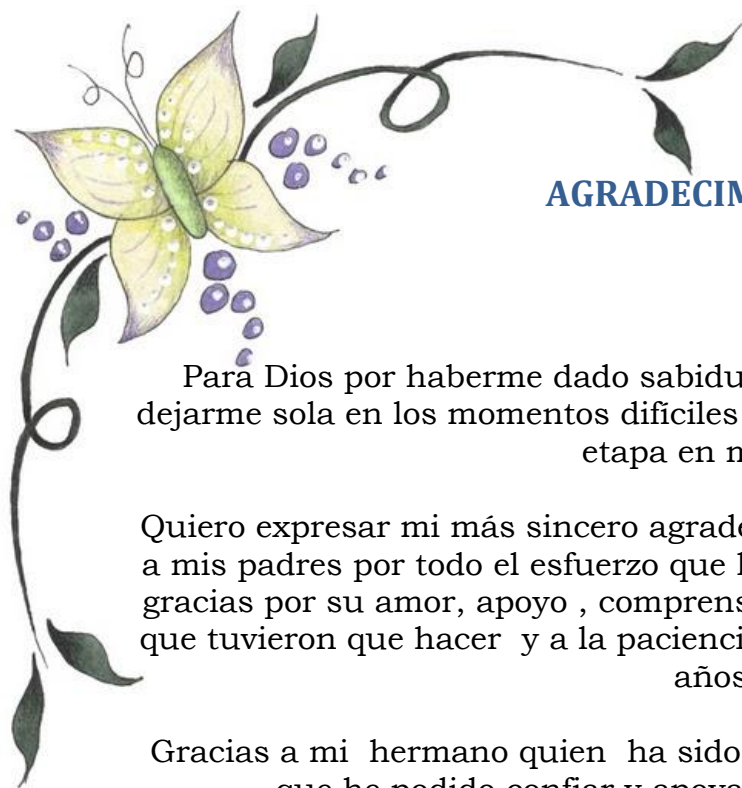
JANETH GODINEZ SANTOS

**Para obtener el
Título de QFB**

**Diciembre de
2013**



CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA



AGRADECIMIENTOS

Para Dios por haberme dado sabiduría, fortaleza, salud, coraje, y no dejarme sola en los momentos difíciles y haberme permitido concluir esta etapa en mi vida.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a mis padres por todo el esfuerzo que hicieron para darme una profesión, gracias por su amor, apoyo, comprensión incondicional, a los sacrificios que tuvieron que hacer y a la paciencia que me demostraron todos estos años.

Gracias a mi hermano quien ha sido mi amigo más fiel y sincero, en el que he podido confiar y apoyarme para seguir adelante.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

Agradezco sinceramente y de todo corazón a mi director de tesis por darme la oportunidad de titularme con uno de sus proyectos y por el gran apoyo y paciencia que me brindó durante la realización de la tesis.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. *Thomas Chalmers*

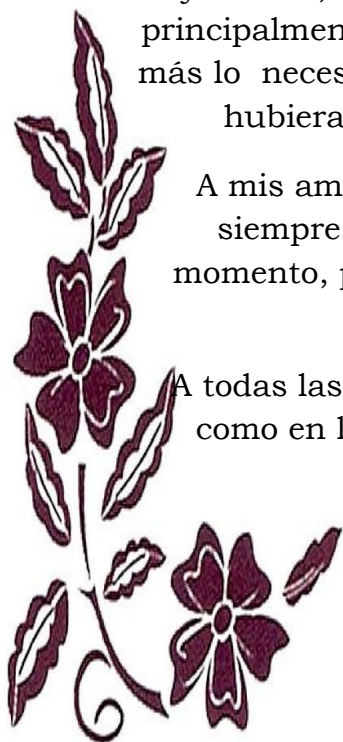
DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a Dios por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan transcendental de mi formación profesional. A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo cuando más lo necesitaba. A mi padre, quien me motivo y no me dejó nunca sola, me ayudó y me sigue ayudando, siempre dándome palabras de aliento. A todas mis tías y tíos principalmente mi tía Catalina y a Horlanda, quienes me apoyaron cuando más lo necesitaba, me brindaron su apoyo incondicional y que sin ellas no hubiera podido concluir este trabajo, gracias por toda su ayuda.

A mis amigos por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuestos a escucharme y ayudarme en cualquier momento, principalmente Selene Berenice, quien estuvo conmigo en la realización de la tesis.

A todas las personas que fueron parte de mi formación tanto en la vida como en lo escolar, les dedico este trabajo que es fruto de su apoyo.

Gracias a todos.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVOS.....	23
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	24
DIAGRAMA DE FLUJO	25
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	158
CONCLUSIONES	160
REFERENCIAS	161

INTRODUCCIÓN

Los cambios climáticos observados durante los últimos años en todo el planeta han repercutido en forma sustancial en la modificación de los nichos ecológicos en que se desarrollan muchas de las enfermedades infecciosas o reemergentes tal es el caso de la leptospirosis humana.¹

Esta enfermedad también es conocida como enfermedad de Weil o ictericia de Weil tiene una distribución geográfica cosmopolita producida por la *Leptospira interrogans*, una bacteria del orden *Spirochaetales*, de la familia *Leptospiraceae*, que afecta a humanos y un amplio rango de animales, incluyendo a mamíferos, aves, anfibios y reptiles por lo que se la considera una zoonosis.²

Es una infección común en las ratas y también en animales domésticos como vacas, caballos, cerdos y perros, aunque los animales infectados no muestren síntomas evidentes durante el análisis clínico, son portadores y transmisores al ser humano ya que son capaces de eliminar las bacterias al ambiente a través de su orina, corriendo el riesgo de enfermar, cuando se tiene contacto con la orina o el excremento y otras secreciones de estos animales. La forma de contagio es a través de las heridas en la piel, y los síntomas son similares al de una gripe con fiebre, dolores de cabeza y de músculos, escalofríos, conjuntivitis, náuseas, vómitos, diarrea.³

Si no se trata a tiempo esta enfermedad puede dañar los riñones, el hígado, causar problemas respiratorios e inflamación de la membrana que cubre el cerebro y la médula espinal.

México no es ajeno a este problema y hoy en día reúne las condiciones geográficas, ambientales y socioeconómicas que propician la ocurrencia de estos brotes.

En este sentido, el análisis de la información generadas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Institucional Mexicana ha demostrado en algunas regiones un incremento de notificaciones de pacientes inicialmente diagnosticados con dengue que resultan negativos a las pruebas confirmatorias para esta infección, quienes al ser estudiados, en algunos casos, resultan positivos a *Leptospira*.⁴

El propósito de este manual fue de dar información de integral de la bacteria *Leptospira interrogans* para un correcto diagnóstico ante un posible sospecha de contagio. Debido al polimorfismo clínico característico de esta bacteria es difícil sospechar de Leptospirosis, haciendo de esta enfermedad una gran simuladora con otras enfermedades tales como el dengue, fiebre hemorrágica por dengue, hepatitis, fiebre tifoidea, tuberculosis y neumonía.

La similitud con que se presenta la enfermedad en su fase inicial ha propiciado dificultades en el nivel operativo para el Diagnóstico Clínico oportuno, afectando de los enfermos, así como para su notificación y clasificación ya que los médicos desconocen la enfermedad o no se realizan pruebas para la detección del microorganismo.

Por tal motivo es de vital importancia realizar un documento donde se establezca la información pertinente sobre este microorganismo, así como su correcta identificación y epidemiología.

Muchos médicos y servidores de la Salud mantienen la creencia de que es una

enfermedad sólo de animales y no, también infecta a humanos, otro problema observado es el desconocimiento de que los perros frecuentemente son portadores sanos de esta enfermedad.

El propósito de este manual fue apoyar el área de bioquímica clínica y contribuir a la formación de los alumnos que cursan Microbiología Médica de la carrera de QFB de la FES Zaragoza, también al personal interesado en el tema y áreas afines, a través del cual, se pretende proporcionar una herramienta que sirva como material de consulta y apoyo práctico.

MARCO TEÓRICO

La leptospira fue primariamente descrita por Weil en 1886, aunque recién en 1907 Stimson pudo visualizar el microorganismo en un corte de tejido renal de un paciente fallecido durante una epidemia de fiebre amarilla y en 1915 el agente fue cultivado y aislado por los japoneses Inada e Ido, al que denominaron *Spirochaeta icterohemorrhagiae*.⁵

En 1962 la subcomisión de Taxonomía de las leptospiras de la Organización Mundial de la Salud acordó dividir a estas bacterias en dos especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa*, basándose en su comportamiento bioquímico, en la capacidad de infectar animales, resistencia a la acción de los iones de cobre bivalentes, en sus características biológicas y en las exigencias de cultivo.

ETIOLOGÍA

El agente etiológico de la leptospirosis pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*, que comprende dos especies:

- a) *Leptospira interrogans*
Bacteria patógena para los animales y el hombre, siendo esta la de más importancia médica.
- b) *Leptospira biflexa*
Es una bacteria de vida libre.

La bacteria *Leptospira interrogans* se divide en más de 210 serovares y 23 serogrupos de acuerdo con las aglutininas compartidas.⁶ Esta clasificación tiene importancia epidemiológica ya que el cuadro clínico y en general la virulencia no se relaciona con el serovar.^{5,6}

La unidad de agrupación taxonómica es el serovar o serotipo. Los serovares son agrupados por sus afinidades antigénicas.⁷

Las principales serovariedades universales son

-  *L. icterohaemorrhagiae*
-  *L. canicola*
-  *L. Pomona*
-  *L. ballum*
-  *L. bataviae*
-  *L. grippotyphosa*
-  *L. pyrogenes*
-  *L. autumnalis*
-  *L. australis*
-  *L. hyos*
-  *L. minigeorgia*
-  *L. hebdomadis*

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

- Es una bacteria muy fina, de 6 a 20 μm de largo y 0,1 a 0,2 μm de ancho.
- Flexible
- Es helicoidal (como se observa en la figura 1)
- Tiene extremidades incurvadas en forma de gancho.
- Extraordinariamente móvil.
- Aerobia estricta
- Se cultiva con facilidad en medios artificiales.

Todas son muy sensibles a la desecación, al calor y frío excesivo así como a las variaciones del pH no tolerando el medio ácido, el pH óptimo para su multiplicación es 7.2- a 7.4. En el agua salada no sobreviven, al contrario de los largos períodos que pueden permanecer en el agua dulce principalmente si se encuentra almacenada (es hasta 180 días).

En la leche las leptospiras no sobreviven salvo que esté diluída en agua a la razón de 1:20 o más.⁷

En el frío puede sobrevivir hasta 100 días a -20°C . Es importante mencionar que la pasteurización no destruye a las leptospiras lo que indica que es necesaria la ebullición para cumplir con su destrucción. A los 10 segundos muere con 100°C y solo a los 10 minutos si la temperatura es de 56°C .

La orina ácida es letal para las leptospiras y por eso es necesario alcalinizarla si se pretende aislarla de la orina de un enfermo. En el medio ácido pierde su motilidad tan rápido como en 15 minutos.⁷



Figura 1. *Leptospira interrogans*

EPIDEMIOLOGÍA

La Leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial, tanto en zonas urbanas y rurales, excepto en las regiones polares. Se presenta con más frecuencia en los países de clima subtropical o tropical húmedo.⁸

Tiene una alta prevalencia en países donde existen grandes precipitaciones pluviales y el suelo es neutro o alcalino y donde existe alta población de roedores peridomiciliarios. En países de clima templado tiende a ser un problema más bien de tipo ocupacional para trabajadores de arrozales y campos de caña de azúcar, granjeros, mineros, trabajadores de alcantarillados, empleados de mataderos, criadores de animales y médicos veterinarios. Representa también un peligro para bañistas, deportistas y personas que acampan en zonas infectadas.⁸

Es una enfermedad que ataca con mayor frecuencia a los hombres por razón de su oficio. Las edades de mayor incidencia están entre los 15 y los 40 años. En la transmisión tiene importancia las mascotas, especialmente los perros.⁹

En una encuesta realizada en 1997 por OPS en 11 países de la región: Brasil, Cuba, Ecuador, El Salvador, Honduras, México, Nicaragua, Paraguay, Panamá, Perú y Uruguay.

Brasil fue el país que notificó el mayor número de casos, seguido de Cuba, Nicaragua y México.⁸

En el continente americano, ha sido publicado la prevalencia en algunos países: México 14.1%; Argentina 38%; Brasil 9.8%; Cuba 12%; El Salvador 17.5% y Colombia 18.5%. La seroprevalencia se determinó en una población sana sin tomar en cuenta el grupo de alto riesgo (riesgo ocupacional).¹⁰

En Nicaragua, en 1995 se notificó un brote con 400 casos y 13 defunciones (por distrés respiratorio y hemorragia pulmonar). Las evidencias encontraron leptospira en los tejidos de riñón e hígado de tres de los pacientes fallecidos; este brote se asoció a contacto directo con agua y suelo contaminado con orina infectada después de intensos períodos de lluvia.⁸

En Cuba se notificó un brote que afectó a 79 personas, en su mayoría recolectores de caña, por exposición temporal en terrenos húmedos infestados por roedores.

En Brasil se describió un brote en 1996 en el estado de Río de Janeiro, el mayor número de casos ocurrió en varones (61%) de 15 a 49 años de edad.⁸

En México el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos reporta en 1998, 119 resultados positivos: Distrito Federal (40), Hidalgo (26), Guerrero (12), México (9), Veracruz (6), Tamaulipas (5), San Luis Potosí (5), Nuevo León (4), Campeche (3), Chiapas (1), Michoacán (1), Coahuila (1), Tabasco (1), Colima (1), Sinaloa (1), Morelos (1), Oaxaca (1), y Jalisco (1). En el periodo de 1992-1997, efectuó el diagnóstico diferencial en 3,458 muestras de diferentes estados encontrando una positividad de 30.3%. Las serovariedades más frecuentes fueron: *pomona* (17%), *canícola* (16.5%) e *icterohaemorrhagiae* (4%).¹¹

En el Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones se registraron 9 personas fallecidas por *Leptospira* para el periodo 1996-1997, en los estados de Sinaloa (6), Distrito Federal (2) y Tabasco (1), predominando el sexo masculino con 89%, todos los casos fueron en mayores de 15 años.

Entre los últimos brotes de mayor importancia, destacan el de 1995 en Nicaragua, que tuvo una alta mortalidad y los detectados entre 1997 y 1998 en India, Singapur, Tailandia y Kazajistán. En el año 2000, destaca el brote de leptospirosis entre los participantes en el “Desafío Eco” (Eco-Challenge) en Sabah, Borneo, en el que los eventos incluyeron fueron: vela, natación, kayak y canoa en los ríos tras una temporada de fuertes lluvias. En la actualidad (mayo 2012) las graves inundaciones están causando un importante brote de leptospirosis en Perú, especialmente en la región Loreto. Se han notificado ya más de 300 casos y 3 muertes asociadas a la leptospirosis.¹²

La situación epidemiológica de Leptospirosis en México en el 2000 presentaba una tasa nacional de 0.65 y al 2010 0.45 casos por cada 100,000 habitantes, manteniéndose constante durante los últimos 10 años. Los estados que presentaron una incidencia mayor son: Hidalgo, Sinaloa, Veracruz Tabasco, Sonora y Yucatán, que oscilan entre 0.22 a 9.80 casos por cada 100,000 habitantes, la mayor tasa nacional se presentó en el 2007 con 0.21 casos por cada 100,000 habitantes, el grupo de edad más afectado fue de 50-59 años, predominando el sexo masculino.¹³

En un estudio de revisión de seroprevalencia realizado entre el año 2000 y 2005 se identificaron 9,261 casos seropositivos de los cuales 293 se confirmaron por los criterios correspondientes, lo que evidencia el contacto con el *Leptospira* spp. Se encontró que la mayor incidencia y prevalencia se presentó en los estados del sur y centro del país y la mayoría de los casos se asoció en los meses que comprende la temporada de huracanes en el país.¹³

La leptospirosis es una zoonosis que para prevenirse y controlarse requiere acciones conjuntas de los sectores público, social y privado, a través de promoción de la salud, saneamiento básico, atención médica, capacitación del personal de salud y vigilancia epidemiológica.¹¹

DESCRIPCIÓN

La Leptospirosis es llamada también enfermedad de Weil, fiebre canícola, ictericia espiroquética, fiebre de los arrozales, enfermedad de los porqueros o fiebre de los cañaverales. Y es causada por una espiroqueta del género *Leptospira* (*Leptospira interrogans*) que causa una diversidad de síntomas clínicos tanto en el ser humano como en animales.⁸

Esta enfermedad se encuentra considerada dentro de un grupo de enfermedades bacterianas zoonóticas, con manifestaciones clínicas variables de curso agudo que se inician después de un período de incubación de 5 a 14 días, en la que se destacan:

- ✓ Síntomas ruidosos tipo influenza
- ✓ Aparición de inyección conjuntival
- ✓ Mialgias intensas que afectan a pantorrillas y muslos y limitan la marcha
- ✓ Dolor retroocular
- ✓ Fotofobia, exantema petequial en paladar
- ✓ Exantema morbiliforme no confluyente
- ✓ Dolor abdominal asociado con manifestaciones digestivas como náuseas, vómito y diarrea alta, que en ocasiones plantea diagnóstico diferencial con abdomen agudo quirúrgico

Estos síntomas son paralelos con la fase leptospirémica y se autolimitan 7 a 10 días más tarde con el inicio de la fase inmune (segunda semana). Un 10% de los pacientes viran a un curso agresivo con aparición de hemorragia por piel y mucosas, ictericia, coluria, oliguria o anuria, fracaso renal agudo, inestabilidad hemodinámica e insuficiencia respiratoria debido a hemorragia alveolar difusa.⁸

Este grupo de pacientes con la forma severa y potencialmente mortal de leptospirosis icterica la reconocemos por enfermedad de Weil's. Un 90% presentan un comportamiento no icterico, con reaparición de la fiebre asociado con meningitis, hemólisis, miocarditis, coriorretinitis, y en algunos casos insuficiencia renal aguda prerrenal, y en las experiencias de Brasil y Nicaragua, casos con hemorragia alveolar.⁶

RESERVORIOS

Los reservorios de las leptospirosis son animales que mantienen una relación comensal con este género de bacterias y no sufren o sufren levemente la enfermedad; transfieren las

leptospiras a sus crías en útero o el período neonatal, favoreciendo la cadena de transmisión.¹⁰

Los portadores son aquellos animales que mantienen las leptospiras viables y con capacidad de multiplicarse en sus riñones, excretándolas intermitentemente por la orina; sin manifestar la enfermedad, muchos de estos pueden tener serología negativa.¹⁰

Y es importante tener en cuenta que las serovariedades varían de acuerdo con el animal infectado.^{6,14}

- ratas (*L. icterohaemorrhagiae*)
- cerdos (*L. pomona*)
- ganado bovino (*L. hardjo*)
- perros (*L. canicola*)
- mapaches (*L. autumnalis*)

Otros huéspedes animales con estado de portador muy breves incluyen venados y ciervos, ardillas y zorros. Los mamíferos asintomáticos pueden portar la *L. interrogans* por meses en el túbulo contorneado proximal del riñón. Después de la excreción con la orina pueden sobrevivir por semanas o meses en el medio bajo condiciones favorables, tal como temperatura de 28-32°C y un pH neutral o ligeramente alcalino. Clima caliente, abundantes lluvias, suelo no ácido, cursos de agua natural, estancamiento de aguas de adobe y abundante biodiversidad son los medios propicios para la transmisión de la infección.⁶

PATOGENIA

La leptospira penetra a través de la piel erosionada o mucosas sanas, se difunde rápidamente y después de 48 horas se la encuentra en todos los humores y tejidos, con localización especial en riñón, hígado, corazón, meninges y músculo esquelético (fase leptospirémica de la enfermedad). La leptospira es resistente a la actividad bactericida del suero normal, y en ausencia de anticuerpos específicos no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos.^{6,14}

Entre los días 5 y 7 los anticuerpos específicos formados favorecen la opsonización del microorganismo que deja de ser encontrado en la sangre y se eliminan por la orina durante semanas o meses (fase inmune o de leptospiuria).

Muchos aspectos de la leptospirosis permanecen sin explicar, puede ser considerada como una enfermedad generalizada, sistémica, traducida fundamentalmente por una vasculitis infecciosa. La lesión vascular, predominantemente capilar, es un factor prominente de la leptospirosis y responsable del edema y de los trastornos hemorrágicos.⁶

Afecta fundamentalmente a los capilares de hígado, pulmón y riñón.

El gran daño celular en presencia de pocos microorganismos sugirió la mediación de factores tóxicos tanto de la espiroqueta como del huésped. Así como la pobreza de alteraciones patológicas en determinados órganos, a pesar de los profundos disturbios funcionales, hizo pensar que muchos de los aspectos de la enfermedad eran ocasionados por productos tóxicos liberados por el germen.

Durante la fase septicémica, la migración de bacterias, toxinas, enzimas y/o productos antigénicos liberados a través de la lisis bacteriana conducen a una permeabilidad

vascular aumentada, que es la manifestación más precoz y constante de la enfermedad. Las lesiones celulares de los diversos órganos tienen como base patogénica estos mismos factores, que actúan inicialmente sobre la membrana celular, adicionada a eventual hipoxia derivada del daño vascular.

Si bien el papel del lipopolisacárido (LPS) en la patogénesis de la enfermedad parece ser secundario, otra cosa resulta de la porción lipídica del glicolipoproteína (GPL), la cual es altamente citotóxica y ocasiona perforación de la membrana celular y la consecuente fuga citoplásmica y muerte. También inhibe la Na-K-ATPasa en forma dosis dependiente e incrementa su afinidad por sodio pero no por potasio, y esto explica las alteraciones iónicas observadas en leptospirosis que pueden traducirse en arritmias cardíacas. Por su parte, el LPS favorece la expresión de TNF-alfa y por su intermedio bloquea la lipoproteína lipasa, lo cual lleva a incrementar los triglicéridos, LDL y reducción de HDL.⁶

CLÍNICA

El tiempo entre la exposición a la fuente de contaminación y el comienzo de síntomas es de 2 días a 4 semanas.

FASES DE LA ENFERMEDAD

1ª Fase o leptospirémica

La ruta de infección comúnmente es a través de la mucosa nasal, oral, conjuntiva y abrasiones de la piel.¹⁵

Tiene un comienzo brusco, duración de 4-9 días.¹¹ En esta fase las leptospiras alcanzan el torrente circulatorio y son llevadas a los órganos internos: hígado, riñones, entre otros; donde ocasionan daño tisular más o menos severo de acuerdo con el serovar involucrado y la severidad de la infección.⁹

Síntomas:

- Hay fiebre (alta en agujas con escalofríos)
- Conjuntivitis (signo más característico, a veces hemorrágica)
- Mialgia (intensa, en muslos y región lumbar)
- Cefalea
- Menos específicos: lesiones cutáneas (exantema maculopapuloso o urticarial en tronco: fiebre pretibial)
- Poco frecuente pero más que en el adulto: colestitis alitiásica, pancreatitis, dolor abdominal e hipotensión

La infección de las membranas fetales y del feto puede ocasionar abortos y el paso de las leptospiras a través de la placenta facilita los cambios degenerativos en la última etapa de gestación.¹⁵

2ª Fase o Inmune

Tras un periodo asintomático de 1-3 días. Duración de 1-4 semanas. Aparecen los anticuerpos.⁹

La fase leptospirémica cesa con la aparición de anticuerpos IgM y las leptospiras son eliminadas por fagocitosis de los órganos internos, a excepción del riñón donde sobreviven formando microcolonias en los túbulos renales y de allí son excretadas a través de la orina por largos períodos de tiempo, incluso en ocasiones durante toda la vida.¹⁵

Pueden reaparecer los síntomas de la fase anterior siendo la fiebre más baja. Incluso en ausencia de síntomas meníngeos, en un 50- 90% aparece pleocitosis en LCR.¹⁷ Menos común: uveítis anterior, encefalitis y neuropatías craneales y periféricas.

SÍNDROMES ESPECÍFICOS DE LA LEPTOSPIROSIS

Enfermedad de Weil

Es la forma más grave y se caracteriza por ictericia, oliguria, colapso circulatorio y tendencia hemorrágica. No hay uniformidad de opinión en cuanto a si este síndrome es producido por la repuesta inmunológica o por acción toxica .Las personas de mayor edad están predispuestas a presentarlo.⁹

Sus características especiales se empiezan a presentar desde el tercero hasta el séptimo día. La fiebre cede alrededor del séptimo día, pero no hay verdadera mejoría clínica. El paciente presenta ictericia y hepatomegalia dolorosa .Las transaminasas glutámico oxaloacéticas aumentan dos o tres veces su valor normal, pero las bilirrubinas suben notablemente. Al mismo tiempo aparecen las manifestaciones del trastorno renal, hay oliguria, proteinuria, hematuria e hiperazoemia.

El daño renal consiste en necrosis tubular aguda. La mayor elevación de la urea se observa alrededor del séptimo día.

Las manifestaciones hemorrágicas incluyen:

-  Epistaxis
-  Hematemesis
-  Neumonitis hemorrágica
-  Hemorragias suprarrenales y subaracnoideas

Se considera que estas se deben a vasculitis difusa. El serotipo que produce este cuadro clínico es *L. icterohaemorrhagiae*.⁹

Leptospirosis anictérica

El cuadro clínico se inicia bruscamente con fiebre alta, cefalea, dolor muscular severo, escalofrío, náusea, vómito, dolor abdominal, postración.

Existen otras manifestaciones clínicas, principalmente meningitis aséptica pero no existe ictericia.

Meningitis aséptica

Alrededor de un 10 % de las meningitis asépticas son causadas por la leptospirosis y puede ocurrir también encefalitis. El número de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo oscila entre 100 y 1000 y la reacción puede ser mononuclear o de neutrófilos. El

contenido de glucosa es normal y las proteínas se elevan moderadamente, hasta 100 mg por mL. El líquido es xantocrómico, si hay ictericia. Los serotipos que son mayor frecuencia producen este síndrome son: *L. canícola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*.⁹

El cuadro clínico se caracteriza por:

-  Fiebre alta
-  Cefalea
-  Rigidez de nuca
-  Trastornos de la conciencia
-  Mialgias

Su duración es de 10 días aproximadamente, al cabo de los cuales hay recuperación total.

Fiebre pretibial de Fort Bragg

Este síndrome se observó en Carolina del Norte en el periodo de 1942-1944. Se inicia con:

- Escalofríos
- Malestar
- Cefalea
- Fotofobia
- Fiebre alta

Al cuarto día de la enfermedad aparece la erupción características que consiste en lesiones eritematosa, levemente elevadas, de 2 a 5 cm de diámetro, localizadas simétricamente sobre las regiones pretibiales. Esta erupción se generaliza en algunos casos. La esplenomegalia aparece en el 95% de los casos, se debe al serotipo *L. autumnalis*.⁹

Miocarditis

Es otra de las complicaciones de la leptospirosis. Se presenta con dilatación cardíaca y arritmias como fibrilación auricular, aleteo, taquicardia ventricular, extrasístoles ventriculares. La miocarditis se asocia con las manifestaciones más graves de la enfermedad como neumonitis, ictericia, lesión articular, etc.⁹

FASES DEL DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico clínico de esta zoonosis se apoya en estudios de laboratorio, debido a que las manifestaciones clínicas son frecuentemente atípicas.

Identificación

-  Fase Preanalítica
-  Fase Analítica
-  Fase Posanalítica

FASE PREANALÍTICA

El diagnóstico clínico, tiene un carácter presuntivo¹⁰ Para el diagnóstico de leptospirosis debe basarse en:

Historia clínica

- Antecedentes epidemiológicos (edad, alimentos ingeridos, afectación a otros familiares, contacto con determinadas personas, viajes recientes).
- Factores predisponentes
- Presencia de signos y síntomas clínicos(manifestaciones clínicas antes consideradas).⁶

No obstante, el diagnóstico definitivo solo se puede obtener mediante pruebas de laboratorio. La leptospirosis es una enfermedad de difícil diagnóstico clínico, ya que son frecuentes las enfermedades con síntomas similares a ella.

Recolección de muestra

Las muestras de elección necesarias para realizar los estudios respectivos comprenden:

- Sangre
- Suero
- Orina
- Líquido Cefalorraquídeo
- Exudados
- Biopsia de hígado

Deben ser tomados a los 8 días posteriores de iniciada la sintomatología clínica. Durante los primeros días de enfermedad se encuentran leptospiras en la sangre y el LCR.¹¹

Para la toma de muestra estos deben reunir las siguientes características:

Muestra de sangre (con anticoagulante)

Las muestras de sangre es la idónea para realizar el aislamiento, debe tomarse en la fase aguda de la enfermedad, durante los primeros 10 días de la infección. Posteriormente esta muestra no es adecuada para el aislamiento.

Se toman 5 mL de sangre y se conserva a 4°C para envío y recepción al laboratorio, no debe pasar de 48 horas. Durante la primera semana de la enfermedad, el medio más seguro para detectar a las leptospiras es el cultivo directo de sangre en medios apropiados, si no se dispone de éstos en el momento de la toma de la muestra, puede desfibrinarse o mezclarse con anticoagulantes (heparina u oxalato de sodio, las soluciones de citrato pueden ser inhibidoras) y luego subcultivarse, se transporta a temperatura ambiente. El envío y recepción al laboratorio es inmediato y no debe pasar de 6 horas.¹¹

 Muestra de suero

Consiste en tomar de 5 a 7 mL de suero conservado a 4°C; para su envío y recepción a laboratorio, no debe pasar de 48 horas; si sobrepasa este tiempo se recomienda transportación en congelación.

 Muestra de orina

Las muestras de orina se pueden obtener al comienzo de la segunda semana y hasta 30 días después de la instalación de los síntomas.⁸ Debe enviarse 30 mL de la primera micción, en un frasco estéril, resistente, rotulado y a temperatura ambiente; para su envío y recepción al laboratorio no debe pasar de 12 horas.¹¹

 Muestra de L.C.R

Tomar 3 mL, depositada en tubo estéril, conservado a temperatura de refrigeración; no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio.¹¹

 Exudados y biopsia de hígado

Estos deben enviarse en frascos estériles, sin adición de sustancias químicas y en condiciones de refrigeración, no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio. En caso contrario, pueden congelarse y enviarse con hielo seco o en nitrógeno líquido al laboratorio, mediante lo cual se evita su descomposición durante su transportación cuando ésta sobrepasa las 24 horas.¹¹

FASE ANALÍTICA

El diagnóstico de laboratorio de leptospirosis se basa en la identificación del microorganismo en cultivo por medio de técnicas bacteriológicas que son las más complejas, pero brindan resultados muy importantes tales como¹⁰:

- La observación
- El aislamiento
- Identificación del microorganismo
- La seroconversión o el incremento de cuatro veces en el título de anticuerpos en la prueba de MAT (Serología).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO***Detección directa (Examen microscópico)***

La observación de leptospiras mediante microscopio de campo oscuro se puede realizar en especímenes de:

- Muestras de sangre
- Muestras de orina
- Muestra de biopsia hepática, de riñón y pulmón
- Muestras de L.C.R durante la fase aguda de la enfermedad¹⁵

La sangre, el LCR y la orina se someten a examen directo mediante microscopio de campo oscuro. La detección de leptospiras móviles en estas muestras se optimiza con la centrifugación a 1.500Xg durante 30 minutos. Centrifugar sangre tratada con oxalato de sodio o heparina a 500x durante 15 minutos para eliminar los eritrocitos.¹⁸

Si bien el método para la observación de leptospiras es la microscopia de campo oscuro, no es frecuente observar la *Leptospira* en los productos patológicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo), por la escasa concentración de microorganismos en los mismos. En los tejidos se pueden demostrar mediante técnicas de impregnación argéntica.¹⁷

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Durante el periodo febril de leptospirosis se puede aislar el microorganismo del líquido cefalorraquídeo, después de la primera semana puede incluso cultivarse a partir de la orina. Al término de la primera semana se detectan los anticuerpos en el suero del enfermo, constituye el método diagnóstico de elección.¹⁷

Cultivo

Las leptospiras se cultivan en medios artificiales constituidos por una solución de sales minerales y aminoácidos a los que se añade suero de conejo (medios de Fletcher y Stuart), o albúmina bovina con Tween 80 (medio de Ellinghausen, McCulloch, Harris y Johnson o EMJH).¹⁷

Se siembran unas gotas de sangre heparinizada o anticoagulada con oxalato de sodio en los tubos de medios semisólidos enriquecidos.¹⁸

La orina se debe sembrar poco después de la recolección, dado que la acidez (diluida en el medio líquido) puede dañar las espiroquetas. Agregar 1 a 2 gotas de orina sin diluir y una dilución 1:10 de orina a 5 mL de medio. El agregado de 200 microlitros de 5 - fluorouracilo (un fármaco oncológico) impide la contaminación con otras bacterias sin dañar las leptospiras. Las muestras tisulares sobre todo las hepáticas o las renales, se pueden macerar en condiciones de asepsia y sembrar en diluciones de 1:1, 1:10 y 1:100, como cultivos de orina.¹⁸

La incubación se realiza a temperatura ambiente o a 28-30°C en la oscuridad durante un lapso de 6 a 8 semanas. Debido a su lento desarrollo y que los microorganismos crecen por debajo de la superficie, se debe analizar una vez por semana materiales obtenidos de un par de centímetros por debajo de la superficie de los cultivos en caldo para detectar crecimiento con un preparado en fresco observado con microscopio de campo oscuro. Las leptospiras muestran una movilidad de tipo sacacorchos.¹⁸

No debe considerarse el cultivo como negativo sino hasta transcurrido un mes. El crecimiento en medios líquidos se manifiesta por enturbiamiento y en los medios semisólidos, el desarrollo se inicia a 1-2 cm de la superficie, pero la morfología colonial no es característica.¹⁷

La identificación de la cepa aislada se efectúa mediante técnica de aglutinación microscópica con anticuerpos específicos de serogrupo y serotipo.¹⁷

MEDIO DIFERENCIAL

Este medio se utiliza para la diferenciación de especies por sus características fenotípicas, está compuesto por EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8 azaguanina, ya que éste compuesto (8-AZ) es una purina que se incorpora al medio de cultivo y se utiliza como inhibidor del crecimiento. La cepa patógena *Leptospira interrogans* no crece en presencia de 8-azaguanina y la cepa no patógena *Leptospira biflexa* ha demostrado resistencia a la acción bacteriostática, por lo que ésta especie si crece en éste medio diferencial.¹⁰

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Las leptospirosas se pueden distinguir de otras espiroquetas sobre la base de la cantidad de espiras y los ganchos de los extremos. Desde el punto de vista fisiológico los saprofitos se diferencian de los patógenos por su capacidad de crecer a temperatura de 10°C e inferiores o al menos 5 °C por debajo de la temperatura de crecimiento de las leptospirosas patógenas.¹⁸

Otra forma para diferenciar *Leptospira interrogans* patógena de la *Leptospira biflexa* no patógena es a través de pruebas bioquímicas tales como¹⁹:

- a) *Leptospira interrogans*
 - ❖ Catalasa fuertemente positiva
 - ❖ Peroxidasa débilmente positivo o negativo
- b) *Leptospira biflexa*
 - Catalasa débilmente positivo o negativo
 - Peroxidasa fuertemente positivo

En los análisis de sangre suele aparecer elevación de la velocidad de sedimentación globular, leucocitosis con desviación a la izquierda o en rango normal (a diferencia del dengue en que tienden a la leucopenia), y trombocitopenia ligera.¹⁰

MÉTODOS SEROLÓGICOS (DIAGNÓSTICO INDIRECTO).

El diagnóstico serológico de leptospirosis requiere un incremento de cuatro veces o más del título de anticuerpos aglutinantes.¹² La técnica de referencia es la reacción de microaglutinación con suspensiones vivas de *Leptospira* y lectura microscópica en fondo oscuro (aglutinación microscópica). Presenta una gran sensibilidad y especificidad, y se debe practicar la reacción frente a una batería de cepas de los principales serogrupos. La prueba se considera específica de leptospirosis cuando se detecta seroconversión, es decir, aumento significativo del título de anticuerpos entre dos muestras de suero; la primera obtenida durante los primeros días de la enfermedad y la segunda muestra 10 a 15 días después, o bien cuando se obtienen títulos elevados en una sola muestra (< 1: 800).

Como prueba serológica rápida, en algunos laboratorios clínicos se utiliza la técnica de enzoinmunoensayo (ELISA), especialmente para detección de IgM.¹⁶ Las pruebas de detección de IgM se utilizan principalmente porque estos anticuerpos se vuelven detectables durante la primera semana de enfermedad.¹⁸

FASE POSANALÍTICA

INFORME DE RESULTADOS

Se presentan tan pronto como la información útil esté disponible de acuerdo a criterios:
El cual especifica que todo caso sospechoso confirmado por una o más de las siguientes pruebas de laboratorio:

- **Aislamiento:**

Aislamiento de leptospiras patógenas durante la fase aguda de la enfermedad, obtenidas por cultivo de sangre (en los primeros 7 días) o del líquido cefalorraquídeo (del cuarto al décimo día) y de la orina después del décimo día.

- **Serología:**

Serología positiva mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT), con aumento de 4 veces o más de los títulos entre la fase aguda y convaleciente, con intervalo de 2 semanas o más entre las 2 muestras y estudiadas en el mismo laboratorio. En caso de disponer de una única muestra, un título serológico igual o superior a 1/800 en la MAT, confirma el diagnóstico. Los títulos comprendidos entre 1/50 y 1/800 deben ser interpretados en el marco de la situación clínico-epidemiológica del paciente.²⁰

- ✓ Clínico-epidemiológico. Todo caso sospechoso con clara evidencia de asociación epidemiológica.

- El médico interpreta los datos y receta el medicamento más indicado para el paciente.²⁰

TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

El tratamiento se basa principalmente en la terapia de soporte, control del desequilibrio electrolítico y ácido base. La terapia con antibióticos debe iniciarse lo más temprano posible para evitar lesiones en los tejidos.

El manejo de casos moderados a graves debe ser en forma hospitalaria. Todo paciente con diagnóstico presuntivo de leptospirosis debe ser hospitalizado cuando presenta los siguientes síntomas de alarma: fiebre elevada que no cede a antipiréticos (39°C), vómitos persistentes, dolor abdominal intenso que puede llegar al abdomen agudo, ictericia, manifestaciones hemorrágicas (gingivorragia, hemoptisis, melena, petequias generalizadas), dificultad respiratoria, trastornos hemodinámicos (shock), oliguria y signos meníngeos.¹⁰

Existe controversia sobre la eficacia del tratamiento antimicrobiano en la leptospirosis leve y febril, por lo que los cuadros más leves de leptospirosis probablemente no requieren tratamiento alguno. En los casos más graves es fundamental administrar los antibióticos adecuados lo más pronto posible.

Se recomienda que el tratamiento se realice con penicilina, en dosis de 6.000.000 U/día por 7 días, o doxiciclina, aplicando dosis de 100 mg/cada 12 horas, durante una semana. Estos esquemas acortan la duración de la fiebre y el compromiso renal.⁶

De acuerdo con la patología subyacente y la gravedad del caso, deberán aplicarse las medidas terapéuticas y de apoyo requeridas. El pronóstico es en general favorable y la tasa de mortalidad oscila del 5 a 20%.⁶

Para grupos de personas que ingresen a zonas endémicas en forma temporal (personal militar, practicantes de deportes de aventura, brigadistas y otros), se recomienda aplicar, en adultos, doxiciclina 200 mg vía oral una vez por semana o amoxicilina 500 mg vía oral una vez por semana; en niños amoxicilina 250 mg vía oral una vez por semana. El tratamiento quimioproláctico está recomendado mientras dure la estadía.¹⁰

SEGURIDAD

Medidas para el control de la enfermedad en el hombre

Fundamentalmente relacionadas con la disminución de la población de roedores como principal fuente de transmisión de la enfermedad, evitar la exposición a fuentes de agua contaminadas y minimizar factores de riesgo para el personal involucrado en la actividad agrícola, minera y laboratorios de diagnóstico.⁸

Medidas de bioseguridad en el laboratorio

Se requieren medidas básicas de Bioseguridad tipo II, con campana de bioseguridad (flujo laminar, luz ultravioleta), microscopio con condensador de campo oscuro, baño de maría, nefelómetro, incubadora a 30°C, refrigerador, congelador a -20°C y a -70°C, lector de placas de ELISA y autoclave. Se recomienda el uso de un área libre de corrientes de aire y con piso, paredes y ventanas lisas y fáciles de lavar y desinfectar. Las mesas de trabajo deben tener material absorbente, se deben lavar con hipoclorito de sodio al 6%.

Las placas de microtitulación donde se realiza la técnica de MAT deben ser colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante una hora, el material reutilizable se trata durante 24 horas con benzal, preparado según el fabricante.

Las muestras de suero de pacientes deben ser calentadas a 56°C para eliminar agentes infecciosos.⁸

Personal de laboratorio

Debe usar bata, guantes, cubre boca y lentes de seguridad, estar previamente capacitado, conocer el manejo de los residuos peligrosos biológico infeccioso (RPBI) según la NOM-087- ECOL-SSA1-2002, y conocer el riesgo que implica el manejo de la bacteria. Durante el trabajo evitar la formación de aerosoles y de corrientes de aire por movimientos bruscos. El riesgo principal para el personal de laboratorio son los accidentes causados por cortaduras o salpicaduras en los ojos cuando se inoculan los animales con leptospirosis.

Medidas de Control

- Notificación de todos los casos a la autoridad correspondiente.

- Aislamiento del paciente y precauciones respecto a la sangre y los líquidos corporales de las personas enfermas. Desinfección concurrente de los artículos contaminados con orina.
- Investigación de todos los casos, contactos y de la probable fuente de infección, investigación de probable exposición a animales infectados y aguas contaminadas.

Medidas Preventivas

- ✓ Educación a la población respecto a los modos de transmisión de la enfermedad.
- ✓ Evitar nadar y vadear en aguas que puedan estar contaminadas. Evitar el contacto con agua fresca, barro y vegetación que probablemente esté contaminada con orina, especialmente cuando la persona tiene erosiones o heridas.
- ✓ Consumo de agua hervida cuando no se disponga de agua potable.
- ✓ Utilizar elementos de protección cuando se realizan actividades recreacionales en aguas potencialmente contaminadas.
- ✓ Proteger por medio de botas, guantes, y delantales a los trabajadores expuestos por su ocupación al riesgo de leptospirosis.
- ✓ Identificar aguas y suelos que puedan estar contaminados. Drenaje de terrenos bajos cuando sea posible.
- ✓ Realizar control de roedores en las viviendas y en las áreas alrededor de las casas y lugares de trabajo. Efectuar construcciones a prueba de roedores.
- ✓ Protección cuando se manipulan animales muertos o cuando se limpian los lugares donde se guardan o juegan los animales.
- ✓ La inmunización de los animales de granja y domésticos evita la enfermedad, pero no necesariamente la infección ni la eliminación de los microorganismos con la orina.
- ✓ La inmunización de las personas con riesgo de exposición ocupacional a serovariedades específicas se ha utilizado en diferentes países.
- ✓ Se ha demostrado que la doxiciclina es eficaz como medida de prevención de leptospirosis en personal expuesto, cuando se administra por vía oral una dosis de 200 mg a la semana durante los períodos de exposición elevada⁸

RECOMENDACIONES PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LEPTOSPIROSIS

La importancia de efectuar vigilancia epidemiológica según la recomendación de la OMS, radica en que:

- ✚ Es una zoonosis de distribución mundial, propia de países de clima subtropical o tropical húmedo.
- ✚ Una gran variedad de animales salvajes y domésticos pueden ser fuentes de infección de esta enfermedad.
- ✚ La Leptospirosis está vinculada a algunas actividades ocupacionales en lugares de clima templado.
- ✚ La enfermedad evoluciona desde una forma leve a letal, dependiendo de la serovariedad de la leptospira.
- ✚ Es una enfermedad que probablemente pasa por alto y se subnotifica en muchos países, debido al diagnóstico clínico difícil y la falta de laboratorios de diagnóstico.⁸

La OMS recomienda la notificación inmediata de casos sospechosos o confirmados a nivel periférico (hospitales, laboratorio), debiéndose investigar todos los casos. La

vigilancia basada en hospitales permite obtener así información sobre los casos más graves. La serovigilancia indica las variedades prevalentes.

La definición de caso recomendada corresponde a enfermedad febril aguda con cefalea, mialgia y postración asociada a: sufusión conjuntival, irritación meníngea, anuria/oliguria/y o proteinuria, ictericia, hemorragias (intestinal, pulmonar), arritmias o insuficiencia cardíaca, erupción cutánea y el antecedente de exposición a animales infectados o a un ambiente contaminado con orina de animales. El criterio recomendado para caso confirmado corresponde a aquel que es confirmado por un laboratorio competente, mediante aislamiento o serología positiva.

La definición de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Leptospirosis debe, por lo tanto, tener como base la existencia de un laboratorio de diagnóstico y la capacitación del personal médico, veterinario, epidemiólogos y biólogos que faciliten la detección y estudio de los casos y reservorios.

La vigilancia de esta enfermedad proporciona así la base para establecer las estrategias de intervención en Salud Pública.⁸

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leptospirosis es una enfermedad causada por la bacteria *Leptospira interrogans*, es un padecimiento poco conocido y con escasos estudios referentes al tema, además de que las recientes investigaciones realizadas de este microorganismo están en proceso, debido a que recientemente han surgido brotes de leptospirosis humana provocado por los cambios climáticos de hoy en día. Por lo que fue un reto la búsqueda de información con respecto a este microorganismo.

La realización de este manual con información actualizada, sirve como base para realizar un diagnóstico clínico oportuno de la bacteria *Leptospira interrogans*, teniendo como principal característica de la misma su amplio polimorfismo clínico que provoca, haciendo de esta enfermedad una simuladora, es por ello que frecuentemente es diagnosticada como dengue, fiebre hemorrágica por dengue, hepatitis, fiebre tifoidea, tuberculosis y neumonía provocando un mal diagnóstico y un tratamiento incorrecto lo que conlleva a que la enfermedad avance, el cual puede tener consecuencias graves para el paciente y hasta llegar a provocar la muerte.

Es por lo anterior que la finalidad de este manual contribuya a proporcionar datos de utilidad clínica, que sirva de apoyo y referencia para los QFB que están laborando en la actualidad, a los alumnos de noveno del área de bioquímica clínica en el módulo de Microbiología médica que son los próximos profesionales que se enfrentaran a este problema, así como también de otras carreras afines, de tal forma que se pueda obtener un diagnóstico efectivo y acertado.

OBJETIVOS

- Realizar un Manual de apoyo a la docencia en el Módulo de Microbiología Médica de la carrera Químico Farmacéutico Biológica que contendrá información de forma integral de la bacteria *Leptospira interrogans*, con estudios y datos recientes que aporten conocimientos sobre este microorganismo .
- Elaborar un manual integral de *Leptospira interrogans* que contenga los diferentes métodos de diagnóstico, la marcha microbiológica para su correcta identificación, así como el tratamiento, profilaxis, etc.
- Proporcionar al personal de salud, en este caso al QFB los conocimientos básicos sobre factores de riesgo y epidemiología de la leptospirosis.
- Brindar una guía sobre el manejo adecuado de las muestras para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio: Bibliográfico Monográfico

Metodología

- 1) Se realizó una revisión documental de fuentes secundarias tanto libros: Microbiología Médica, Diagnóstico microbiológico, Bacteriología diagnóstica y artículos electrónicos de *Leptospira interrogans* de hace 10 años sin omitir información clásica.
- 2) Se organizó y estructuró la información.
 - ✓ Etiología
 - ✓ Características generales
 - ✓ Patogénesis
 - ✓ Cuadro clínico
 - ✓ Epidemiología
 - ✓ Grupos y factores de riesgo
 - ✓ Diagnóstico clínico
 - ✓ Tratamiento
 - ✓ Medidas de seguridad
- 3) Se transcribió la información obtenida.
- 4) Se elaboró el Manual de apoyo a la docencia en el Módulo de Microbiología Médica de la carrera Químico Farmacéutico Biológica.
- 5) Se realizó la revisión de la tesis por el Director y revisor.
- 6) Informe Final (Tesis)

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Se elaboró el “MANUAL DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *Leptospira interrogans*”

Este manual está dirigido al personal involucrado en la Toma de muestra sanguínea y alumnos de la carrera de QFB, a los microbiólogos y carreras afines a la salud. El manual fue elaborado como una herramienta de apoyo al aprendizaje para alumnos que cursan la asignatura de Microbiología Médica y personal interesado en el tema.

El manual contiene los siguientes capítulos:

1. Etiología
2. Características generales
3. Descripción de órganos y sistemas afectados
4. Cuadro clínico
5. Epidemiología
6. Grupos y factores de riesgo
7. Diagnóstico clínico
8. Tratamiento
9. Seguridad
10. Anexos

A continuación se muestra el manual de diagnóstico microbiológico elaborado como resultado de esta investigación.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	29
CAPÍTULO 1.....	31
1. HISTORIA DE LA LEPTOSPIROSIS.....	31
1.1 ETIOLOGÍA.....	32
CAPÍTULO 2.....	34
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	34
2.1 METABOLISMO.....	35
2.2 RESERVORIO.....	36
2.3 PATOGÉNESIS.....	39
2.4 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.....	43
2.5 FACTORES DE PATOGENICIDAD.....	46
2.6 RESPUESTA DE ANTICUERPOS.....	49
2.7 TRANSMISIÓN.....	50
2.7.1 Período de transmisibilidad.....	52
2.7.2 Susceptibilidad y resistencia.....	52
3. DESCRIPCIÓN DE ÓRGANOS Y SISTEMAS AFECTADOS.....	53
3.1 RIÑÓN.....	54
3.2 HÍGADO.....	55
3.3 CORAZÓN.....	56
3.4 PULMÓN.....	56
3.5 MENINGES.....	57
CAPÍTULO 4.....	59
4. CUADRO CLÍNICO.....	59
4.1 SÍNDROMES ESPECÍFICOS DE LA LEPTOSPIROSIS.....	61
4.1.1 Enfermedad de Weil.....	61
4.1.2 Leptospirosis anictérica.....	62
4.1.3 Meningitis aséptica.....	62
4.1.4 Fiebre pretibial de Fort Bragg.....	62
4.1.5 Miocarditis.....	62
4.2 FORMAS CLÍNICAS DE LEPTOSPIROSIS.....	63
4.2.1 FORMA ANICTÉRICA.....	63
4.2.2 FORMA ICTÉRICA O HEPATONEFRÍTICA (SÍNDROME DE WEIL).....	65
CAPÍTULO 5.....	69
5. EPIDEMIOLOGÍA.....	69
5.1 NIVEL MUNDIAL.....	70
5.1.1 Comportamiento actualizado a nivel mundial.....	71
5.2 LEPTOSPIROSIS EN MÉXICO.....	72
5.3 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEPTOSPIROSIS.....	78
5.3.1 Medidas de prevención.....	79
5.4 GRUPOS Y FACTORES DE RIESGO.....	80
5.4.1 Exposición ocupacional.....	80
5.4.2 Exposición Recreativa.....	81
5.4.3 Exposición en el Hogar.....	81
5.5 Tasa de letalidad.....	81
CAPÍTULO 6.....	83
6. DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA.....	83
6.1 DEFINICIONES OPERATIVAS ANTE CASOS DE LEPTOSPIROSIS.....	83

6.2	DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	84
6.3	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	84
6.4	DIAGNÓSTICO (CONTROL DE CALIDAD INTERNO)	86
6.5	DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	87
6.5.1	Parámetros Paraclínicos.....	87
6.6	FASE PREANALÍTICA.....	89
6.6.1	Recolección de la muestra.....	89
6.7	FASE ANALÍTICA.....	93
6.7.1	Criterios de confirmación de laboratorio.....	93
6.7.2	ANÁLISIS DE LA MUESTRA	93
6.8	FASE POSANALÍTICA.....	114
6.8.1	Informe de resultados	114
CAPÍTULO 7.....		115
7.	TRATAMIENTO	115
7.1	Profilaxis.....	117
7.2	Quimioprofilaxis.....	117
7.3	Tratamiento de soporte.....	117
7.4	Seguimiento de los pacientes con leptospirosis	118
7.5	Secuelas a largo plazo.....	118
7.6	Inmunización en humanos.....	118
CAPÍTULO 8.....		120
8.	SEGURIDAD	120
8.1	Medidas para el control de la enfermedad en el hombre	120
8.2	Medidas de bioseguridad en el laboratorio.....	120
8.3	Personal de laboratorio.....	121
8.4	Medidas de Control.....	122
8.5	Medidas Preventivas.....	122
8.6	Recomendaciones para la vigilancia epidemiológica de leptospirosis	122
8.7	Comunicación y Educación para la Salud.....	123
9.	REFERENCIAS.....	125
CAPÍTULO 9.....		137
10.	ANEXOS.....	137
10.1	ANEXO A.....	137
10.1.1	TOMAS DE MUESTRAS	137
10.2	ANEXO B.....	141
10.2.1	MEDIOS DE CULTIVO	141
10.3	ANEXO C.....	149
10.3.1	SIEMBRA DE LAS MUESTRAS.....	149
10.4	ANEXO D.....	153
10.4.1	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	153
10.5	ANEXO E.....	154
10.5.1	TINCIONES	154

INTRODUCCIÓN

Los cambios climáticos observados durante los últimos años en todo el planeta han repercutido en forma sustancial en la modificación de los nichos ecológicos en que se desarrollan muchas de las enfermedades infecciosas, tal es el caso de la leptospirosis.

La Leptospirosis es una zoonosis, enfermedad bacteriana que afecta a los humanos y los animales. Es causada por una bacteria llamada *Leptospira interrogans* de distribución mundial tanto en áreas urbanas como rurales. Esta bacteria cuenta con más de 200 variedades serológicas o serovariedades, los tres reservorios más comunes de la infección son: ratas (*Leptospira icterohaemorrhagiae*), en los perros (*Leptospira canicola*) y la del ganado y cerdos (*Leptospira pomona*). Otras variedades también pueden causar la enfermedad, pero la más grave es la causada por la *Leptospira interrogans* serovariedad *icterohaemorrhagiae*.

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), por su importancia en América Latina, es objeto de vigilancia y de notificación obligatoria junto con la rabia, la brucelosis, la tuberculosis, la encefalitis equina y la fiebre aftosa.

Este padecimiento es subregistrado en muchos países debido a la dificultad del diagnóstico clínico y la carencia de diagnóstico de laboratorio. Se estima globalmente que 10 millones se infectan de Leptospirosis cada año y es difícil estimar exactamente cuántos de ellos mueren por este padecimiento, en gran medida por que los decesos ocurren en países donde las muertes no son sujetas a notificación rutinaria. De acuerdo con los reportes disponibles, la incidencia anual varía dentro de un rango desde, aproximadamente 0.1-1 por 100,000 en climas templados hasta 10 -100 por 100,000 en climas húmedos tropicales. Cuando se producen brotes y en los grupos con alto riesgo de exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 por 100,000.

Se presenta frecuentemente con picos estacionales, algunas veces en brotes y está asociada con cambios climáticos principalmente inundaciones, la ocupación o actividades recreativas y con ocurrencias de epidemias asociadas con cambios en el comportamiento humano, contaminación del agua con animales o aguas residuales, cambios en la densidad de los reservorios animales. En los países con clima templado, además de las infecciones adquiridas localmente, la leptospirosis puede ser contraída por turistas, especialmente, aquellos que visitan la región tropical.

Puesto que es una infección común en las ratas y también en animales domésticos como vacas, caballos, cerdos y perros, aunque los animales infectados no muestren síntomas evidentes durante el análisis clínico, son portadores y transmisores al ser humano ya que son capaces de eliminar las bacterias al ambiente a través de su orina, corriendo el riesgo de enfermar cuando se tiene contacto con la orina o el excremento y otras secreciones de estos animales y la forma de contagio es a través de las heridas en la piel. En los humanos los síntomas presentan un gran espectro, desde infecciones asintomáticas, cuadros febriles inespecíficos, problemas gástricos, musculares, renales, meníngeos y en raras ocasiones muertes.

México no es ajeno a este problema y hoy en día reúne las condiciones geográficas, ambientales y socioeconómicas que propician la ocurrencia de estos brotes.

Debido al amplio polimorfismo característico de esta bacteria es difícil sospechar de Leptospirosis, puede presentar una amplia variedad de manifestaciones clínicas que

pueden variar desde una enfermedad pseudogripal leve hasta una enfermedad seria que puede llegar a ser fatal. Sus síntomas pueden parecerse a varias enfermedades, como influenza, dengue y otras enfermedades hemorrágicas de origen viral.

La ictericia, es un síntoma relativamente común en leptospirosis pero que también puede ser encontrado en otras enfermedades que involucran el hígado como las diversas formas de hepatitis. La similitud con que se presentan ambas enfermedades en su fase inicial ha propiciado dificultades en el nivel operativo para el diagnóstico correcto y oportuno (clínico y de laboratorio), y la atención adecuada de los enfermos, así como para su notificación y clasificación, ya que los médicos desconocen la enfermedad o no se realizan pruebas para la detección real de este microorganismo.

En muchos aspectos, la leptospirosis puede ser vista como una enfermedad emergente lo que ha llevado a aumentar el interés y la demanda de información sobre esta enfermedad, especialmente en los países en desarrollo. Nuevos métodos de diagnóstico, menos complicados, se han desarrollado en los últimos años, permitiendo la identificación de la infección con leptospira sin necesidad de recurrir a laboratorios de referencia especializados.

La situación y perspectivas de la Leptospirosis hacen necesario el contar con procedimientos específicos para la detección oportuna e implementación de acciones de control, por lo que el propósito de este manual fue dar información integral de la bacteria *Leptospira interrogans* para un correcto diagnóstico ante una posible sospecha de contagio.

Esta guía va dirigida a los trabajadores de la salud (médicos, técnicos de laboratorio, microbiólogos, trabajadores de salud pública, veterinarios y biólogos interesados en zoonosis), que no tienen un conocimiento especializado sobre la leptospirosis pero que desean tener una información general sobre el microorganismo en cuestión y la enfermedad, además de ser un documento que apoyará a los alumnos que cursan el módulo de Microbiología Médica de la carrera de Q.F.B., así como fortalecer el contenido del Programa del módulo de Microbiología Médica.

La leptospirosis es un problema de salud humano y veterinario, sin embargo esta guía trata esencialmente la leptospirosis humana. Es fundamental concientizar al personal de salud y ampliar el conocimiento de la leptospirosis como un problema de salud pública y el objetivo de esta guía es asistir en ese proceso.

CAPÍTULO 1

1 HISTORIA DE LA LEPTOSPIROSIS

El espectro clínico de la enfermedad en los humanos es muy amplio y abarca desde una infección subclínica hasta un síndrome severo de infección multiórganos, con una elevada mortalidad. Este síndrome, leptospirosis icterica con fallo renal, se describió inicialmente hace más de 100 años por Adolfo Weil, en Heidelberg (1886).¹

Sin embargo, varios años antes de 1886 se había descrito un síndrome idéntico en trabajadores del alcantarillado en Europa y se cuenta con descripciones precisas que datan del siglo XIX, (antes de la notificación hecha por Weil) que demuestran que la leptospirosis ya era reconocida como un riesgo ocupacional de los cultivadores de arroz en la antigua China y en Japón.¹

El mérito indiscutible de Weil (1886) fue sin duda reconocer la leptospirosis como una nueva enfermedad, independiente de la fiebre amarilla con la cual se asoció por mucho tiempo.^{1, 2,3, 4, 5, 6, 7,8.}

Este acierto lo comparte con un cubano, el Dr. Francisco Navarro y Valdés, que escribió en 1868 la primera información de esta enfermedad en su tesis de doctorado: “La fiebre biliosa grave de los países cálidos no es la fiebre amarilla”, refiriéndose a una enfermedad icterohemorrágica, precedida por fiebre, que padecían algunos individuos radicados en los lugares pantanosos de Cuba en ciertas épocas del año.¹

Un hecho de trascendental importancia para el conocimiento de la enfermedad fue aislamiento del agente causal realizado por Sitmsom (1905). Este investigador demostró, mediante una tinción con plata, la presencia de un conglomerado de leptospiras en un corte histológico de riñón obtenido de un paciente fallecido durante una epidemia de fiebre amarilla.^{1,5,9,10} Las espiroquetas mostraban extremos encorvados, motivo por el cual Sitmsom las denomina “*Spiroquetas interrogans*” debido a su semejanza con el signo de interrogación (**Figura 1 y 2**). Sin embargo, esta importante observación fue desechada durante muchos años debido a la falta de estudios que relacionaran la patogenicidad con el microorganismo.^{1, 11}

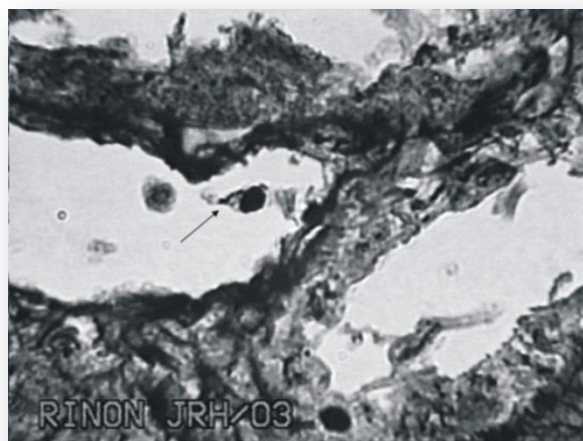


Figura 1. Leptospiras en riñón (tinción Warthin-Starry o tinción argéntica).¹²

En 1914 en Japón, Inada e Ido detectaron la presencia de leptospiras, así como de anticuerpos específicos contra ellas, en la sangre de mineros con el síndrome infeccioso, al que denominaron *Spirochaeta icterohemorrhagiae*, además cultivaron

por primera vez el organismo y se pudo determinar que la rata era un reservorio.^{1, 3, 5, 6 7, 8, 11}



Figura 2. *Leptospira interrogans*.¹³

Paralelamente, también fue descrita por dos grupos de médicos alemanes que estudiaban soldados afectados por la “enfermedad francesa” en las trincheras del nordeste de Francia, señalaron la presencia de espiroquetas en la sangre de cobayos inoculados con la sangre obtenida de soldados infectados, pero la confirmación de la ocurrencia de leptospirosis en ambos lados del frente occidental se logró después de la publicación en Europa del trabajo de Inada.^{1, 9, 11}

Aunque han transcurrido casi 100 años de su descubrimiento, la leptospirosis (**Figura 2**) constituye una de las enfermedades más desatendidas, causante de un alto número de muertes cada año, al punto de constituir la zoonosis de mayor distribución mundial.¹⁴

Esta enfermedad es tratable, por lo cual se debe resaltar la importancia de realizar un diagnóstico temprano e instaurar tratamiento inmediato para mejorar su pronóstico.¹¹

1.1 ETIOLOGÍA

Las espiroquetas componen un gran grupo de heterogéneo de bacterias móviles espirales. La familia (*Treponemataceae*) de la orden *Spirochaetales* incluye tres géneros, cuyos miembros son patógenos para el hombre:^{15, 16}

1. treponemas
2. borrelias
3. leptospiras

El agente etiológico de la leptospirosis según Bergey's (1998), está clasificada en:^{6,17, 18, 19, 20}

- ✓ Reino *procaryotae*
- ✓ Clase *scotobacteria*
- ✓ Orden *spirochaetales*
- ✓ Familia *leptospiraceae*
- ✓ Género *Leptospira*
- ✓ Especie: *L. interrogans*^{1,18,19,21,22,23,24,25,26}

Esta clasificación fue ratificada en el Curso Internacional de Diagnóstico de leptospirosis efectuado en la Habana (WHO/FAO, 2001).¹⁹

La subcomisión de Taxonomía de las leptospiras de la Organización Mundial de la Salud acordó dividir a estas bacterias en dos especies:^{2,18, 23, 27, 28,29}

- a) *Leptospira interrogans sensu lato* (interrogans por su apariencia morfológica similar a un signo de interrogación, debido a unos ganchos en los extremos del cuerpo), bacteria patógena para los animales y el hombre, siendo esta la de más importancia médica.
- b) *Leptospira biflexa sensu lato*
- a. Es una bacteria de vida libre (saprófita).^{1, 3, 19, 20, 23, 25, 26,28, 30, 31,32}

Basándose en su comportamiento bioquímico, en la capacidad de infectar animales, en sus características biológicas y en las exigencias de cultivo.^{29,32} La bacteria *Leptospira interrogans* se divide en más de 200 a 250 serovares patógenos y han sido agrupados en más 23 serogrupos ^{3, 6, 8,13, 17,19, 24,33,34,35, 36} de acuerdo con las aglutininas compartidas ^{1, 18, 27, 37}

Esta clasificación tiene importancia epidemiológica ya que el cuadro clínico y en general la virulencia no se relaciona con el serovar.^{9, 27} Las leptospiras tienen un antígeno somático común de grupo y antígeno de superficie diferentes entre ellas que son los que se utilizan para establecer los serotipos o serovar (unidad de agrupación taxonómica), ^{1, 11,29, 30} que se define sobre la base de la especificidad de los antígenos O superficiales (LPS de membrana externa).²⁰

El término serogrupo es adoptado para agrupar aquellos serovares que son homólogos antigénicamente.³⁰

Los serotipos se clasifican de acuerdo a los huéspedes que infectan y la distribución de serovariedades cambia dependiendo de la zona geográfica.

Las principales serovariedades universales son:

- ✚ *L. interrogans sv icterohaemorrhagiae*
- ✚ *L. interrogans sv canicola*
- ✚ *L. interrogans sv pomona*
- ✚ *L. interrogans sv ballum*
- ✚ *L. interrogans sv bataviae*
- ✚ *L. interrogans sv grippityphosa*
- ✚ *L. interrogans sv pyrogenes*
- ✚ *L. interrogans sv autumnalis*
- ✚ *L. interrogans sv australis*
- ✚ *L. interrogans sv hyos*
- ✚ *L. interrogans sv minigeorgia*
- ✚ *L. interrogans sv hebdomadis*^{3, 10,18,22,27}

Y los tres reservorios más comunes de la infección son: en las ratas (*Leptospira icterohaemorrhagiae*), en los perros (*Leptospira canicola*) y la del ganado y cerdos (*Leptospira pomona*). Otras variedades también pueden causar la enfermedad, pero la más grave es la causada por la *Leptospira icterohaemorrhagiae*.^{10,18}

CAPÍTULO 2

2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

La leptospirosis es producida por la espiroqueta *Leptospira interrogans*, que es la única especie patógena del género bacteriano *Leptospira*.³⁵ Estas bacterias comparten las características generales de los miembros del orden *Spirochaetales*, son microorganismos:

■ Bacilos Gramnegativo^{17,22,38}

■ Es una espiroqueta enrollada²⁹ muy fina (lepto = delgado o fino y spira=espiral) y larga, de 6 a 20 μm de largo y 0,1 a 0,2 μm de ancho.^{1, 7,17, 18, 19, 20,23, 26,29, 31, 35, 39, 40, 41,42,}

■ Flexible

■ Es helicoidal (como se observa en la **Figura 3**).

■ Sus espiras son muy apretadas, y generalmente uno o sus dos extremos son incurvados en forma de gancho con la punta afilada.^{1, 2, 7,23, 32, 35,39, 40} Los giros tienen 0,2 a 0,3 μm de diámetro global y 0,5 μm y en medios de cultivo líquidos generalmente presenta ganchos en ambos extremos.¹⁹

■ Son agentes tan finos que pueden pasar filtros que retienen otras bacterias, son capaces de atravesar membranas de millipore hasta de 20 milimicras (0.22 – 0.45 μm).^{17,23} y por lo tanto, capaces de penetrar al citoplasma e incluso al núcleo de la célula.¹²

■ Poseen dos filamentos axiales independientes (flagelos periplasmáticos o endoflagelos) constituido por dos proteínas conocidas como FlaA y FlaB, con inserciones polares que se localizan en el espacioperiplasmático.^{1,38}

■ Extraordinariamente móvil y exhiben dos formas distintas de movimiento, la traslación y la rotación en los medios líquidos y son: rotacional giratorio en el lugar, movimiento progresivo recto lineal, con un giro simultáneo alrededor de su propio eje, movimientos zigzagantes y movimientos circulares.^{1,31,44}

■ Tienen un promedio de 18 a 20 hélices por célula y la conformación es dextrógira (en dirección de las manecillas de un reloj).^{5,17,45,}

■ No crece en presencia de 225 $\mu\text{g/mL}$ de azoguanina, propiedad que permite diferenciarla de *L.biflexa*.²⁵

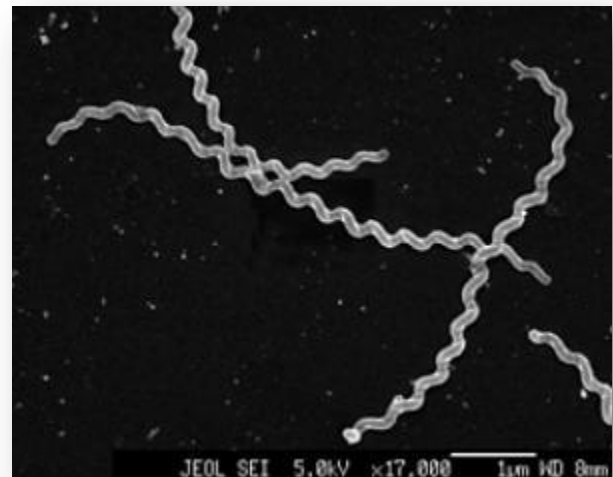


Figura 3. Espiroqueta.⁴³

- Son susceptibles a la acción de la mayoría de antibióticos, incluyendo penicilina, así como a la de los antisépticos y desinfectantes de uso común.²⁵
- No se colorean bien con anilinas y a pesar de que la tinción clásica usada para el estudio de estas bacterias es la impregnación argéntica, esta puede distorsionar su morfología, principalmente en cortes de tejidos.⁴⁶
- El cuerpo de las leptospiras tiene un coeficiente de refracción, casi como el cristal, por eso no se ven en la microscopía habitual.⁴⁴
- Dos características que hacen las Leptospiras sean difíciles de erradicar:
 - Pueden permanecer por periodos prolongados en los túbulos renales de animales sin producir enfermedad, ni cambios patológicos en el riñón.
 - Los animales salvajes representan un reservorio importante para reinfectar continuamente a las poblaciones de animales domésticos.¹⁶
- Se caracteriza por ser una enfermedad profesional (veterinarios, ganaderos, etc.) con una mayor incidencia en el verano y a comienzos de otoño.¹⁶

2.1 METABOLISMO

- ◆ Es un microorganismo aerobio estricto ^{22,26,38,40,47}, se cultiva con facilidad en medios artificiales, requiriendo para su crecimiento tiamina y vitamina B12.(Figura 4)
- ◆ Temperatura óptima de crecimiento entre 25-30°C y son catalasa-oxidasa positivos.^{1, 22,40} Producen Catalasa y hialuronidasa.
- ◆ Son sensibles a la luz solar.^{22, 40} Todas son muy sensibles a la desecación, al calor y frío excesivo así como a las variaciones del pH no tolerando el medio ácido, el pH óptimo para su multiplicación es 7.2- a 7.4. ^{3,11, 18,22, 25,26, 29, 30, 31, 42, 46,48} y oscilan en un rango de pH de 5.8 a 8.²² Una temperatura menor o igual que 13°C o mayor o igual que 35°C le provoca la muerte rápidamente.⁴² En el agua salada no sobreviven al contrario de los largos periodos que pueden permanecer en el agua dulce principalmente si se encuentra almacenada(es hasta 180 días) y en suelo seco 30 minutos.^{17,30,42,44}
- ◆ Tienen acción oxidativa sobre ácidos grasos de cadena larga (por lo menos de una longitud de 15 átomos de carbono, a la vez saturados e insaturados), de ahí obtienen energía.³¹ No aprovechan los aminoácidos o los carbohidratos como fuentes principales de energía.^{15,31,40} pueden utilizar sales de amonio o urea mas no aminoácidos como fuente de nitrógeno.⁴⁰

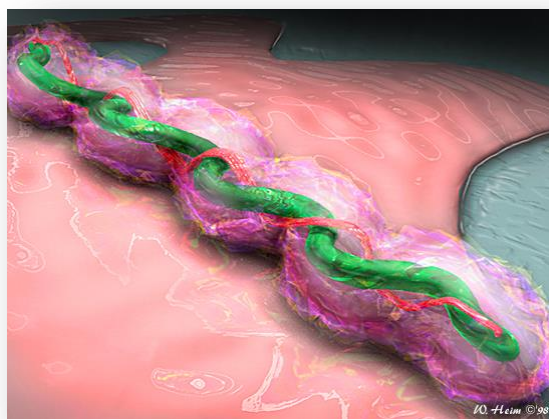


Figura 4. Leptospira .⁴⁹

- ◆ La multiplicación de la bacteria se lleva a cabo por división binaria transversal, advirtiéndose al comienzo de esta un estiramiento del cuerpo, posteriormente se encurvan (formas de U o V) hasta que se produce un estrangulamiento de la membrana y del cuerpo formándose así dos nuevos gérmenes. El tiempo de este fenómeno es variable, oscilando entre unos minutos y una hora.⁴⁰
- ◆ En agua estéril pueden vivir hasta 3 meses o más, en tierra ácida sobreviven por 7 semanas, en lodo de tierra por lo menos 3 semanas, en lagunas 22 días, viven en orina débilmente alcalina como la del cerdo, vaca y equino más de 16 días, cuando la tierra se contamina con la orina de ratas infectadas la leptospira sobrevive durante aproximadamente 2 semanas y en nitrógeno líquido sobreviven 32 meses.¹⁷
- ◆ En la leche las leptospiras no sobreviven salvo que ésta esté diluida en agua a la razón de 1:20 o más.²⁹ Es importante mencionar que la pasteurización no destruye a las leptospiras lo que indica que es necesaria la ebullición para cumplir con su destrucción. A los 10 segundos muere con 100°C y solo a los 10 minutos si la temperatura es de 56°C.^{25,30}
- ◆ La orina ácida es letal para las leptospiras y por eso es necesario alcalinizarla si se pretende aislarla de la orina de un enfermo. En el medio ácido pierde su motilidad tan rápido como en 15 minutos.²⁹
- ◆ Las condiciones ambientales prevalentes en la mayoría de países tropicales y subtropicales (lluvias abundantes, desborde de aguas residuales durante las inundaciones, suelos no ácidos y húmedos y altas temperaturas) han favorecido la transmisión de la enfermedad durante los últimos años.⁴²

2.2 RESERVORIO

Se considera reservorio donde el microorganismo vive habitualmente y se multiplica en condiciones normales: la fuente de infección constituye el hábitat ocasional a partir del cual se transmite el microorganismo patógeno. Reservorio y fuente de infección pueden ser: el hombre, los animales y objetos inanimados (fómites). Los vertebrados pueden ser reservorios y actuar como fuentes de infección cuando padecen enfermedades infecciosas (zoonosis).⁵⁰

¿Qué es un huésped accidental o incidental?

Un huésped que se infecta por accidente o de manera fortuita con un serovar para el cual no es huésped de mantenimiento natural, es llamado huésped accidental o incidental.

La distinción entre huéspedes naturales y accidentales o incidentales no siempre está claramente definida debido a que la interacción entre leptospiras patógenas y la especie animal hospedera es dinámica y se pueden adaptar a nuevas especies animales.³³ (**Cuadro 1**). Las distintas variaciones en los reservorios accidentales y sus serovares ocurren a lo largo del mundo. Un conocimiento de los serovares prevalentes y sus reservorios accidentales es esencial para entender la epidemiología de la enfermedad en cualquier región.²³

La leptospirosis afecta a alrededor de 150- 160 especies de mamíferos domésticos y silvestres⁴, que constituyen el reservorio y la fuente de infección al hombre.^{35,51, 52, 53} El huésped natural de mantenimiento asegura la circulación continua de un serovar de *Leptospira* particular en un área geográfica (foco natural), sin necesidad de que otro huésped accidental esté involucrado.

El punto de acumulación de *Leptospira* en sus hospederos naturales es el lumen de los túbulos nefríticos, de donde pasa a la orina. La persistencia e intensidad de la leptospiuria pueden variar según el hospedero y el serovar que causa la infección.²⁵

Los huéspedes naturales de mantenimiento pueden portar una cepa particular de *Leptospira* por meses en el túbulo contorneado proximal de sus riñones y eliminarlas con su orina durante largos períodos de tiempo, convirtiéndose en portadores urinarios transitorios (canidos, bovinos y porcinos) o permanentes (roedores), muchos de estos pueden tener serología negativa.^{4, 17, 23, 30, 33, 35, 51,52, 53}

Las especies más afectadas son los roedores (ratas y ratones) y marsupiales, son los principales reservorios de la enfermedad, los cuales albergan la leptospira en los riñones y la eliminan al medio ambiente, contaminando de esta manera el agua, suelo y alimentos (Figura 5 y 6).^{13, 30, 32, 42, 51, 54,53,}

Muchas cepas de *Leptospira* parecen estar tan bien adaptadas a sus huéspedes naturales que, como regla, son animales que mantienen una relación comensal con este género de bacterias y no sufren, o sufren levemente la enfermedad.^{17, 23,33} Los reservorios de las leptospirosis transfieren las leptospirosis a sus crías en útero o el período neonatal, favoreciendo la cadena de transmisión.^{17, 23}

Las ratas son clásicamente asociadas con esta enfermedad (Figura 5), pero los ovinos, bovinos, porcinos, equinos, caninos y otros animales domésticos pueden infectarse.^{6, 13, 16, 28, 30, 31,34, 48, 53,55, 56}

Otros huéspedes animales con estado de portador muy breves incluyen venados y ciervos, ardillas, zorros, los mapaches, los zorrinos, las musarañas y los erizos (Figura 6).^{6, 28, 29, 48}

Cuadro 1: Reservorios típicos y serovares de *Leptospira* encontrados.
8,19,23, 27,29, 35, 56,57

Reservorios	Serovar(s)
Cerdo	<i>pomona, canicola, tarassovi</i>
Vacuno	<i>hardjo, pomona, canicola, grippotyphosa</i>
Caballo	<i>bratislava</i>
Oveja	<i>hardjo, castellonis, pomona</i>
Rata	<i>icterohaemorrhagiae, copenhageni</i>
Ratón	<i>ballum, arborea</i>
Marsupiales	<i>grippotyphosa, bataviae, canicola, pomona, mapache (autumnalis)</i>

Murciélago*cynopteri, wolffi***Humano***Icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, grippotyphosa*

Figura 5. Los roedores son reservorios de leptospires y las eliminan por orina.⁵⁷

Y es importante tener en cuenta que las serovariedades varían de acuerdo con el animal infectado (**Cuadro 1**).^{22, 27,28} Diferentes serotipos de leptospires pueden ser transportados por un solo género animal y un solo serotipo puede asociarse con más de un huésped. En general, los huéspedes animales no están sintomáticos y no desarrollan anticuerpos a pesar de una infección agramadora.^{23, 28}

Después de la excreción con la orina pueden sobrevivir por semanas o meses en el medio bajo condiciones apropiadas, tal

como temperatura de 28-32°C y un pH neutral o ligeramente alcalino, clima caliente, abundantes lluvias, suelo no ácido, cursos de agua natural, estancamiento de aguas de adobe y abundante biodiversidad son los medios propicios para la transmisión de la infección.²⁷

Los reservorios mamíferos domésticos pueden manifestar la enfermedad (abortos, ictericia, hemoglobinuria y otros) desconociéndose el comportamiento en los reservorios silvestres.³⁰

Determinación de animales portadores de leptospires

Un animal es definitivamente un portador de leptospires, solamente si éstas pueden cultivarse a partir de él, particularmente de su orina o riñón. Como los animales pueden portar las leptospires en sus riñones y eliminarlas en su orina, se debe tener cuidado al manipularlos y deben ser considerados como fuentes potenciales de infección hasta que se pruebe lo contrario.³³



Figura 6. Reservorios.⁵⁷

2.3 PATOGÉNESIS

Debido a que las leptospiras son delgadas y móviles, pueden penetrar en el hombre a través de la piel erosionada, mucosas sanas o conjuntiva y de la piel intacta después de una inmersión prolongada en agua contaminada con la orina de animales portadores de la bacteria.^{1, 22, 25,27, 35, 58, 59}

La severidad del cuadro clínico depende del número de microorganismos infectantes, las condiciones inmunológicas previas del huésped y la virulencia de la cepa causante de la infección. El grado y la distribución del ataque de órganos y la enfermedad varían según la especie, en diversas zonas del mundo (**Cuadro 2**).¹⁵

Los mecanismos por los cuales las leptospiras causan enfermedad aún no se comprenden en su totalidad.²⁰ Después de la penetración por la piel, la leptospira patógena, invaden la corriente sanguínea y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el Sistema Nervioso Central. El poder invasivo de las leptospiras puede estar relacionado a su constitución, estructura química y antigénica, estas propiedades juegan un papel importante.^{35,60}

Este microorganismo **no** es una bacteria intracelular facultativa al parecer, esta observación *in vitro* dentro de las células (compartimentos citoplasmático y fagosomal), sólo es transitoria en células que no son fagocitos profesionales.

Se piensa que este hecho lo usa la bacteria como forma de diseminación hacia el órgano blanco y para evadir la respuesta inmune. La lipoproteína Lip46 se encuentra relacionada con la diseminación de la *Leptospira*.²⁵

Desde hace muchos años se conoce que esta infección en el hombre tiene generalmente una evolución bifásica, correspondiendo los primeros días a la fase septicémica y la multiplicación persistiendo hasta el desarrollo de la opsonización por las inmunoglobulinas en el plasma, este periodo se caracteriza por fiebre alta, cefalea intensa, dolores osteomusculares, ataque al estado general,^{10,39} para luego pasar lentamente, a la fase denominada de compromiso inmunológico donde las leptospiras permanecen en sitios privilegiados, parece ser que existe tropismo por algunos órganos como el hígado, riñones, corazón, pulmón, meninges y músculo esquelético.^{1, 2, 10,29, 47, 60}

La patogenicidad de este microorganismo está ligada a su presencia física en las lesiones. Esto ha sido observado en procesos patogénicos provocados experimentalmente, no se ha demostrado una “toxina bacteriana” responsable de estos fenómenos. Se piensa que toxinas (endotoxinas) y enzimas producidas por la leptospira contribuirían en su patogenicidad.⁶⁰ Varios laboratorios han aislado una sustancia lipopolisacárida que en realidad no se ha demostrado que contribuya en la patogénesis de la leptospirosis.

Investigadores (Brito y colaboradores) han utilizado técnicas de inmunoelectromicroscopia, confirmando la posible participación de antígenos en el proceso de lesión de la célula del hospedero que se inicia por la interacción de la bacteria con proteínas de la superficie de la membrana celular, culminando con la penetración y posterior agresión celular. La participación directa del agente infeccioso parece, por lo tanto, desempeñar función destacada en la génesis de la lesión celular, que comienza con un fenómeno de adhesión específica y que se complementa con la invasión celular. Para estos autores, aparte de la especificidad de la interacción bacteria - célula, hay una relación significativa entre intensidad de adhesión y patogenicidad del microorganismo.⁶⁰



Figura 7. Vasculitis por leptospirosis.⁶¹

Las manifestaciones clínicas se deben a la agresión vascular generalizada, con compromiso del endotelio de los pequeños vasos, extravasación de sangre, migración de leptospiras por los tejidos y relativa anoxia local que lleva a daño secundario para órganos.^{30, 35} Las lesiones celulares de los diversos órganos tienen como base patogénica estos mismos factores, que actúan inicialmente sobre la membrana celular, adicionada a eventual hipoxia derivada del daño vascular (**Figura 7**),^{27, 39} es probable

que se deba a la acción directa del microorganismo, a las toxinas producidas o liberadas después de su lisis, o sea secundaria a la lesión capilar. En realidad parece que están en juego varios mecanismos fisiopatológicos que actuarían complementariamente.⁶⁰

Las mialgias severas así como aumentos importantes en las enzimas (creatininfosfokinasa, y deshidrogenasa láctica) y la mioglobinuria, son datos que indican un compromiso importante de los músculos esqueléticos, en la forma de rabdomiolisis. La descomposición de las fibras musculares que ocasiona la liberación de los contenidos de dichas fibras (mioglobina) en el torrente sanguíneo. La mioglobina es tóxica para el riñón y con frecuencia causa daño renal).²⁶

Es conocido que en la leptospirosis se compromete el sistema nervioso en la forma de meningoencefalitis y neuritis periférico, el hígado por la presencia de hepatomegalia dolorosa con aumento de las bilirrubinas totales, tanto de la fracción directa como indirecta y clásicamente, con aumentos leves a moderados de las transaminasas, con elevación en los valores de la fosfatasa alcalina, lo que ha sido interpretado como una alteración en los mecanismos excretores hepáticos más que una verdadera lesión necrótica tisular como se observa generalmente en las hepatitis virales.

En los pulmones se ha demostrado desde una neumonitis leve hasta hemorragia pulmonar masiva y síndrome de distress respiratorio del adulto. Es frecuente la insuficiencia renal severa, las leptospiras virulentas se adhieren a las células epiteliales renales y su unión es aumentada por la concentración subaglutinante de anticuerpos homólogos.¹¹

La leptospira es resistente a la actividad bactericida del suero normal, y en ausencia de anticuerpos específicos no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos.^{1, 22, 27} Solo son fagocitadas por macrófagos en presencia de anticuerpos específicos. La inhibición de la actividad de los macrófagos incrementa la sensibilidad a la infección, las espiroquetas se asocian a los neutrófilos pero no son eliminadas. La fagocitosis ocurre solamente en presencia de suero y complemento, sugiriendo que una capa externa de las leptospiras posee un componente antifagocitario.¹¹

Los niveles circulantes de complejos inmunes son correlacionados con la severidad de los síntomas. Se han demostrado anticuerpos antiplaquetarios, anticardiolipina y antineutrófilos citoplasmáticos. Además, el lipopolisacárido de las leptospiras induce apoptosis de linfocitos a través de TNFalfa.¹¹ Los macrófagos estimulados producen Interleucina 1 e Interferón y tienen una mayor actividad bactericida, medida por la prueba del NBT y la quimioluminiscencia.

El lipopolisacárido L-LPS de las leptospiras, estimula la adherencia de los neutrófilos a las células epiteliales y a las plaquetas causando agregación y sugiriendo su rol en el desarrollo de trombocitopenia es una complicación de gran relevancia, desencadena graves fenómenos inflamatorios que agreden a la célula endotelial y liberan citoquinas y potentes compuestos vasoactivos.⁶⁰ Esto se debe a que el lipopolisacárido (LPS) de las leptospiras patógenas, activa los macrófagos, linfocitos B y en menor medida a linfocitos T y células NK. Se ha observado una disminución transitoria de los linfocitos T CD4+, así como una expansión policlonal de los linfocitos B lo que sugiere una causa autoinmune por mimetismo molecular.

La plaquetopenia también es considerada en la génesis de los fenómenos hemorrágicos, siendo frecuentemente encontrada en las formas graves de la enfermedad. La agresión capilar parece representar el factor primordial en este proceso, cuyo sustrato de lesión es comprobada a la microscopía óptica y electrónica. Estas observaciones sugieren que las respuestas iniciales de la célula endotelial son la tumefacción acompañada de dilatación del retículo endoplásmico y el aumento de

volumen de las mitocondrias con aberturas de las uniones intercelulares. Las mitocondrias se encuentran dilatadas mientras que el retículo endoplásmico está aumentado en su tamaño, culminando con la necrosis celular como respuesta final. El compromiso endotelial puede iniciar la adhesión y la agregación plaquetaria, activando los mecanismos de coagulación y fibrinólisis.^{59,60}

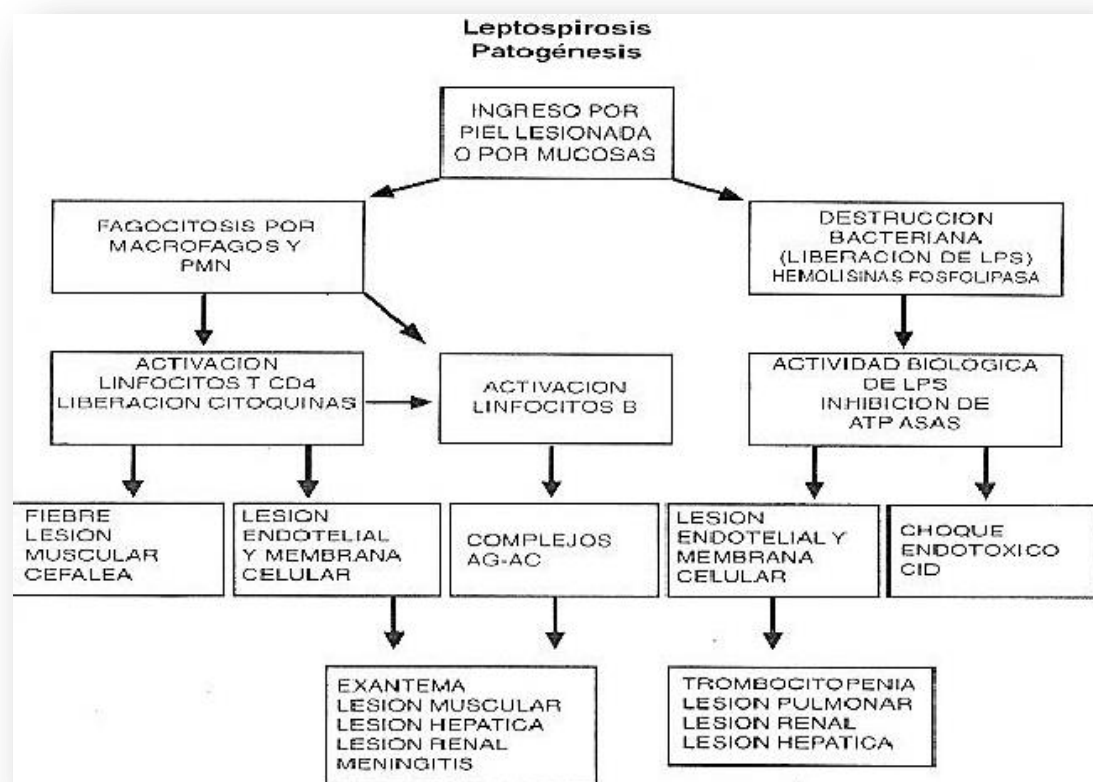
En la patogénesis del daño renal, citocinas proinflamatorias (TNF α e interleucinas) son liberadas e inducen inflamación a través de la generación de varios mediadores inflamatorios, vasoactivos y moléculas de adhesión. Linfocitos TH1 y TH2 están envueltos y producen una nefropatía inmune. La glomerulonefritis con depósito de IgM y C3 en el mesangio indican un mecanismo humoral y la inmunidad mediada por células es a través de la liberación de quimiocinas y citocinas que producen la migración de neutrófilos al glomérulo y al intersticio; los cuales luego son reemplazados por células mononucleares.^{11, 59}

En animales de laboratorio, los cambios morfológicos en riñones y en pulmones inducidos por variedades patógenas de leptospiras, son más severos en sujetos depletados de linfocitos T CD4+ y CD8+, lo que sugiere un papel protector importante de los mecanismos inmunológicos dependientes de células.

En algunos pacientes con leptospirosis severa se ha logrado identificar altas concentraciones de anticuerpos anticardiolipina de la clase IgG. Esto sugiere que la leptospira podría ocasionar una lesión endotelial, con la exposición de antígenos "crípticos" o con la producción de cambios conformacionales en los fosfolípidos por acción de fosfolipasas propias. Esto se debe a mecanismos inmunológicos, la producción de IgG, IgM e IgA como respuesta defensiva pueden originar la formación de inmunocomplejos circulantes, que depositados en tejidos causan daño (observado por microscopia electrónica).

En la **Figura 8** se esquematiza una propuesta de los eventos patogénicos en la leptospirosis, con el fin de entender mejor esta entidad clínica.

Se han realizado grandes avances en los últimos años para la comprensión de la patogénesis de la leptospirosis; no obstante, deben estudiarse con mayor profundidad los mecanismos de adhesión a las células eucariotas hospederas, los receptores celulares involucrados, los mecanismos por medio de los cuales se produce la lesión endotelial y celular en general así como los antígenos bacterianos involucrados en estos fenómenos, entre otras cosas.⁵⁹

Figura 8. Patogénesis .⁵⁹

2.4 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Las cepas principales (serovariedades) de *L. interrogans* aisladas de seres humanos o animales en partes diferentes del mundo (**Cuadro 2**) muestran parentesco serológico y también reactividad cruzada en los métodos serológicos; ello denota que existe notable “traslape” o puntos comunes de su estructura antigénica y se necesitan métodos cuantitativos y estudios de absorción de anticuerpos para llegar al diagnóstico serológico específico.

La célula de la espiroqueta está formada por un cilindro protoplasmático central de forma helicoidal, material nuclear, ribosomas, mesosomas y cuerpos de inclusión celular¹⁷ rodeado por una membrana citoplasmática (confiere estabilidad osmótica) y un axostilo que se disponen en forma de espiral.^{25,29} El axostilo consiste en dos filamentos axiales que se insertan en la extremidad del cuerpo citoplasmático, por medio de botones terminales^{19,62}, y extremos libres que se extienden hacia la mitad de la célula sin llegar a cruzarse. Este organelo es el encargado de la motilidad de la *Leptospira* y le confiere un movimiento activo de rotación. (**Figura 9**).^{25, 29}

CUADRO 2: Características principales de la leptospirosis.¹⁵

Serovariedad <i>Leptospira</i> <i>interrogans</i>	Animal que procede infección	del	Enfermedad en seres humanos	Manifestaciones clínicas	Distribución
<i>autumnalis</i>	?		Fiebre pretibial o del Fuente Braga	Fiebre, erupción sobre la tibia	EUA, Japón
<i>ballum</i>	Ratones		-----	Fiebre, erupción, ictericia	EUA, Europa, Israel
<i>bovis</i>	Ganado vacuno, ratones campestres		-----	Fiebre, postración	EUA, Israel, Australia
<i>canicola</i>	Orina perro	de	Ictericia infecciosa	Cuadro similar a influenza, meningitis aséptica	Nivel mundial
<i>grippotyphosa</i>	Roedores, agua		Fiebre marismas	de Fiebre, postración, meningitis aséptica	Europa, EUA, África
<i>hebdomadis</i>	Ratas, ratones		Fiebre séptimo día	Fiebre, ictericia	Japón, Europa
<i>icterohaemorrhagiae</i>	Orinas rata, agua	de	Enfermedad de Weil	Ictericia, hemorragias, meningitis aséptica	Nivel Mundial
<i>mitis</i>	Cerdos		Enfermedad de criadores de cerdos	Meningitis aséptica	Australia
<i>pomona</i>	Ganado porcino bovino	y	Enfermedad de criadores de cerdos	Fiebre, postración, meningitis aséptica	Europa, EUA, Australia

Adicionalmente esta bacteria tiene una estructura de doble membrana (**Figura 10**), con una membrana citoplasmática y una pared celular de peptidoglicano (Gram negativa) estrechamente relacionadas y rodeadas por una membrana externa multiestratificada rica en lípidos (20%), la bacteria presenta además peptidoglicano y, en algunos casos, ácido a,e –diaminopilémico.^{5, 25, 45} La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) altamente inmunogénicos, responsables de la especificidad de los serovares, que varían de una cepa a otra; dicha variación constituye la base de la clasificación serológica de las especies de *Leptospira*, también es el elemento que rige la especificidad en la respuesta inmunitaria del humano a las leptospirosis.^{1, 15, 38, 46, 62} tienen proteínas de membrana externa (OMP, por su sigla en inglés [*outer membrane proteins*])²³ (OmpL1, Omp85) que son altamente conservadas, constituye el sitio de interacción con el hospedero y al parecer participan en la patogénesis de la nefritis intersticial y en la respuesta inmune innata.²⁵

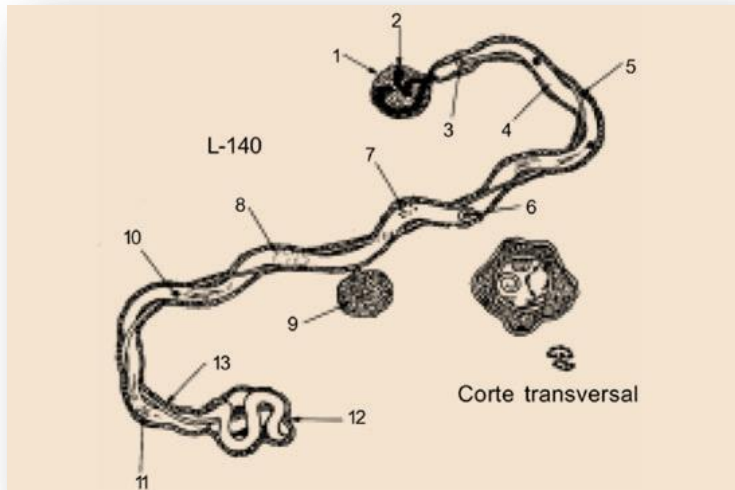


FIGURA 9. Esquema ultraestructural de leptospira: Formación terminal(1), apéndices terminales(2), gránulo basal(3), cilindro citoplasmático(4), filamentos axiales (5), estructura lamelar(6), inclusiones electronodensas(7), inclusiones permeables para electrones (8), formaciones globosas(9), inclusiones electronodensas (10), nucleoide-ADN (11), quiste (12), membrana externa (13). Corte transversal en marco.⁶⁴

En la membrana interna, recubierta por el peptidoglicano, se encuentran lipoproteínas Sec, SPasa I y II, LolCDE y el cuerpo basal del endoflagelo, un sistema de secreción tipo II que enlaza ambas membranas.

El principal componente de la *Leptospira* son los LPS, los cuales se expresan como antígenos (Ag) aglutinantes de la superficie de la bacteria.^{1, 38, 63} Además del LPS, proteínas estructurales y funcionales forman parte de la membrana

externa de estos microorganismos. Tres clases de proteínas de membrana externa (PME) se han identificado:

- Las lipoproteínas, que son la clase más abundante y comprenden LipL32, LipL41, LipL48, LipL36, LipL21, Qlp42.
- La proteína de transmembrana OmpL1.
- Las proteínas periféricas como LipL45)

También el sistema de secreción tipo dos (T2SS) el cual secreta GspD se localiza en la membrana externa y muestra propiedades antigénicas.¹

La reacción de aglutinación es una prueba estándar de referencia para la clasificación serológica, la cual se fundamenta en la identificación de los LPS.

En métodos como ELISA, la hemoaglutinación, la fijación de complemento y la inmunofluorescencia entre otros. Los Ag que participan casi siempre son similares o relacionados con los LPS.³⁸

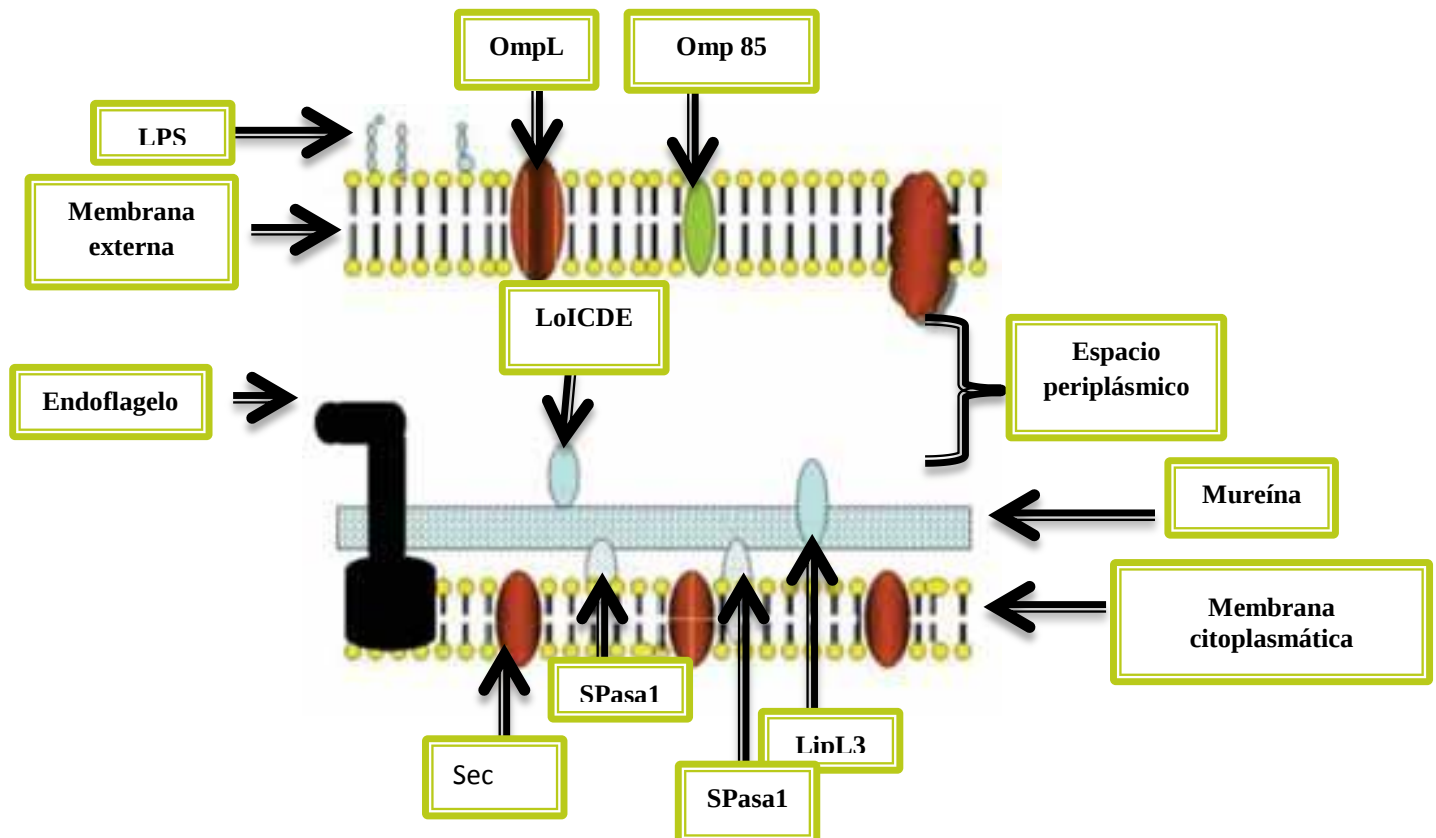


Figura 10. Estructura de la pared celular de *Leptospira* sp.⁶³

2.5 FACTORES DE PATOGENICIDAD

Los mecanismos por los cuales las leptospirosis causan enfermedad no son aún bien entendidos. Un número importante de factores de virulencia han sido sugeridos, pero con pocas excepciones, su rol en la patogénesis permanece poco claro.¹¹

La parte fundamental en el ciclo de vida de *Leptospira* es su capacidad para mantenerse en los túbulos renales de los animales que participan como reservorios. Para ello, se requiere de factores que intervienen en la motilidad y quimiotaxis bacteriana con el fin de que el patógeno alcance el blanco durante la infección.²⁵ Sus propiedades más importantes para la patogenia de la infección son los extremos del gancho (el factor de adhesión), dos flagelos periplásmicos que permiten la movilidad por los tejidos y la toxicidad celular.³⁹

Las manifestaciones clínicas y hallazgos histopatológicos corresponden en la leptospirosis a la acción de endotoxinas tipo Lipopolisacárido (LOS), hemolisinas, hemaglutininas, lipasas, fibrinolisin, fosfolipasas, proteínas superficiales de adherencia y enzimas que le confieren mayor patogenicidad,^{3, 18, 41, 53, 58, 65} las que facilitarían su ingreso al hospedero, las cuales son transportadas a la superficie bacteriana a través de sistemas de secreción I y II. Aunado a lo anterior, la bacteria genera un grupo de proteasas que degradan la matriz extracelular de los tejidos, colagenasas, metaloproteasas y varias termolisinas. Además de los sistemas de secreción mencionados, la *Leptospira* presenta numerosos transportadores ABC y proteínas de fusión.²⁵

La presencia de endotoxinas en la espiroqueta estimula a la producción de citocinas entre ellas el factor de necrosis tumoral (FNT). Este FNT, cuyo papel es decisivo en la mediación de la respuesta inflamatoria induce a la producción de otras citocinas de importancia en este proceso, tales como interleucina 1 y 6 (IL-1 e IL-6).⁶⁰

Asimismo se ha asociado patogenicidad con la producción de catalasa. Las leptospiras patógenas producen hialuronidasa la cual a su vez pudiera contribuir al alto grado de invasión por estos organismos.^{11, 29, 41} La presencia de esta hialuridasa se ha descrito en algunas serovariedades como *pomona* e *icterohaemorrhagiae*.³⁰

La invasión y multiplicación bacteriana, que provoca daño celular, tanto por el efecto mecánico, como por la producción de una proteína citotóxica, hallada en serovares *pomona* y *copenhageni* (**Figura 11**), que produce vasculitis capilar en todos los órganos y tejidos afectados, así como la producción de enzimas hemolíticas como fosfolipasa y esfingomielinasa C, afectan la fosfatidiletanolamina y esfingomielina de la membrana del eritrocito, comprobadas en serovares *ballum*, *hardjo*, *pomona* (**Figura 11**) y *tarasovi*. Y estas son las esfingomielinasas.^{1, 11, 29}

En la colonización, la bacteria produce dos familias de adhesinas no fimbriales. La primera tiene tres genes: *ligA*, *ligB* y *ligC*, que codifica para proteínas BIG (bacterial immunoglobulin-like) involucradas en la interacción hospedero-patógeno.

La segunda familia consiste en tres integrinas (alfa proteínas), cada una con siete secuencias repetidas, las que al parecer participan en las interacciones con el ligando.

A lo anterior se añade la posible participación de proteínas de membrana integral de *Leptospiras* (*OmpL1*, lipoproteínas, *LipL4* y *LipL32*) y proteína de membrana periférica (*P31LipL45*), algunas de ellas expresadas durante la infección de huésped.²⁵

En *Leptospira* se han encontrado genes involucrados en la biosíntesis de polisacárido capsular; sin embargo, no existen evidencias experimentales en la producción de cápsula, pero se supone que una sustancia parecida aun biofilm le permite colonizar densamente a los túbulos renales.

El peptidoglicano o mureína de *Leptospiras* patógenas se encuentra entre las moléculas que pueden activar al endotelio vascular e incrementar la adherencia de neutrófilos, lo que favorece la inflamación tanto local como sistémica.²⁵

Si bien el papel del lipopolisacárido (LPS llamado L-LPS (**Figura 12**) en la patogénesis de la enfermedad parece ser secundario, actúa intensamente en el desencadenamiento de graves fenómenos inflamatorios que agreden a la célula endotelial y liberan citoquinas y potentes compuestos vasoactivos²⁹ (el LPS es altamente inmunógeno y responsable de la especificidad de serovar, baja actividad endotóxica. Estimula la adherencia de neutrófilos a las células endoteliales y plaquetas).⁶⁵ Por su parte, el LPS favorece la expresión de TNF-alfa y por su



Figura 11. Exantema pretibial. Caso de leptospirosis febril anictérica causado por *L. pomona*.⁴⁵

intermedio bloquea la lipoproteína lipasa, lo cual lleva a incrementar los triglicéridos y las LDL colesterol y reducción de las HDL colesterol.²⁷

Otra acción resulta de la porción lipídica del glicolipoproteína (GPL), la cual es altamente citotóxica y ocasiona perforación de la membrana celular y la consecuente fuga citoplásmica y muerte. También inhibe la Na-K-ATPasa en forma dosis dependiente e incrementa su afinidad por sodio pero no por potasio, y esto explica las alteraciones iónicas observadas en leptospirosis que pueden traducirse en arritmias cardiacas.²⁷, como ejemplo se tiene la serovariedad canícola que inhibe la actividad de la bomba Na, K ATP a nivel renal.^{1,11,27}

Resultados como estos conducen a los investigadores a plantear que existe un alto grado de redundancia de proteínas de leptospirosis involucradas en la adherencia, supervivencia in vivo y la colonización renal, sugiriendo que será difícil identificar y definir los factores de virulencia responsables de la patogenia.¹

Es muy probable que las manifestaciones clínicas en la leptospirosis, más que directamente relacionadas con esas sustancias. Sean consecuencia de la acción de mediadores liberados por diversas células estimuladas, tales como el factor de necrosis tumoral, las prostaglandinas, endorfinas y múltiples citocinas.⁴⁶

Sin embargo, no ha sido posible aislar o identificar al componente tóxico producido por las leptospirosis.¹¹

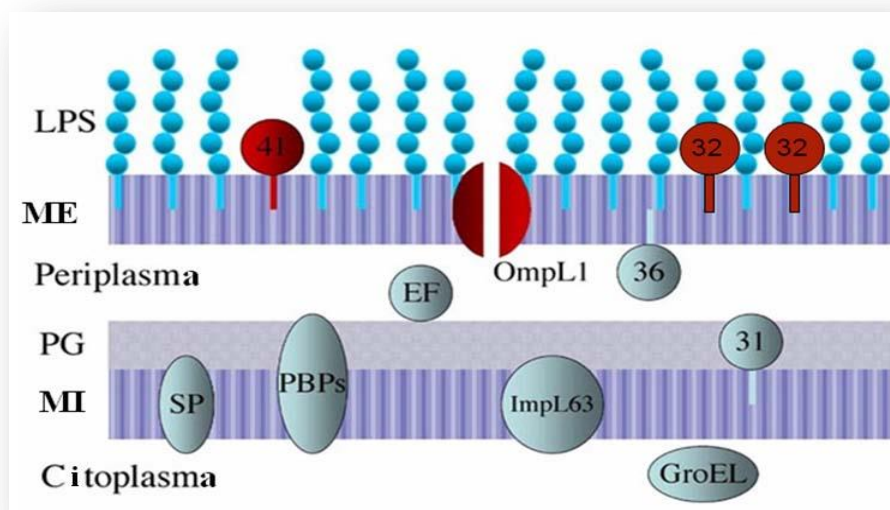


Figura 12. Arquitectura de la Membrana de Leptospira. LPS: Lipopolisacáridos, Proteínas: OmpL, LipL41, Lip32, LipL36, LipL31, ImpL63, proteínas de unión a penicilina (PBPs), proteínas de shock térmico y GroEL.⁶⁶

2.6 RESPUESTA DE ANTICUERPOS

La participación de la respuesta inmune frente a la presencia de *Leptospira* es de tipo humoral y se encuentra dirigida al serovar infectante; de ahí que la participación de anticuerpos específicos facilita la fagocitosis de la bacteria. Fenómeno que se pone en evidencia durante la segunda fase de la leptospirosis o también llamada inmune, durante la cual se produce la desaparición de *Leptospira* de circulación.²⁵

Los seres humanos reaccionan a una infección con leptospirosis con la producción de anticuerpos específicos anti *Leptospira*.

La seroconversión puede ocurrir de 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad pero algunas veces solo después de 10 días o incluso más.^{33, 44}

Ha sido demostrado que uno de los mecanismos que participa en la inmunidad a la leptospirosis es la producción de anticuerpos aglutinantes y opsonizantes, dirigido fundamentalmente contra los antígenos de la membrana externa como los lipopolisacáridos (LPS) y las proteínas.⁴⁴

Los anticuerpos IgM aparecen, generalmente, más temprano que los anticuerpos de clase IgG y, permanecen usualmente detectables por meses o aún años aunque a bajos títulos.³³

La detección de anticuerpos IgG es más variable; algunas veces pueden no ser detectables en absoluto o ser detectables por períodos relativamente cortos de tiempo, pero ocasionalmente pueden persistir por varios años.

Los anticuerpos son dirigidos contra:

- ⊕ Antígenos comunes (llamados antígenos género específicos) que son compartidos por todas las leptospirosis tanto patógenas como saprofitas.
- ⊕ Antígenos serovar específicos y serogrupos específicos.

Los pacientes con leptospirosis pueden producir anticuerpos que reaccionan con varios serovares. Este fenómeno, llamado reacción cruzada, se observa con frecuencia en la fase inicial de la enfermedad.^{33, 44}

Después de la enfermedad aguda, los anticuerpos que presentan reacción cruzada desaparecen gradualmente en la medida que el sistema inmune “madura”, usualmente en el curso de semanas o meses, mientras que los anticuerpos específicos para serogrupos y serovares pueden persistir por años.³³

Por tanto, los anticuerpos género específicos permanecen habitualmente detectables por meses y los anticuerpos serovar específicos por años.

Reacciones cruzadas débiles pueden ocurrir con otros grupos de microorganismos variando con el método serológico usado.

Ocasionalmente, los pacientes producen anticuerpos específicos que reaccionan solamente con antígenos ampliamente reactivos y poco o nada de anticuerpos serovar específicos puede ser detectado mientras otros pacientes, en cambio, pueden producir anticuerpos serovar específicos únicamente.³³

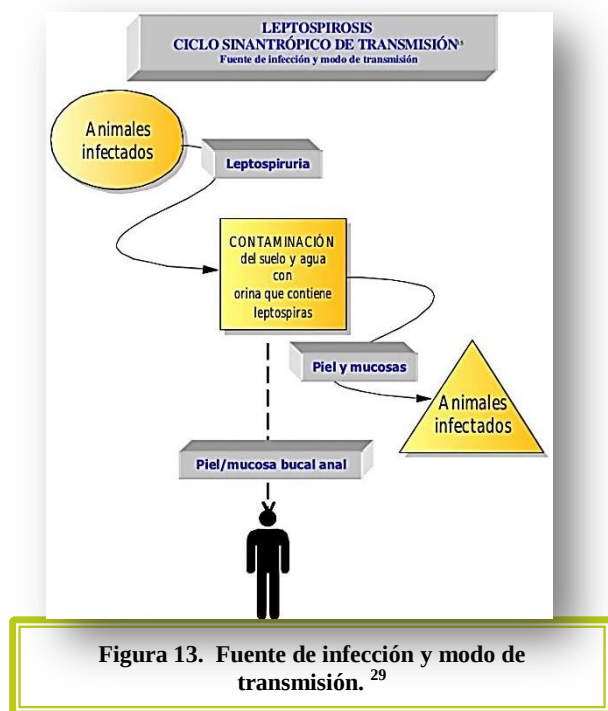
Anticuerpos provocados por la infección con un serovar particular no necesariamente protegen contra la infección con otros serovares.³³

La respuesta inmune celular en el paciente se encuentra suprimida, con reducción de linfocitos CD4⁺

2.7 TRANSMISIÓN

La leptospira no se multiplica fuera del huésped y su supervivencia depende de las condiciones ambientales en las que se encuentren por ejemplo, condiciones del suelo y agua (**Figura 13**).⁶ La leptospira comienza a excretarse en orina aproximadamente después de la tercera semana de inicio de síntomas.⁵³

El agua constituye un importante vehículo de transmisión de leptospirosis, tanto para animales como para el humano. El hombre es un huésped accidental que se infecta directamente con orina, fetos, abortos y secreciones uterinas de animales infectados por leptospirosis, e indirectamente con el agua de lagunas, acequias, ríos, charcos y otros, con suelo húmedo y vegetación contaminada con orina infectada, que pueden entrar al cuerpo a través de cortaduras o abrasiones en la piel, por las membranas mucosas intactas (nasofaríngea, bucal, genital, o conjuntival) y, probablemente, a través de piel que ha permanecido por mucho tiempo sumergida en el agua,^{6, 16,18, 19,29, 31, 32,33, 35, 48,51, 52, 53,55, 60,62, 67, 68,69} también, por inhalación de líquidos contaminados en forma de gotitas de aerosol que contengan la bacteria.^{8, 34, 36, 42} Excepcionalmente, se ha documentado transmisión sexual y transplacentaria y la infestación por ingestión de agua contaminada.⁴



La infección de humano a humano ocurre raramente por relaciones sexuales, por vía transplacentaria de la madre al feto y por la leche materna.^{10, 18, 26,36, 55} La orina de un paciente con leptospirosis debe ser considerada infecciosa,¹⁸ las leptospirosis se excretan en la orina, aproximadamente, durante un mes.⁵³

En el hombre se le considera como un padecimiento de tipo ocupacional, ya que es más frecuente en agricultores, ganaderos, porcicultores, trabajadores de la industria de la carne y la leche, procesadores de pescado y de aves, cazadores, trabajadores agrícolas (cañeros y arrozales), médicos veterinarios, soldados, trabajadores del alcantarillado, pisciculturas y mineros; sin embargo puede ocurrir en personas ajenas a las

actividades antes mencionadas.^{55, 69}

La temperatura del agua tiene un efecto beneficioso, ya sea baja o alta. Las bajas disminuyen la multiplicación de los microorganismos, pero el tiempo de supervivencia aumenta y las altas temperaturas favorecen la multiplicación, pero con menos tiempo de supervivencia. Esto permite que la Leptospiras pueda sobrevivir y mantener sus capacidades infectantes en el agua durante 22 días y en el lodo 5 o 6 días.⁴²

Muchas infecciones se deben al contacto con la orina de los animales infectados, quienes constituyen reservorios de la enfermedad, siendo el pH el factor determinante de la supervivencia de las leptospirosis en la orina. Por tales razones, algunos autores plantean que la orina del hombre y la de los ratones y ratas no son fuentes de excelencia para la infección a no ser que sean diluidas. La orina de los bovinos se considera como la de mayor excelencia para una fuente de infección ya que su orina es de pH alcalino lo que favorece la supervivencia del germen y en 1 mL de orina puede contener hasta 100 millones de Leptospiras.^{6, 42} No se sabe con precisión cuándo las Leptospiras aparecen en la sangre después de la infección. Es posible que, durante el período de incubación, antes de que la persona infectada se enferme, estas puedan circular en la sangre y ser transmitidas por transfusión sanguínea.¹⁸

Las variaciones en los ecosistemas, ya sea por el clima, las migraciones, invasión de selvas vírgenes o las actividades socioculturales de la población, cambian las interacciones entre los seres vivos y modifican las condiciones medioambientales, lo cual afecta notablemente a las poblaciones de reservorios y modifican la transmisión de la leptospirosis.²³

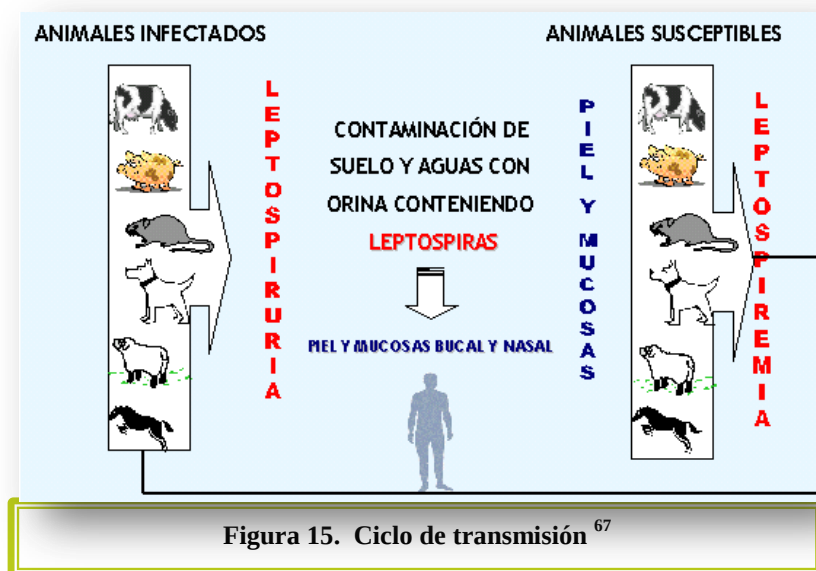
Para entender mejor la transmisión de la leptospirosis, Faine et al. propone tres modelos epidemiológicos:

- ★ El primero ocurre en climas templados donde son pocos los serovares que están involucrados en la infección humana y generalmente es por contacto directo con ganado y cerdos. El control se realiza por inmunización de animales humanos.
- ★ El segundo ocurre en áreas tropicales donde hay muchos serovares que infectan a humanos y animales, además hay un gran número de reservorios como los roedores, animales de granja y perros. La exposición humana no está limitada a la ocupación sino a la contaminación medioambiental, en especial durante la época de lluvias (**Figura 14**). El control se realiza en roedores, mejorando el saneamiento en estas áreas e higiene profesional para prevenir los casos de leptospirosis humana. Posiblemente son áreas donde ocurran los grandes brotes después de diluvios, huracanes u otros desastres.
- ★ El tercer modelo se da cuando la infección en los roedores es llevada al ambiente urbano (**Figura 15**). Es un caso importante cuando la infraestructura urbana se rompe debido a la guerra o por catástrofes naturales, es rara en países desarrollados.^{23, 51}

Numerosos factores ambientales intervienen en la reemergencia de enfermedades como la leptospirosis: los cambios climáticos, en particular las intensas lluvias, el crecimiento demográfico con urbanización descontrolada hacia zonas periféricas sin saneamiento, presencia de basurales, criaderos clandestinos de animales, construcción de viviendas precarias en terrenos inundables que llevan a trasladar la presencia de las leptospirosis a zonas suburbanas e incluso urbanas.⁶⁰



Los perros son una fuente importante para la infección humana en muchos países tropicales y puede ser una fuente importante para el inicio de brotes.²³



2.7.1 Período de transmisibilidad

Las *Leptospiras* en humanos se eliminan por la orina (leptospiruria) generalmente a partir de la 2da a la 5ta semana de la enfermedad. En los animales reservorios y hospederos accidentales pueden eliminarse a través de la orina durante meses o años,^{33, 48} en el humano es de hasta once meses después de la enfermedad.⁵¹

Un estudio efectuado en Chiapas, México, reveló que la prevalencia de Leptospirosis en una comunidad rural fue de 37.7% y que las personas que presentaron soluciones de continuidad dérmica tuvieron 3.2 veces más riesgo de padecer Leptospirosis con respecto a las que tenía la piel íntegra (4.2 [IC 95% 3.1 5.7]). (2008)⁶⁹

2.7.2 Susceptibilidad y resistencia

La susceptibilidad en el hombre es general, independiente del sexo y edad. Existe inmunidad homóloga al serovar (serotipo) causante, pero puede repetirse la enfermedad debido a otros serovares. La inmunidad adquirida es, pues, serotipo-específica, no confiriéndole protección permanente.^{34, 48, 51}

Si bien la enfermedad tiene una mayor incidencia en el sexo masculino, en la franja etaria entre 20 y 40 años, esto no se debería a ningún elemento de orden anatómico o fisiológico, sino que se vincularía con la exposición a situaciones de riesgo.⁵¹

3 DESCRIPCIÓN DE ÓRGANOS Y SISTEMAS AFECTADOS

Durante el proceso de invasión las bacterias pueden viajar a través del torrente sanguíneo a otras partes del organismo. La leptospirosis puede ser considerada como una enfermedad generalizada, sistémica, se difunde rápidamente la bacteria a la sangre (el microorganismo se multiplica en el torrente sanguíneo), y después de 48 horas se la encuentra en todos los humores y tejidos, donde dañan el endotelio vascular de vasos pequeños.^{1, 2, 47} Puede afectar diversos órganos y sistemas por ejemplo los mostrados en la **Figura 16.**¹⁸

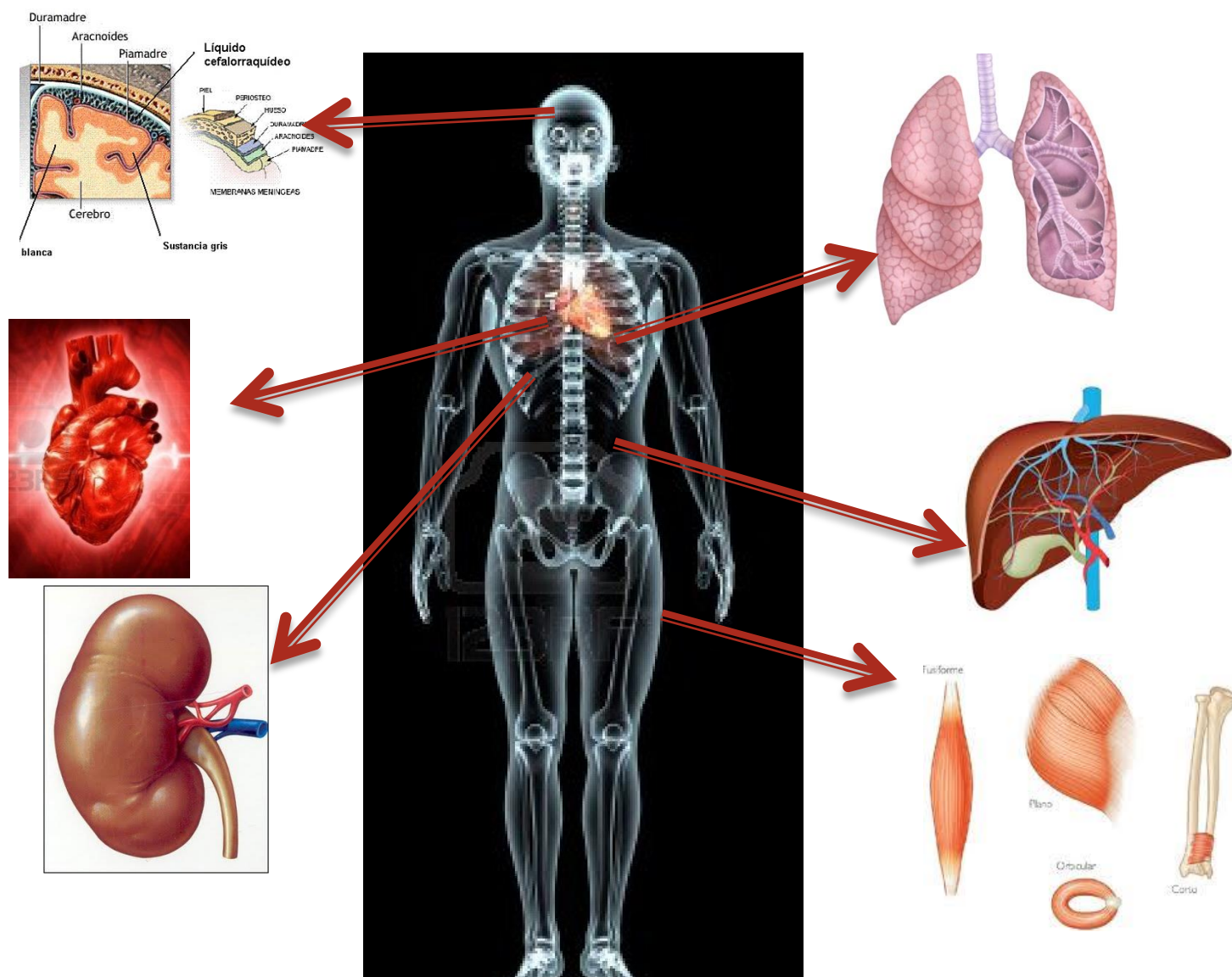


Figura 16. Patogénesis de *L. interrogans*.⁷⁰

A continuación se describen los órganos y sistemas que se ven afectados dando un panorama general de ellos.

3.1 RIÑÓN

Los sistemas renal y urinario están constituidos por un grupo complejo de órganos que en conjunto se encargan de filtrar los productos residuales de la sangre y de fabricar, almacenar y eliminar la orina. Estos órganos son esenciales para la hemostasia, ya que mantienen el equilibrio hídrico, el equilibrio ácido-básico y la presión arterial. Los órganos fundamentales del sistema nefrouinario son los dos riñones y la vejiga urinaria.⁷¹

El riñón humano es un órgano complejo cuya función consiste en filtrar los productos residuales de la sangre y producir orina. Los dos riñones desempeñan además otras funciones vitales, como el mantenimiento de la homeostasia y la regulación de la presión arterial, la presión osmótica y el equilibrio ácido-básico (**Figura 17**).



Figura 17. Riñón⁷²

Los riñones se sitúan a ambos lados de la columna vertebral en la parte inferior de la espalda. Cada uno de ellos pesa unos 150 g y tiene aproximadamente el tamaño de una naranja.⁷¹

Las anomalías de la función renal en la leptospirosis pueden ser profundas y desproporcionadas con respecto a los cambios histológicos observados en el riñón.

Esta puede darse como excepción aisladamente, o mucho más frecuentemente integrarse a la ictericia.⁵¹

El comprometimiento renal puede manifestarse en una amplia gama de grados que incluye desde simples alteraciones del sedimento urinario hasta cuadros gravísimos de insuficiencia renal aguda con patrón de nefrosis hipoxémica. Este último compromiso representa la principal causa de óbito.^{4, 29, 60}

La insuficiencia renal es primariamente el resultado del daño tisular y es habitual encontrar leptospiras en la luz tubular. La causa principal de la lesión tubular parece ser la hipoxemia o algún efecto tóxico directo de las leptospiras. Las alteraciones inflamatorias en el riñón pueden observarse en los estadios más tardíos del desenvolvimiento de la lesión renal y en un caso se asociaron con inmunocomplejos circulantes y depósitos de componentes del complemento y cuerpos electrodensos en los glomérulos sugestivos de glomerulonefritis por inmunocomplejos. La hipovolemia y la hipotensión causadas por la pérdida de volumen intravascular como resultado de lesión endotelial, pueden contribuir al desenvolvimiento de la insuficiencia renal.

Las lesiones renales parecen iniciarse dentro de los glomérulos durante la migración de las leptospiras, luego surgen las alteraciones túbulo intersticiales causadas también por la migración de dentro de los capilares peritubulares para el intersticio y

túbulos, responsabilizándose por el compromiso renal que puede variar de simple disminución de la función glomerular hasta insuficiencia renal.^{29, 60}

3.2 HÍGADO

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo (**Figura 18**). Es de color marrón rojizo, pesa tres libras aproximadamente (1,300 Kg) en los varones adultos y tiene el tamaño de una pelota de fútbol americano. Está situado bajo las costillas en la parte superior derecha del abdomen. El hígado tiene la particular capacidad de regenerar su propio tejido: puede perder hasta las tres cuartas partes del mismo y volver a su estado original e incluso ampliar su tamaño original en unas pocas semanas.⁷³

Presenta un abundante suministro sanguíneo: cerca de 1 litro y $\frac{1}{2}$ de sangre fluyen a través de este órgano cada minuto. Recibe sangre rica en oxígeno a través de la arteria hepática. La vena porta lleva hasta el hígado sangre que contiene nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas en los intestinos. El hígado filtra esta sangre y después la envía al corazón mediante la vena hepática.

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas.⁷³

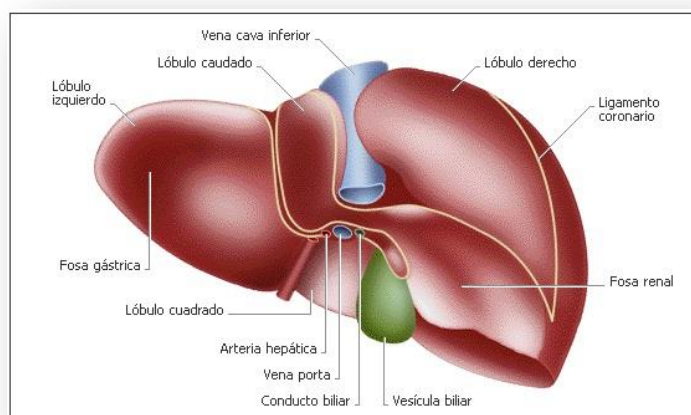


Figura 18. Hígado: vista posterior⁷⁴

En la leptospirosis la ictericia y la hepatomegalia son las manifestaciones principales de las alteraciones hepáticas. Ocurre en los casos más graves y se debe primariamente a la disfunción hepatocelular, habitualmente sin necrosis. El daño hepático en apariencia es subcelular y las leptospiras rara vez se observan en el hígado.

En los casos graves la ictericia es muy intensa y tiene su mecanismo de producción todavía en discusión. Sin embargo parece importantes la hemólisis el daño hepatocelular y la colestasis intrahepática. La insuficiencia renal y la reabsorción de hemorragias parecen factores coadyuvantes. Para algunos autores la disminución funcional de la célula hepática representa el factor primordial en el proceso.

La ictericia sería resultante de la agresión hepática aunque la necrosis hepatocelular no sea prominente, concordando con los valores poco elevados de las transaminasas séricas. De Brito por medio de microscopía electrónica hepática admite que los defectos básicos se encuentran en la captación (lesión del polo sinusoidal) conjugación (depleción de los gránulos de ribonucleína) y la excreción de la bilirrubina (alteraciones mitocondriales de los ductos biliares), con predominancia de la lesión en la última fase La ictericia en los casos graves es muy intensa, y puede presentar una coloración anaranjada por lo que se le denomina cúprica o rubínica. Ella se produce por la asociación entre la impregnación bilirrubínica, amarilla y la dilatación y hiperpermeabilidad vascular que resulta en congestión y hemorragia.^{29, 60}

3.3 CORAZÓN

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y los vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares. Se trata de un sistema de transporte en el que una bomba muscular (el corazón) proporciona la energía necesaria para mover el contenido (la sangre), en un circuito cerrado de tubos elásticos (los vasos).⁷⁵

El corazón (**Figura 19**) es un órgano musculoso formado por 4 cavidades. Su tamaño es parecido al de un puño cerrado y tiene un peso aproximado de 250 y 300 g, en mujeres y varones adultos, respectivamente. Está situado en el interior del tórax, por encima del diafragma, en la región denominada mediastino, que es la parte media de la cavidad torácica localizada entre las dos cavidades pleurales. Casi dos terceras partes del corazón se sitúan en el hemitorax izquierdo.

El corazón tiene forma de cono apoyado sobre su lado, con un extremo puntiagudo, el vértice, de dirección anteroinferior izquierda y la porción más ancha, la base, dirigida en sentido posterosuperior.⁷⁵

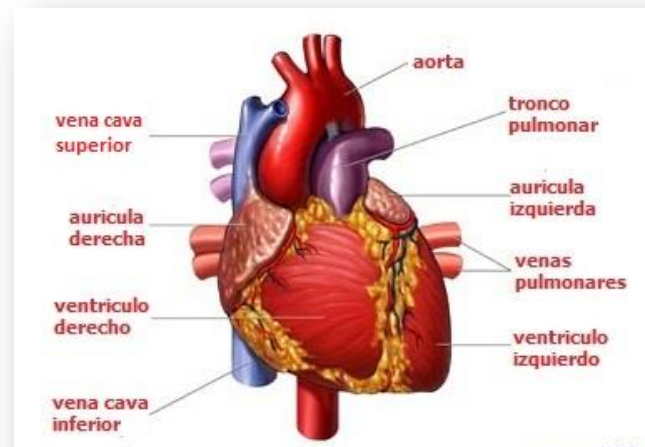


Figura 19. Corazón humano.⁷⁶

En el aparato cardiovascular pueden aparecer manifestaciones tan simples como alteraciones en el trazado electrocardiográfico o hasta graves complicaciones clínicas seguidas de muerte. Varios factores son incriminados como responsables por la agresión miocárdica, entre ellos la acción directa de las leptospira o sus productos tóxicos o las alteraciones inmunopatológicas y las metabólicas. En un estudio experimental De Brito demuestra la existencia de antígeno de leptospira en la luz y adosado a la pared de vasos miocárdicos, fortaleciendo la idea de que el microorganismo lesionaría directamente a la célula endotelial, ocasionando anoxia e muerte de la fibra miocárdica.^{29,60}

3.4 PULMÓN

El pulmón es un órgano par, rodeado por la pleura. El espacio que queda entre ambos recesos pleurales, se denomina mediastino, ocupado por órganos importantes como el corazón, el timo y los grandes vasos.

Cada pulmón tiene forma de un semicono irregular con una base dirigida hacia abajo y un ápice o vértice redondeado que por delante rebasa en 3 - 4 cm el nivel de la I costilla o en 2 - 3 cm el nivel de la

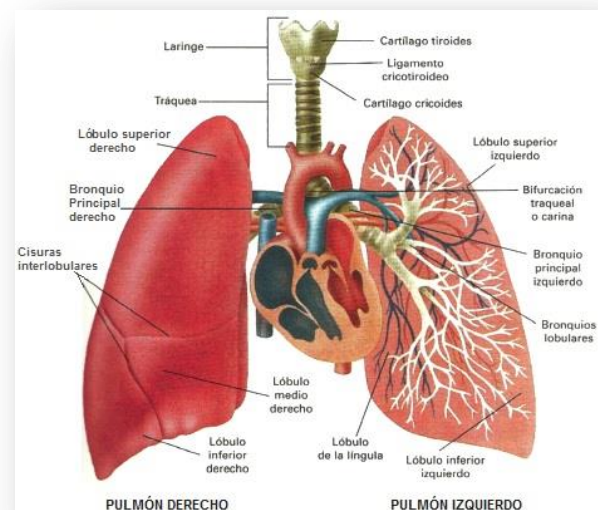


Figura 20. Pulmón⁷⁸

clavícula, alcanzando por detrás el nivel de la VII vértebra cervical.⁷⁷

Los pulmones (**Figura 20**) se componen de lóbulos; el derecho tiene 3 (superior, medio e inferior) y el izquierdo tiene 2 (superior e inferior). Cada lóbulo pulmonar recibe una de las ramas bronquiales que se dividen en segmentos, los que a su vez están constituidos por infinidad de lobulillos pulmonares. A cada lobulillo pulmonar va a para un bronquiolo, que se divide en varias ramas y después de múltiples ramificaciones, termina en cavidades llamadas alveolos pulmonares.⁷⁷

La agresión pulmonar en la es poco frecuente en nuestro medio, confieren especial gravedad a la enfermedad, se manifiesta en su forma más grave por un cuadro de neumonía hemorrágica, con un compromiso hemorrágico traqueal, intersticial e intraalveolar, que se traduce en hipoxia, insuficiencia respiratoria y en ocasiones, hemoptisis.

Esta insuficiencia respiratoria, a los efectos de homologar definiciones, puede ser catalogada como un cociente $paO_2/FiO_2 < 300$ y/o un gradiente alvéolo/arterial de $O_2 > 20\text{mmHg}$.

En 80 a 85% de los casos con hemoptisis la radiología de tórax demuestra infiltrados retículo-nodulares, parece relacionarse con la acción directa de una toxina sobre la pared capilar.^{4, 51, 60}



Figura 21. Pulmón dañado.⁷⁸

Las lesiones son observadas con mayor frecuencia en la periferia y bases pulmonares como consecuencia de la abundancia de capilares y mayor vigor de los movimientos respiratorios de esas áreas (**Figura 21**).

Esta grave agresión pulmonar puede en la realidad resultar en una reacción de Herxheimer, desencadenada por la liberación de lipopolisacáridos de la pared celular de la leptospira.⁶⁰

3.5 MENINGES

El sistema nervioso central está recubierto por tres membranas de tejido conjuntivo, las meninges (**Figura 22**):

- ✎ Duramadre, la membrana más externa.
- ✎ Aracnoides, la membrana intermedia, bajo la duramadre.
- ✎ Piamadre, la membrana más interna en íntimo contacto con la superficie del sistema nervioso central.

Duramadre

- ✚ Es una membrana gruesa formada de tejido conjuntivo denso. La duramadre raquídea se encuentra en el canal vertebral y encierra en su interior a la médula espinal.

Aracnoides

- ✚ Esta membrana tiene dos componentes. La capa más externa o capa aracnoidea está formada por células muy agrupadas, cuyo espacio intercelular es casi nulo y muy abundante en uniones estrechas y desmosomas.⁷⁹

Piamadre

- ✚ Es una delicada lámina de tejido conjuntivo formada de fibroblastos planos modificados que se adosan a la superficie del encéfalo y médula espinal. Estas células tienen gran parecido a las células aracnoideas trabeculares. La piamadre contiene gran cantidad de vasos sanguíneos y se continúa con su capa peri vascular. Entre las células de la piamadre y el tejido nervioso existen pequeñas fibras de colágeno y elastina.

Espacios Meníngeos

En anatomía y en clínica suele nombrarse un espacio subdural, sin embargo, no existe espacio real entre la duramadre y la aracnoides. El espacio subaracnoideo se ubica entre la aracnoides y la piamadre. Este es atravesado por las trabéculas aracnoideas y contiene el líquido cefalorraquídeo (LCR).⁷⁹

El compromiso meníngeo varía entre 5 y 37%, excepcionalmente la puede presentarse como una meningitis aguda a LCR claro sin otros elementos acompañantes. La participación meníngea, más habitualmente, acompaña al síndrome pseudogripal o a la ictericia y falla renal. Se presenta con cefaleas intensas, vómitos, signos de irritación meníngea, foto y acusofobia y rigidez de nuca.^{47, 51} Ocurre en la fase inmune y se traduce en alteraciones del examen citoquímico del LCR, con un patrón de meningitis linfocitaria.⁴⁷

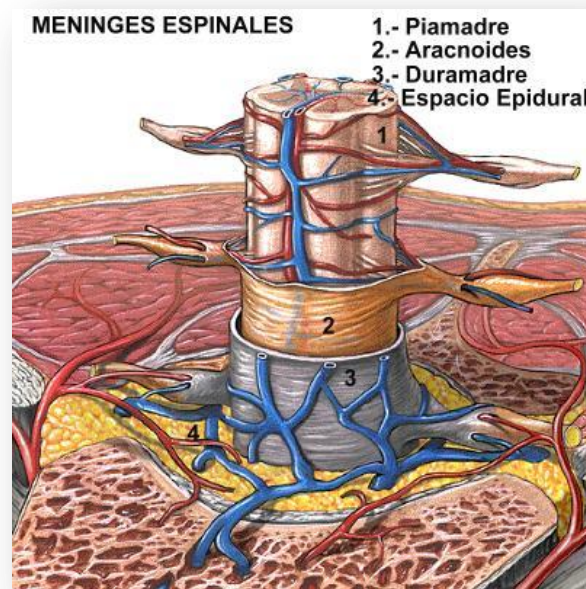


Figura 22. Meninges espinales.⁸⁰

CAPÍTULO 4

4 CUADRO CLÍNICO

La Leptospirosis es llamada también enfermedad de Weil, fiebre canícola, ictericia espiroquética, fiebre de los arrozales, fiebre de los nadadores, enfermedad de los porqueros o fiebre de los cañaverales. Y es causada por una espiroqueta del género *Leptospira* (*Leptospira interrogans*) que causa una diversidad de síntomas clínicos tanto en el ser humano como en animales (**Figura 23**).^{19, 46, 81}

La infección se adquiere a través de la piel y mucosas; las leptospiras tienen la propiedad de atravesarlas estando incluso intactas, aunque lo hacen más fácilmente si están maceradas o presentan alguna solución de continuidad.⁴⁰



Figura 23. Infección.⁸²

Al instalarse las leptospiras en el organismo, se disemina por vía hemática, esta fase es breve y va seguida por una rápida proliferación, después invaden el sistema linfático originando una discreta hipertrofia de los ganglios satélites correspondientes a la zona de penetración del germen en sangre.^{40, 51}

El periodo de incubación de la leptospirosis es de 10 días, con mínimo de 2 y máximo de 20 – 26 posteriores a la infección,^{18, 32, 35, 40, 46, 51, 53} con un término medio de entre 10 y 14 días, este periodo esta en relación a la magnitud del inóculo. La persistencia en torrente circulatorio, el poder patógeno de la cepa y por último a factores predisponentes intrínsecos del huésped.^{18, 30, 40, 58} (Otros autores reportan un periodo de incubación 5 -14 días, con un rango entre 2 y 30 días^{10, 33, 34, 54, 81}).

Es una enfermedad infecciosa de cuadro polimórfico. Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son muy variables, como se observa en el **Cuadro 3**, los síntomas y

signos más frecuentes son fiebre (100%), mialgias intensas que afectan pantorrillas y muslos (71 a 92%), cefalea (85 a 99%), exantema, manifestaciones gastrointestinales, como vómitos, alteraciones del tránsito y dolor abdominal (17,2 a 62,3%), inyección conjuntival (36,3 a 77,2%) y síndrome meníngeo (19,4 a 22,7%, en la segunda semana de evolución).^{4,27, 33, 48,53,81}

CUADRO 3: Frecuencia de síntomas y signos de leptospirosis en diversas series clínicas (%).

Síntomas	Chile 1960 (n: 110) (ref 13)	E.U.A. 1965 (n: 483) (ref 29)	Vietnam 1973 (n: 150) (ref 28)	Chile 1985 (n: 36) (ref 6)
Fiebre	100	100	97	100
Cefalea	99	77	98	85
Mialgias	71	68	79	92
Calofríos	—	—	78	39
Náuseas /vómitos	64	60	41	47
Dolor abdominal	48	30	28	22
Constipación	35	6	—	33
Diarrea	17	15	29	30,5
Tos	—	23	20	8,3
Signos				
Inyección conjuntival	36,3	33	42	77,2
Signos meníngeos	22,7	37	12	19,4
Ictericia	7,2	43	1,5	19,4
Hepatomegalia	12,2	18	—	8,3
Epistaxis	19,1	3	—	8,3
Esplenomegalia	10,9	5	22	5,6
Exantema	5,5	9	7	5,6

La leptospirosis puede presentarse con diferentes formas, grados y combinaciones de compromiso orgánico, ya sea como un cuadro febril inespecífico autolimitado, como afección preferente de uno o más órganos involucrados, o como una enfermedad grave con compromiso multiorgánico y alta letalidad.

Clásicamente, se describe como una enfermedad febril bifásica (**Figura 29**), en que la mayor parte de las manifestaciones clínicas se observan durante el período septicémico, en la primera semana de evolución. La meningitis, en cambio, aparece concomitantemente con la nueva onda febril, en la segunda semana del curso clínico (período inmune).

Estas manifestaciones clínicas se pueden agrupar, constituyendo las formas clínicas clásicamente descritas, como se señala en el **Cuadro 2**. En 52,8% de los casos observamos alguna evidencia de compromiso específico de uno o más órganos, y en 47,2%, un síndrome febril inespecífico (**Figura 20**). En esta serie no se observó compromiso pulmonar. La forma clínica más grave, clásicamente llamada enfermedad de Weil, con compromiso multisistémico: hepático, renal, hemorrágico, meníngeo, y eventualmente pulmonar, es poco frecuente (5 a 10% de las personas infectadas), y se ha visto asociada con mayor frecuencia a *L. icterohemorrágica*.⁶⁸

Estos síntomas son paralelos con la fase leptospirémica y se autolimitan 7 a 10 días más tarde con el inicio de la fase inmune (segunda semana). Un 10% de los pacientes

viran a un curso agresivo con aparición de hemorragia por piel y mucosas, ictericia, coluria, oliguria o anuria, fracaso renal agudo, inestabilidad hemodinámica e insuficiencia respiratoria debido a hemorragia alveolar difusa.⁸¹

No existe ningún cuadro clínico que sea característico de la enfermedad, por lo que siempre la sospecha clínica de la enfermedad debe ser confirmada mediante pruebas de laboratorio.

Típicamente, la enfermedad presenta cuatro categorías clínicas amplias:

1. Una enfermedad leve de tipo pseudogripal
2. Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias.
3. Meningitis/meningo-encefalitis
4. Hemorragia pulmonar con falla respiratoria.^{18, 33,45, 83}

El diagnóstico clínico es difícil por esta presentación variada y no específica; su confusión con otras enfermedades, p.ej. dengue y otras fiebres hemorrágicas, es particularmente común en los trópicos, además, las presentaciones clínicas se pueden superponer en la medida en que la infección progresa.³³

4.1 SÍNDROMES ESPECÍFICOS DE LA LEPTOSPIROSIS

4.1.1 Enfermedad de Weil

Es la forma más grave y se caracteriza por ictericia, oliguria, colapso circulatorio y tendencia hemorrágica. La ictericia y otros signos de disfunción hepática aparecen temprano, como durante la tercera semana, o tardíos, durante la novena semana de la infección.^{28,84}

No hay uniformidad de opinión en cuanto a si este síndrome es producido por la repuesta inmunológica o por acción tóxica. Las personas de mayor edad están predispuestas a presentarlo.⁸⁴

Sus características especiales se empiezan a presentar desde el tercero hasta el séptimo día.⁴⁷ La fiebre cede alrededor del séptimo día, pero no hay verdadera mejoría clínica. El paciente presenta ictericia y hepatomegalia dolorosa. Las transaminasas glutámico oxaloacéticas aumentan dos o tres veces su valor normal, pero las bilirrubinas suben notablemente. Al mismo tiempo aparecen las manifestaciones del trastorno renal. Hay oliguria, proteinuria, hematuria e hiperazoemia.^{47, 84}

El daño renal consiste en necrosis tubular aguda. La mayor elevación de la urea se observa alrededor del séptimo día.

Las manifestaciones hemorrágicas incluyen:

- ✚ Epistaxis
- ✚ Hematemesis
- ✚ Neumonitis hemorrágica
- ✚ Hemorragias suprarrenales y subaracnoideas

Se considera que estas se deben a vasculitis difusa. El serotipo que produce este cuadro clínico es *L. icterohaemorrhagiae*.⁸⁴

4.1.2 Leptospirosis anictérica

El cuadro clínico se inicia bruscamente con fiebre alta, cefalea, dolor muscular severo, escalofrío, náusea, vómito, dolor abdominal, postración.

Existen otras manifestaciones clínicas, principalmente meningitis aséptica pero no existe ictericia.⁸⁴

4.1.3 Meningitis aséptica

Alrededor de un 10 % de las meningitis asépticas son causadas por la leptospirosis y puede ocurrir también encefalitis. El número de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo oscila entre 100 y 1000 y la reacción puede ser mononuclear o de neutrófilos. El contenido de glucosa es normal y las proteínas se elevan moderadamente, hasta 100 mg por mL. El líquido es xantocrómico, si hay ictericia. Los serotipos que son mayor frecuencia producen este síndrome son: *L. canícola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*.⁸⁴

El cuadro clínico se caracteriza por:

- 👤 Fiebre alta
- 👤 Cefalea
- 👤 Rigidez de nuca
- 👤 Trastornos de la conciencia
- 👤 Mialgias

Su duración es de 10 días aproximadamente, al cabo de los cuales hay recuperación total.

4.1.4 Fiebre pretibial de Fort Bragg

Este síndrome se observó en Carolina del Norte en el periodo de 1942-1944. Se inicia con:

- 💧 Escalofríos
- 💧 Malestar
- 💧 Cefalea
- 💧 Fotofobia
- 💧 Fiebre alta

Al cuarto día de la enfermedad aparece la erupción características que consiste en lesiones eritematosa, levemente elevadas, de 2 a 5 cm de diámetro, localizadas simétricamente sobre las regiones pretibiales. Esta erupción se generaliza en algunos casos. La esplenomegalia aparece en el 95% de los casos. Se debe al serotipo *L. autumnalis*,⁸⁴ aunque parece que ha habido asociación con el serotipo *pomona*.²⁹

La leptospirosis durante la gestación puede verse asociada a aumento de riesgo de pérdida del producto.

Con frecuencia, al alta del paciente, se observan atrofia muscular y anemia.²⁹

4.1.5 Miocarditis

Es otra de las complicaciones de la leptospirosis. Se presenta con dilatación cardíaca y arritmias como fibrilación auricular, aleteo, taquicardia ventricular, extrasístoles

ventriculares. La miocarditis se asocia con las manifestaciones más graves de la enfermedad como neumonitis, ictericia, lesión articular, etc.⁸⁴

4.2 FORMAS CLÍNICAS DE LEPTOSPIROSIS

★ **Anictérica**

★ **Ictérica.**

4.2.1 FORMA ANICTÉRICA

❖ Leve

Es la forma más común la leptospirosis, adopta el aspecto clínico de un síndrome febril anictérico. La enfermedad puede ser discreta, con fiebre, cefalea, dolores musculares, anorexia, náuseas y vómitos, de inicio generalmente súbito. Es la más frecuente de 85 a 90%, erróneamente se le diagnostica como influenza, dengue y arbovirosis. Con duración de uno o varios días, siendo frecuentemente catalogada como “síndrome febril”, “virosis”, “síndrome meníngeo”.^{30,48}

❖ Severa

Una infección más grave puede ocurrir, presentándose clásicamente como una enfermedad febril bifásica, que consiste en una fase septicémica inicial y otra inmune secundaria.^{8,11, 24,29, 33,35,}

4.2.1.1 Fases de la enfermedad

1ª Fase o leptospirémica

La ruta de infección comúnmente es a través de la mucosa nasal, oral, conjuntiva y abrasiones de la piel.⁶⁷ Se caracteriza porque las leptospiras se encuentran en la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR).^{13, 24,38}

El periodo de incubación de la enfermedad humana es de 8 a 12 días.^{29, 63} Tiene un comienzo brusco, duración de 4-9 días, habiendo una mejora acentuada de los síntomas a su término.^{8, 48,56, 85} En esta fase se puede aislar a la leptospira de la sangre, hemocultivos, el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la mayoría de los tejidos (**Figura 29**).^{13,29}

Síntomas (**Figura 24 y 28**):

- ◆ Hay fiebre (alta en agujas con escalofríos, con temperatura de 39 a 40.5 °C que pueden durar de 4 a 7 días con un curso difásico y una intensa astenia)^{11,13,24}
- ◆ Conjuntivitis (signo más característico, a veces hemorrágica)
- ◆ Mialgia (intensa, en muslos y región lumbar); dolor a la palpación¹³
- ◆ Cefalea (>95%)
- ◆ Artralgias (>80%)
- ◆ Diarrea (15 a 30%)
- ◆ Menos específicos: lesiones cutáneas (exantema maculopapuloso (<10%) o urticaria en tronco: fiebre pretibial distintiva acompaña a una epidemia por *L. interrogans sv autumnalis* y fue denominada fiebre de Fort Bragg).²⁸

- ◆ La mitad de los pacientes tienen anorexia, náuseas y vómito (30 a 60%).
- ◆ Inyección conjuntival no purulenta (30 a 40%).
- ◆ Poco frecuente pero más que en el adulto: colestitis alitiásica, pancreatitis, dolor abdominal (30%) e hipotensión ^{38,84}
- ◆ Tos y faringitis (20%)
- ◆ Las manifestaciones pulmonares como la tos y el dolor torácico varían en frecuencia desde el 25% al 86%, rara vez hay hemoptisis y se han reportado casos de síndrome de dificultad respiratoria del adulto.³⁸
- ◆ Hipotensión arterial y bradicardia
- ◆ Disturbios mentales como confusión, delirio, alucinaciones y signos irritación meníngea pueden estar presentes.³²

La infección de las membranas fetales y del feto puede ocasionar abortos y el paso de las leptospiras a través de la placenta facilita los cambios degenerativos en la última etapa de gestación.⁶⁷

Esta fase termina después de cuatro a nueve días, generalmente con mejoría y con la desaparición de las leptospiras en la sangre y el LCR, siendo seguido por un periodo de mejoría de 2 días, tras el cual se inicia la segunda fase de la enfermedad. ^{2, 24,38}

2ª Fase o Inmune

La segunda fase presenta las características de la fase inmune y se correlaciona con la aparición de anticuerpos circulantes de clase IgM, presentándose la afectación renal, hepática, meningitis, uveítis. ^{28, 29, 53,84} La fase leptospirémica cesa con la aparición de los anticuerpos IgM.²⁴

Las manifestaciones clínicas se inician generalmente en la 2da semana de la enfermedad del 6 - 14 días ^{48,56} o más.

Las leptospiras son eliminadas por fagocitosis de los órganos internos, a excepción del riñón donde sobreviven formando microcolonias en los túbulos renales y de allí son excretadas a través de la orina por largos periodos de tiempo, incluso en ocasiones durante toda la vida.^{38, 67}

Pueden reaparecer los síntomas de la fase anterior siendo la fiebre más baja, meningitis leve y leptospiruria, ^{2,28} ictericias, petequias, rectorragias, anemia (principalmente hemolítica) y alteraciones en el peso.⁶⁹

Incluso en ausencia de síntomas meníngeos, en un 50- 90% aparece pleocitosis en LCR, durante la segunda semana de la enfermedad.^{28, 38,45}



Figura 24. Síntomas.⁸⁶

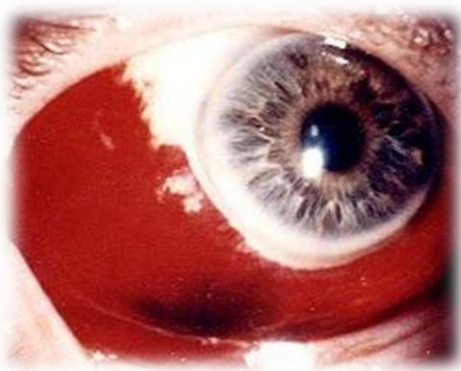


Figura 25. Conjuntivas se tornan de un color rojo intenso.¹³

Puede haber uveítis (**Figura 25**) anterior, encefalitis y neuropatías craneales y periféricas. Las lesiones producidas por la enfermedad se localizan en el riñón, el hígado, el pulmón y las meninges, dando lugar a delirios, convulsiones y psicosis transitorias.^{13, 69}

La mayoría de los pacientes (77%) presentan cefalea intensa y pobremente controlada por analgésicos; esta por lo general anuncia el inicio de la meningitis.

La meningitis aséptica es el síndrome clínico más importante observado en el estadio inmune anictérico:

- Síntomas meníngeos se presentan en el 50% de los pacientes. Parálisis de nervios craneales, encefalitis y cambios de la conciencia son menos comunes.
- Los síntomas son inespecíficos.
- La meningitis puede mantenerse pocos días, aunque ocasionalmente puede durar entre 1-2 semanas.
- La muerte es excepcional.¹³

Muy pocos pacientes pueden presentar insuficiencia renal aguda en la leptospirosis anictérica. Presentando alteraciones del sedimento urinario a partir de la primera semana y del volumen urinario a partir de la segunda semana de la enfermedad.⁴⁸

A partir de los datos anteriores se pueden distinguir dos tipos clínicos: Anictérico (85 a 90% de los casos) considerado el cuadro más benigno y el icterico (**Figura 26**) hepatonefrótico grave (5 a 15% de los casos);^{11, 13, 16, 29, 48, 58, 69} la tasa de letalidad es baja, pero aumenta conforme aumenta la edad y puede llegar al 20% o más en pacientes con ictericia o síndrome de Weil que no son sometidos a diálisis.^{2, 11, 16, 27, 29, 48, 58, 69}



Figura 26. Ictericia¹³

4.2.2 FORMA ICTÉRICA O HEPATONEFRÍTICA (SÍNDROME DE WEIL).

En algunos pacientes la fase septicémica evoluciona a una enfermedad icterica grave, con disfunción renal, fenómenos hemorrágicos, alteraciones hemodinámicas cardiacas, pulmonares y del estado de conciencia, asociados a tasas de letalidad que varían de 5 a 20% de acuerdo a diversos estudios.^{13, 24, 30}

Esta última es la llamada enfermedad de Weil o Síndrome de Weil (**Figura 27**). Se admite que el 60-70% de los pacientes presentan manifestaciones diagnosticadas como cefalea, exantema, meningitis, hemólisis, miocarditis, corioretinitis, fenómenos hemorrágicos, insuficiencia hepática, insuficiencia renal con leptospiruria, las bilirrubinas se elevan por arriba de 15 mg/dl, en tanto que las transaminasas

pirúvica y oxalacética se encuentran ligeramente elevadas y hay daño en el sistema nervioso central.^{2,11, 29, 53}

De las alteraciones oculares la uveítis (2-10%) puede desarrollarse temprana o tardíamente, incluso hasta 1 año posterior al inicio de la enfermedad.

Iridociclitis y coriorretinitis son otras complicaciones tardías que pueden persistir por años.¹³



Figura 27. Leptospirosis hemorrágica (síndrome de Weil) registrado en un trabajador irapuatense de 29 años, quien trabajó cuatro días dentro de las alcantarillas en ratadas. Obsérvese la intensa congestión y hemorragia conjuntival.⁴⁵

La hemorragia subconjuntival es la complicación ocular más común de la leptospirosis, presentándose en cerca del 92% de los pacientes. Las leptospiras pueden estar presentes en el humor acuoso del ojo.¹³

Al examen de abdomen con frecuencia hay dolor a la palpación y hepatomegalia en aproximadamente 70% de los casos. La esplenomegalia es rara. La insuficiencia renal tales como azotemia, piuria, hematuria, proteinuria y oliguria son vistas en el 50% de los pacientes y la deshidratación ocurre en la mayoría de los pacientes.⁴⁸

La lesión pulmonar es frecuente (ocurren en un 20-70% de los pacientes) y concurre con tos, disnea, dolor de pecho y expectoración teñida con sangre o incluso hemoptisis e insuficiencia respiratoria. Una prominente manifestación de la infección es la neumonitis hemorrágica severa.

Los infiltrados alveolares en las radiografías de tórax y la disnea han sido identificados como indicadores de pobre pronóstico en la leptospirosis severa con una alta mortalidad asociada.

La causa de la hemorragia pulmonar es una vasculitis a nivel capilar mediada por toxinas.

Información clínica limitada indica que la actividad en suero de factor activador plaquetario acetilhidrolasa estaba elevado en pacientes infectados con *L.interrogans* serogrupo *icterohaemorrhagiae*; pero no en aquellos infectados por otros serogrupos menos severos.¹¹

Los síndromes clínicos no son específicos del serotipo de bacteria infectante, aunque algunas manifestaciones pueden ser vistas más comúnmente con algunos serotipos.¹³

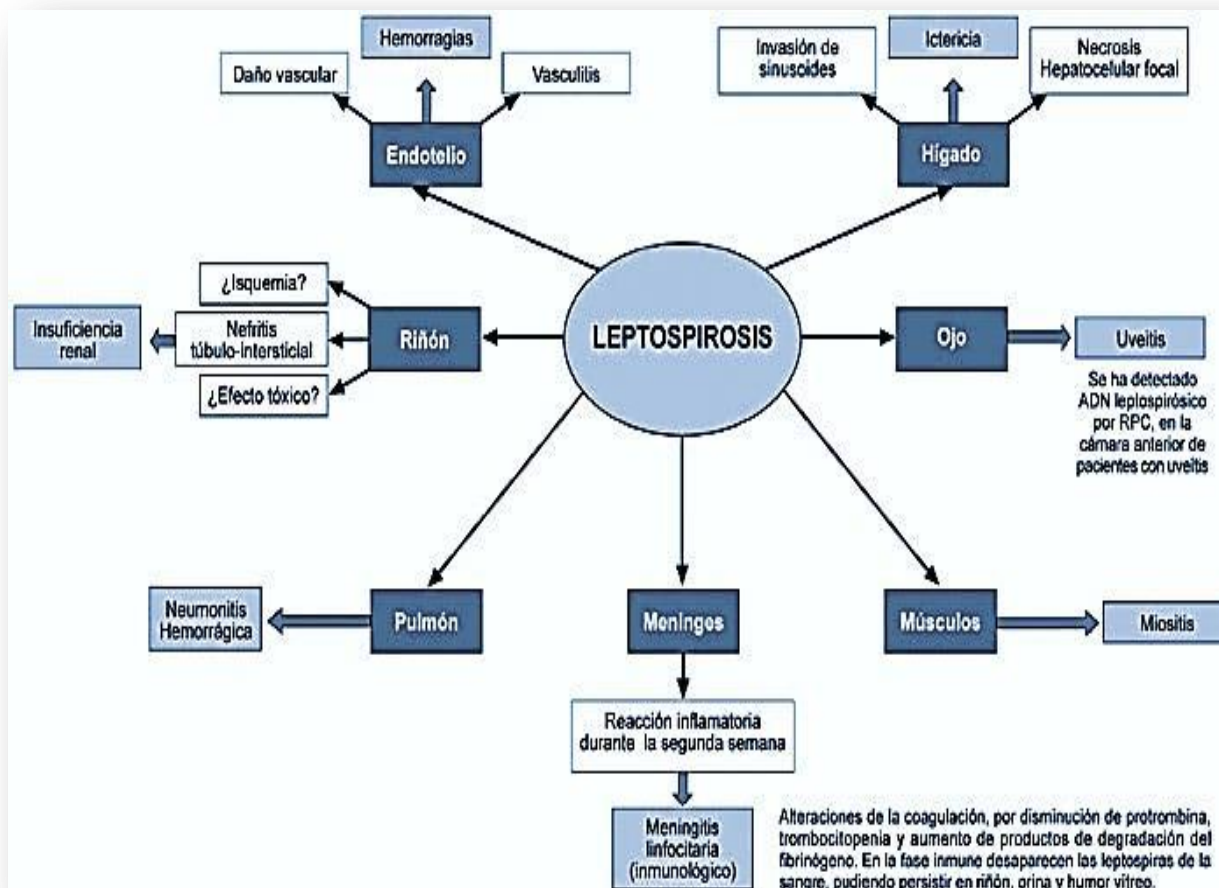


Figura 28. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.⁴

También puede desarrollarse leptospirosis congénita, que clínicamente presenta un comienzo súbito, con cefalea, fiebre, mialgias y exantema difuso. En los casos graves, el paciente puede tener una insuficiencia renal aguda y morir. En menos del 10% de los casos se observa ictericia por colonización del hígado; en otros casos encontramos datos clínicos de meningitis que solo en muy rara ocasiones dejan secuelas de trascendencia.²

En los casos severos las dos fases se fusionan y puede no reconocerse un intervalo asintomático.²⁸

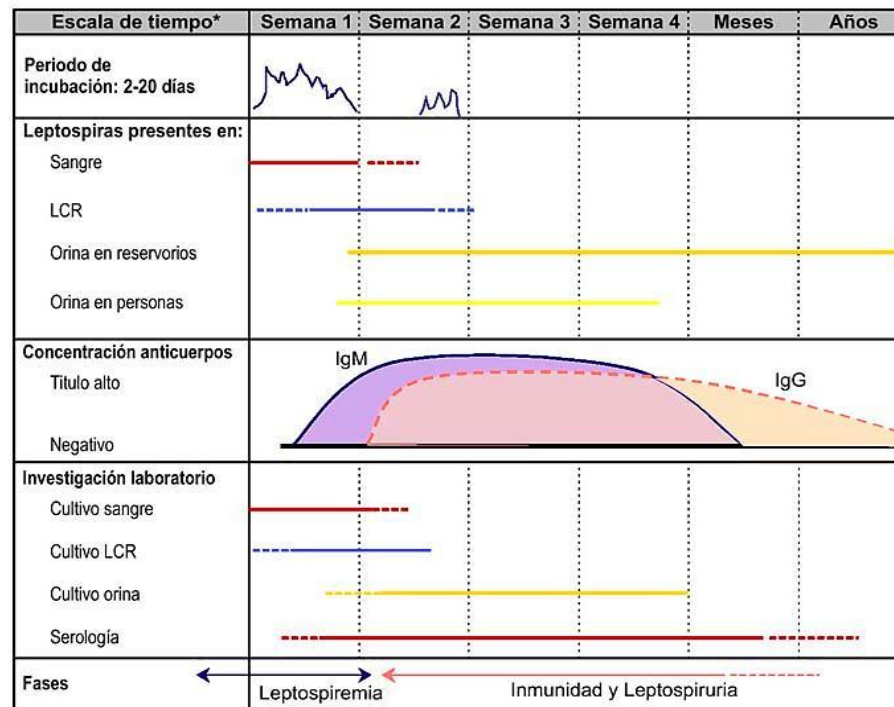


Figura 29. Leptospirosis naturaleza bifásica e investigación dentro de sus diferentes estados de enfermedad. *Desde inicio de sintomatología.³⁸

Dentro de las manifestaciones clínicas poco usuales encontramos:

- ★ Pulmonares: Hemorragias pulmonares sin ictericia, así como la formación de abscesos.
- ★ Neurológicas: Mieloradiculopatía, mielopatías, disfunción cerebelar, parálisis facial y síndrome de Guillain Barre.
- ★ Gastrointestinales: Pancreatitis donde los niveles de amilasa recobraron su normalidad posterior a tres meses, colecistitis alitiásica y peritonitis.
- ★ Cardíacas: Fibrilación atrial y bloqueos auriculoventriculares.
- ★ Dérmico-sistémicas: La fiebre pretibial o enfermedad de FortBagg, que es un exantema bilateral, simétrico localizado en miembros inferiores.⁶⁹

CAPÍTULO 5

5 EPIDEMIOLOGÍA

Es una enfermedad reemergente de distribución mundial, tanto en zonas urbanas y rurales, excepto en las regiones polares. Está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y la ILS (International Leptospirosis Society) como la zoonosis de mayor difusión en el mundo.³⁶

Se presenta con más frecuencia en los países de clima subtropical o tropical húmedo con altos índices de precipitación (**Figura 30 y 31**),^{3,17,31,33,39,62,81,83} con presentación ocasionalmente epidémica, dependiendo de factores exógenos como el clima, la constitución del suelo y la exposición del hombre al contacto directo o indirecto con los reservorios naturales.⁵¹

El ser humano se convierte en un huésped “sin salida” incidental porque no se produce la transmisión de un ser humano a animales o a otro ser humano.^{28,40}

La enfermedad se encuentra en cualquier lugar en donde los humanos entran en contacto con la orina de animales infectados o un ambiente contaminado con orina.³³



Figura 30. Inundaciones⁸⁷

En años anteriores estaba vinculada con actividades ocupacionales, como trabajadores de arrozales, campos de caña de azúcar, granjeros, mineros, trabajadores de alcantarillados, empleados de mataderos, criadores de animales y médicos veterinarios. Actualmente este concepto ha cambiado ya que la enfermedad se ha observado en personas ajenas a este grupo como los son niños, amas de casa, estudiantes, profesionales y turistas (**Figura 32**).

También representa un peligro para bañistas, deportistas y personas que acampan en zonas infectadas al estar en contacto con aguas contaminadas.¹⁷



Figura 31. Clima tropical ⁸⁸



Figura 32. Brotes epidémicos de Leptospirosis. ⁸⁹

5.1 NIVEL MUNDIAL

El número de casos de en el mundo no está bien documentado. Este padecimiento es más común en áreas tropicales del mundo. Sin embargo se está incrementando en áreas urbanas con bajos niveles de sanitarios. La mayoría de los casos de Leptospirosis son esporádicos, aunque después de inundaciones se han presentado grandes brotes.^{18, 81}

El número de casos en humanos que ocurren mundialmente no es conocido con precisión. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado una tasa de

incidencia de acuerdo con los reportes disponibles en humanos varía dentro de un rango aproximadamente 0.1-1 por 100 000 en climas templados hasta 10 -100 por 100,000 habitantes en climas húmedos tropicales.^{17, 33}

Estimaciones indican que hay más de 300,000-500,000 casos mundiales de leptospirosis anualmente.^{36, 83} Cuando se producen brotes, y en los grupos con alto riesgo de exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 por 100,000 habitantes.

Las tasas de letalidad que han sido reportadas en diferentes partes del mundo varían en un rango inferior al 5% hasta 30%. Estas cifras no son muy confiables debido a que en muchas áreas la ocurrencia de la enfermedad no está bien documentada, debido al subdiagnóstico o diagnóstico erróneo.^{36, 83}

En una encuesta realizada en 1997 por OPS en 11 países de la región, (Brasil, Cuba, Ecuador, El Salvador, Honduras, México, Nicaragua, Paraguay, Panamá, Perú y Uruguay), Brasil representa el país que notificó el mayor número de casos, seguido de Cuba, Nicaragua y México.⁸¹

En el continente americano, ha sido publicado la prevalencia en algunos países como México 14.1%; Argentina 38%; Brasil 9.8%; Cuba 12%; El Salvador 17.5% y Colombia 18.5%. La seroprevalencia se determinó en una población sana sin tomar en cuenta el grupo de alto riesgo (riesgo ocupacional).¹⁷

5.1.1 Comportamiento actualizado a nivel mundial

Se describe en la literatura, que la mediana de incidencia a nivel mundial es de 5 casos por cada 100 000 habitantes. Estudios limitados han sugerido que la mayor incidencia anual media se produce en la Región de África (95,5 por 100 000 habitantes), seguido por el Pacífico Occidental (66,4), América (12,5), Asia Sudoriental (4,8) y Europa (0,5).

El subregistro de casos es una debilidad que se evidencia en la mayor parte de artículos publicados por diferentes países, presentándose principalmente, por dificultades con el diagnóstico y conocimiento de la enfermedad por parte del personal de salud y la comunidad.

Durante el 2013 se han reportado 31 alertas epidemiológicas de posibles brotes de leptospirosis que se han presentado, en su gran mayoría, en la Suramérica.

Casos de leptospirosis notificados durante los últimos tres años a los sistemas de salud de algunos países de América (**Cuadro 4**).⁹⁰

Fuente: Ministerio de salud de cada país.

Cuadro 4. Casos de leptospirosis notificados durante los últimos tres años a los sistemas de salud de algunos países de América.⁹⁰

País	2009	2010	2011
Brasil	3891	3789	4582
Argentina	75	427	464
Cuba	-	145	286
México	106	317	112
Honduras	105	199	84
Uruguay	42	97	12
Chile	9	5	1

En Nicaragua, en 1995 se notificó sobre un brote con 400 casos y 13 defunciones (por distrés respiratorio y hemorragia pulmonar). Las evidencias encontraron leptospira en los tejidos de riñón e hígado de tres de los pacientes fallecidos; este brote se asoció a contacto directo con agua y suelo contaminado con orina infectada después de intensos periodos de lluvia.⁸¹

En Cuba se notificó un brote que afectó a 79 personas, en su mayoría recolectores de caña, por exposición temporal en terrenos húmedos infestados por roedores.

En Brasil se describió un brote en 1996 en el estado de Río de Janeiro, el mayor número de casos ocurrió en varones (61%) de 15 a 49 años de edad.⁸¹

Entre los últimos brotes de mayor importancia, destacan el de 1995 en Nicaragua, que tuvo una alta mortalidad y los detectados entre 1997 y 1998 en India, Singapur, Tailandia y Kazajistán. En el año 2000, destaca el brote de leptospirosis entre los participantes en el “Desafío Eco” (Eco-Challenge) en Sabah, Borneo, en el que los eventos incluyeron fueron: vela, natación, kayak y canoa en los ríos tras una temporada de fuertes lluvias. En la actualidad (mayo 2012) las graves inundaciones están causando un importante brote de en Perú, especialmente en la región de Loreto. Se han notificado ya más de 300 casos y 3 muertes asociadas a la leptospirosis.⁹¹

5.2 LEPTOSPIROSIS EN MÉXICO

En México, la leptospirosis se conoce desde 1920, fue aislada en Yucatán, en 1933 en Sinaloa y en 1937 en Tampico y, a partir de la década de los cincuenta Varela y colaboradores del Instituto de Salubridad de Enfermedades Tropicales, realizaron contribuciones importantes sobre esta zoonosis.

Las serovariedades de leptospira interrogans más importantes en México son entre otras: *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* y *L. pomona*.⁵⁸

Al igual que a nivel mundial existe un subregistro de casos debida principalmente a:

- ☞ El diagnóstico es difícil de confirmar.
- ☞ Puede ser confundida con otras enfermedades como la malaria, tuberculosis, hepatitis viral, tifoidea, brucelosis, toxoplasmosis, enfermedad de Chagas, neumonía atípica, enfermedad de Lyme, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, síndrome de fatiga crónica, neurosis y psicosis.⁵⁸
- ☞ La enfermedad puede ser leve y no ser investigada en el laboratorio.

La situación epidemiológica de leptospirosis en México en el 2000 presentaba una tasa nacional de 0.65 y al 2010 0.45 casos por cada 100,000 habitantes, manteniéndose constante durante los últimos 10 años, los estados que presentaron una incidencia mayor son: Hidalgo, Sinaloa, Veracruz Tabasco, Sonora y Yucatán, que oscilan entre 0.22 a 9.80 casos por cada 100,000 habitantes, la mayor tasa nacional se presentó en el 2007 con 0.21 casos por cada 100,000 habitantes, el grupo de edad más afectado fue de 50-59 años, predominando el sexo masculino.

En un estudio de revisión de seroprevalencia realizado entre el año 2000 y 2005 se identificaron 9,261 casos seropositivos de los cuales 293 se confirmaron por los

criterios correspondientes lo que evidencia el contacto con el *Leptospira* spp. Se encontró que la mayor incidencia y prevalencia se presentó en los estados del sur y centro del país y la mayoría de los casos se asoció en los meses que comprende la temporada de huracanes en el país.¹⁸

Los criterios correspondientes de acuerdo a las indicaciones de la OMS, un caso sospechoso es aquel que es compatible con las manifestaciones clínicas, lo cual resulta complicado debido a la complejidad de síntomas y signos que pueden encontrarse en pacientes con leptospirosis; un caso confirmado es aquel caso sospechoso con serología positiva, utilizando preferentemente la microaglutinación en placa (MAT) que incluya serovares de leptospirosis propias de la región en que se ha localizado en el caso sospechoso.⁸

De acuerdo al Instituto Nacional de diagnóstico y referencia Epidemiológicos (INDRE) el diagnóstico definitivo puede llevarse a cabo principalmente por observación microscópica de las leptospirosis en campo oscuro a partir de sangre, orina o LCR. También se puede utilizar el cultivo o inoculación de animales de laboratorio con sangre, orina, LCR o biopsia; y la titulación de anticuerpos en sangre y LCR. (**Cuadro 10**)⁸.

En cuanto a la edad, la mayor incidencia y prevalencia se encuentra en los grupos de edad económicamente activa, que va desde 35 a 39 años hasta 65 a 69 años, lo que permite inferir que hay mayor tiempo de exposición ocupacional y por lo tanto mayor incidencia y prevalencia, tendencias similares a las referidas en la literatura internacional. En contraposición se encuentran los casos identificados en los menores de 10 años, los que si bien no tienen actividades laborales, sus factores de riesgo deben estar asociados al contacto con suelos y aguas contaminadas durante el juego.

En México el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos reporta en 1998, 119 resultados positivos, asimismo en el periodo de 1992-1997, efectuó el diagnóstico diferencial en 3,458 muestras de diferentes estados encontrando una positividad de 30.3%. Las serovariedades más frecuentes fueron: *pomona* (17%), *canicola* (16.5%) e *icterohaemorrhagiae* (4%).⁸⁵

En el Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones se registraron 9 personas fallecidas por *Leptospira* para el periodo 1996-1997, predominando el sexo masculino con 89%, todos los casos fueron en mayores de 15 años.⁹²

Mediante los datos generados por el Sistema Único de Información Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), en donde se realizó un análisis con enfoque transversal, descriptivo, y observacional para conocer la prevalencia e incidencia de la leptospirosis en humanos durante el periodo de estudio, desde 2000 hasta 2010. Se obtuvieron las tasas de prevalencia e incidencia por entidad federativa, sexo, grupo de edad, y tipo de serovar.

En la gráfica 1 se muestran los casos confirmados por año en la república mexicana. El grupo de edad más afectado, tanto en los casos seropositivos como en los confirmados, fue de 25 a 44 años de edad, con leve predominio en el sexo masculino (51%), según puede observarse en la **gráfica 2**.

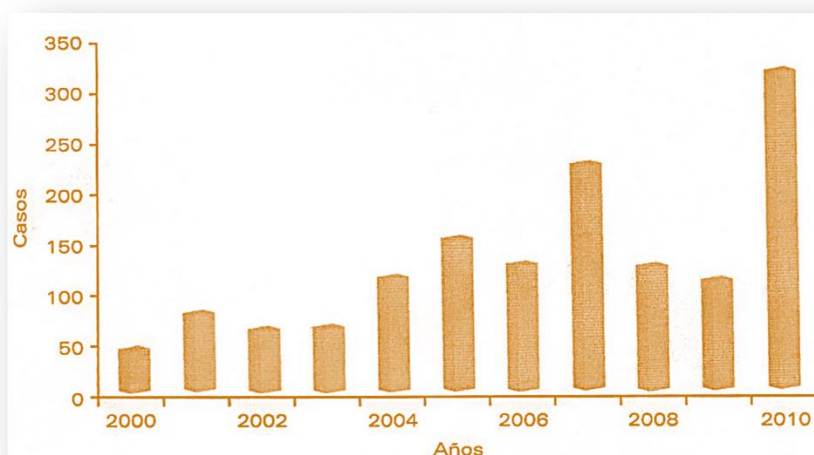
La fiebre, la cefalea y las mialgias fueron los síntomas que más prevalecieron (**Cuadro 5**).

Los estados que presentaron la mayor tasa de los casos seropositivos fueron: Campeche, Yucatán, Sonora, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz, Sinaloa, Tabasco, y Veracruz (**gráfica 3**).

A excepción de Zacatecas, todos los estados del país cuentan con más de un caso en sus diferentes municipios.

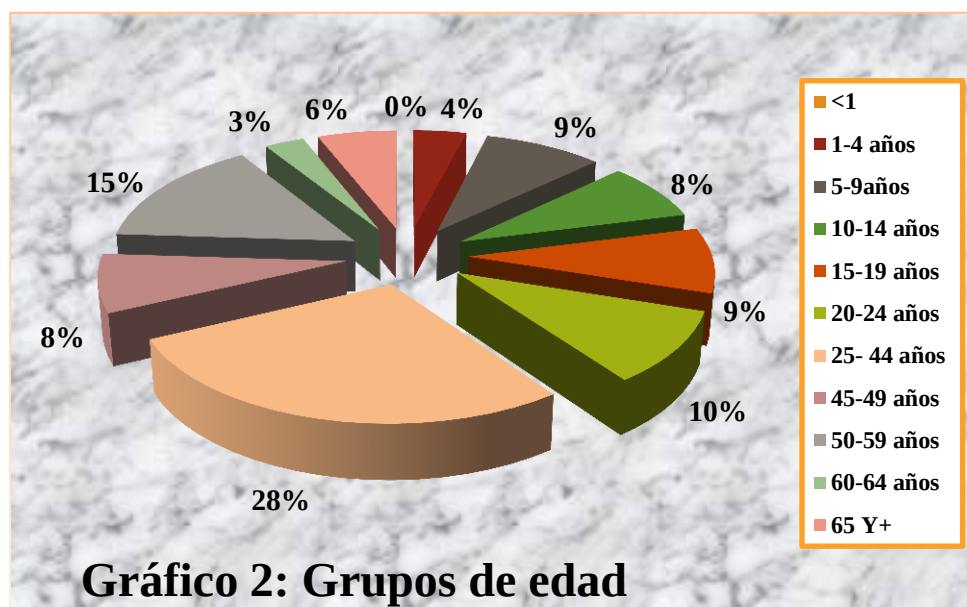
Tiene más riesgo la región del trópico húmedo que el resto de las regiones ecológicas del país. Se observó que la mayoría de los casos confirmados de leptospirosis se presentaron en los meses que comprenden la temporada de huracanes en nuestro país, tanto para el Atlántico como para el Pacífico.⁹²

Los serovares más aislados en México fueron: *L.bratislava*, *L. autumnalis*, *L. canicola*, *L.ballum*, *L. hardjo*, y *L. pomona*. Un alto porcentaje de las muestras fueron positivas para más de un serovar (49.86%) (**Cuadro 6**).



Gráfica 1: Incidencia de casos confirmados de leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos, 2000-2010.⁹²

De los resultados obtenidos, podemos observar que la incidencia de los casos confirmados de esta enfermedad es baja en el periodo de estudio; mientras que la prevalencia de los casos seropositivos es mayor.



Gráfica 3: Estados con casos confirmados de leptospirosis 2000-2010.⁹²



Cuadro 5: Sintomatología. ⁹²

Síntoma	Frecuencia (%)
Fiebre	100
Cefalea	90
Mialgias	75
Astralgias	65
Ictericia	25
Hepatomegalia	25
Hemorragia	15
Vómito	0
Diarrea	20
Miocarditis	10

Cuadro 6: Especies de Leptospira identificadas en la población mexicana. ⁹²

<i>L. canicola</i>	9.6
<i>L. hardjo</i>	4.5
<i>L. pomona</i>	4.2
<i>L. autumnalis</i>	3.5
<i>L. bratislava</i>	3.3
<i>L. ballum S-102</i>	2.3
<i>L. celledoni</i>	1.4
<i>L. cynopteri</i>	1.1
<i>L. georgia</i>	1.5
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1.5
<i>L. mankarso</i>	1.1
<i>L. pyrogenes</i>	0.5
>1 serovar	63.6

Recientemente, investigadores de la UNAM han encontrado pruebas serológicas negativas en individuos aparentemente sanos que presentan leptospiras en orina. Este hallazgo aumenta la controversia acerca del pleomorfismo de la enfermedad y de la dificultad que representa su diagnóstico.

En el año 2013 se ha reportado casos de leptospirosis, observar el **cuadro 7**.

Vigilancia Epidemiológica Semana 26, 2013

CUADRO 7. Casos por entidad federativa de Enfermedades Zoonóticas hasta la semana epidemiológica 25 hasta la 26 del 2013.⁹³

ENTIDAD FEDERATIVA	Brucelosis CIE-10ª REV. A23				Leptospirosis CIE-10ª REV. A27				Rabia ^S CIE-10ª REV. A82			Fiebre del Oeste del Nilo CIE-10ª REV. A92.3		
	2013			2012	2013			2012	2013		2012	2013		2012
	Sem.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.		Acum.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.	Acum.
		M	F			M	F		M	F				
Aguascalientes	-	5	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baja California	1	3	27	19	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Baja California Sur	-	-	2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Campeche	-	4	16	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coahuila	3	18	25	35	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Colima	-	3	5	26	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-
Chiapas	1	8	31	18	1	2	2	3	-	-	-	-	-	-
Chihuahua	2	18	14	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Distrito Federal	-	1	4	21	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Durango	2	14	12	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guanajuato	11	104	146	366	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guerrero	-	5	10	15	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-
Hidalgo	-	1	3	9	-	-	3	13	-	-	-	-	-	-
Jalisco	2	17	43	73	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
México	3	7	37	27	-	1	2	3	-	-	-	-	-	-
Michoacán	7	82	149	113	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Morelos	-	8	15	34	2	1	7	53	-	-	-	-	-	-
Nayarit	-	1	-	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nuevo León	1	18	30	106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oaxaca	-	11	8	29	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-
Puebla	9	14	32	93	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-
Querétaro	-	4	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quintana Roo	-	1	2	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
San Luis Potosí	-	9	9	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinaloa	14	51	82	65	5	24	18	3	-	-	-	-	-	-
Sonora	1	12	46	57	-	2	-	5	-	-	-	-	-	-
Tabasco	-	1	6	6	1	22	43	186	-	-	-	-	-	-
Tamaulipas	3	17	33	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tlaxcala	2	14	9	51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Veracruz	1	3	21	22	-	5	4	10	-	-	-	-	-	-
Yucatán	-	10	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zacatecas	1	15	21	71	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	64	479	850	1 457	10	61	85	298	-	-	-	-	-	-

La literatura señala que de 5% a 10% de los casos son graves y potencialmente letales. Los casos y encuestas publicados son reducidos. Con respecto a los brotes de leptospirosis, no hay nada reportado en la literatura nacional y diversos trabajos abarcan estudios realizados en especies animales más que en humanos. Sin embargo, esto no significa que la leptospirosis sea rara: más bien es poco conocida por los médicos y seguramente se la ha diagnosticado erróneamente como “fiebre en

estudio”, “fiebre por dengue”, “fiebre hemorrágica por dengue”, o “hepatitis”. Lo anteriormente descrito coincide con lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y diferentes autores, mismos que refieren un subregistro y un grave desconocimiento del padecimiento. La leptospirosis es una infección reemergente que amerita ser investigada a profundidad.⁹²

Tanto la incidencia como la prevalencia durante el periodo de 2000 a 2010 fue mayor en los estados del sur y centro del país. Los hallazgos en menores de edad (1 a 4 y 5 a 9 años) llamó la atención, dado que normalmente los individuos de esta edad no se dedican al trabajo. No obstante, en el momento del juego pueden estar en contacto con suelos y aguas contaminados, o bien vivir en áreas de riesgo.

Se ha observado que la incidencia es mayor en regiones tropicales húmedas debido a que el contagio está influenciado por factores climáticos, como la humedad y la temperatura, los cuales permiten que la bacteria sobreviva fuera del huésped, favoreciendo de esta manera la transmisión indirecta. En los climas áridos, en cambio, la transmisión se realiza al entrar en contacto con los animales.⁹²

La información presentada permite confirmar la transmisión de la leptospirosis y las serovariedades que circulan en el país. De manera adicional, se comprueba la coexistencia de diferentes agentes infecciosos que comparten el mismo nicho ecológico y la posibilidad de ser infectado por uno o más de ellos.

Los resultados obtenidos corroboran el peligro de la aparición, la reemergencia y la diseminación de esta enfermedad infecciosa. Por tal motivo, es importante el desarrollo de estrategias integrales de vigilancia epidemiológica, prevención y control de este padecimiento. La importancia del Sistema de Vigilancia Epidemiológica en nuestro país radica en la utilidad que se le dé a la información generada, a su análisis y a su retroalimentación en todos los niveles de operatividad, e incluso a la difusión de los resultados a la población y a todas las personas involucradas en la toma de decisiones para el manejo y el control de las enfermedades.⁹

5.3 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEPTOSPIROSIS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la notificación inmediata de casos sospechosos o confirmados en el nivel periférico (hospitales, laboratorio, etcétera), debiéndose investigar todos los casos. La serovigilancia indica las variedades prevalentes. La definición de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Leptospirosis debe, por lo tanto, tener como base la existencia de un laboratorio de diagnóstico y la capacitación del personal médico, veterinario, epidemiólogos y biólogos que faciliten la detección y el estudio de los casos y reservorios. En nuestro país, existe la NOM-029-SSA2-1999, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano.⁹²

Es una enfermedad de notificación semanal, a través del formato denominado “Informe Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades” y, en caso de brotes, se debe notificar de manera inmediata en los formatos que establece el órgano normativo Nacional (NOM-017-SSA2-1994).

Ambas normas la NOM017-SSA2-1994, para la vigilancia epidemiológica y la NOM-029-SSA2-1999, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la Leptospirosis en el humano tienen como objeto establecer las medidas preventivas,

de control y de vigilancia epidemiológica de la leptospirosis en el humano. Para efecto de estas normas las actividades se han dividido en medidas de prevención, medidas de control, y de vigilancia epidemiológica.⁹²

5.3.1 Medidas de prevención

La prevención en la población general se lleva a cabo mediante actividades de promoción de la salud, saneamiento básico, protección de grupos en riesgo, así como de animales domésticos y de interés económico.

Medidas de control: son aquellas que se llevan a cabo en la población general; comprenden el diagnóstico y el tratamiento oportuno de los enfermos.

Vigilancia epidemiológica: la información constituye la notificación de los casos a partir de las fuentes de información de las unidades del Sistema Nacional de Salud, así como de cualquier organismo, dependencia o persona que tenga conocimiento del padecimiento.⁹²

1. Se considera caso confirmado de leptospirosis a la persona que presenta sintomatología sugestiva de la enfermedad y título de anticuerpos de 1:80, con confirmación en una segunda muestra (no antes de dos semanas posteriores) en donde el título debe aumentar cuatro veces más que el valor inicial. De ser posible, se debe realizar la observación de la *Leptospira* en sangre, suero, orina, L.C.R., exudados, y biopsia mediante microscopía de campo oscuro. Es importante tener precaución cuando se detecten leptospirosis, principalmente con las no patógenas, por ejemplo, la *Leptospira biflexa*.
2. Caso probable de leptospirosis es cuando la persona presenta sintomatología sugestiva de la enfermedad y prueba positiva por microaglutinación ELISA para *Leptospira*.
3. Un caso sospechoso de leptospirosis es cuando la persona tiene antecedentes de contacto con animales, o realiza actividades que la ponen en contacto con la *Leptospira* y presenta sintomatología sugestiva de la enfermedad.
4. Estudios realizados por el INDRE han demostrado que un título de 1:1280, o mayor, en una sola muestra señala con gran seguridad la evidencia de infección reciente.
5. Caso negativo confirmado: resultado de laboratorio negativo de leptospirosis, o que no se observe seroconversión en muestras pareadas a IgM negativo (NOM-029-SSA2, 1999).

La importancia de la leptospirosis radica en las altas tasas de letalidad que puede alcanzar (20%), sobre todo cuando no se notifica con oportunidad. Durante los últimos años, la aparición de casos se ha relacionado directamente con los cambios climatológicos y lluvias abundantes, así como con la presencia de huracanes que provocan devastación y grandes acumulaciones de agua.

El hecho de que una gran proporción de los casos presente un cuadro inespecífico y autolimitado determina que los enfermos no busquen atención médica y, en todo caso, explica la dificultad para establecer un diagnóstico preciso de la infección, lo cual se traduce en un subregistro importante de la verdadera magnitud del problema.

Estos hechos se reflejan al revisar el manejo de los pacientes identificados, tanto en nuestro país como en otros, ya que, en su gran mayoría, han sido confundidos con otras patologías febriles, ictericas y hemorrágicas. La vigilancia de esta enfermedad proporciona, así, la base para establecer las estrategias de intervención en salud pública.⁹²

5.4 GRUPOS Y FACTORES DE RIESGO

Los grupos de riesgo pueden diferir de un área a otra, los humanos tienen mayor probabilidad de estar expuestos como resultado de sus actividades ocupacionales o recreativas debido a que hay un gran número de potenciales fuentes de infección y muchas diferentes oportunidades para la transmisión, los grupos de riesgo.

Dentro de los principales factores de riesgo se encuentran las actividades ocupacionales y /o recreativas, sociales y exposición en el hogar. La exposición depende de la probabilidad de contacto entre humanos y animales infectados en un ambiente contaminado.^{18, 28}

5.4.1 Exposición ocupacional

Los nombres dados para la enfermedad de Leptospirosis (p.ej. fiebre de los campos de arroz, enfermedad de los cortadores de caña, enfermedad de la porqueriza, fiebre del tambo, fiebre del barro), reflejan las condiciones en que se produce la transmisión.^{18, 28}

- Los ganaderos: se pueden exponer al manipular ganado, principalmente durante la ordeña o cuando manipulan fetos muertos, abortados u otros si entran en contacto con gotas infecciosas cuando el ganado está orinando.
- Criadores de cerdos y granjeros: pueden exponerse durante las tareas de cuidado de los animales.¹⁸
- Agricultores y jardineros: pueden exponerse, directa o indirectamente, a roedores infectados o a su orina.
- Cultivadores de arroz: cuando están arando particularmente trabajan descalzos, pueden estar expuestos al agua contaminada por roedores.
- Los veterinarios o cuidadores de mascotas: pueden exponerse a animales infectados que están enfermos o murieron de Leptospirosis o que son portadores/excretores asintomáticos, o criadores de ganado bovino y porcino.
- Trabajadores de mataderos y carniceros: al exponerse cuando sacrifican animales infectados y manipulan carcasas u órganos infectados, p.ej. riñones.
- Las personas involucradas en la preparación de alimentos: pueden estar expuestas a un entorno contaminado por ratas cuando las medidas higiénicas no son las adecuadas.
- Trabajadores de alcantarillas: al estar expuestos a aguas residuales contaminadas con orina de roedores.
- Los mineros: al estar expuestos a agua contaminada con orina de rata en las galerías de las minas.
- El personal de laboratorio: involucrado en el diagnóstico y la investigación sobre Leptospirosis y otras investigaciones zoonóticas.^{13, 18,23,34, 53}

5.4.2 Exposición Recreativa

- ★ Los participantes en actividades recreativas: natación, navegación, canotaje, navegación en balsa, explorando cuevas, pesca.
- ★ Viajeros que participan en viajes de aventuras en la selva o de actividades deportivas al aire libre.
- ★ Soldados, cazadores y excursionistas pueden exponerse al cruzar superficies de agua contaminadas o pantanos, cuando caminan por suelos contaminados, barro o vegetación húmeda o por contacto con animales.^{13, 18, 23,34, 39, 53,81}

5.4.3 Exposición en el Hogar

Contacto en el hogar con mascotas infectadas. Los niños cuando juegan en patios con charcos contaminados con orina de animales infectados, tales como perros, cerdos o ratas.

Resultados de un análisis refiere que las personas que tenían el antecedente de contacto con animales tuvieron 7.5 veces mayor probabilidad de enfermar que aquellos en los que no contaban con este antecedente. El riesgo de tal exposición dependerá de las condiciones sanitarias de vida tanto dentro de la casa como de su entorno inmediato.

El número de hombres con es generalmente más alto que el de mujeres, esto puede ser un reflejo de la exposición ocupacional en las actividades dominadas por hombres. Por esta misma razón, hombres jóvenes de mediana edad pueden tener una prevalencia más elevada de Leptospirosis que niños y hombres adultos mayores.^{13, 18,23, 34, 53, 84}

Las edades de mayor incidencia están entre los 15 y los 40 años. En la transmisión tiene importancia las mascotas, especialmente los perros.⁸⁴

5.5 Tasa de letalidad

Las tasas de letalidad que han sido reportadas en diferentes partes del mundo varían en un rango inferior al 5% hasta 30%. Estas cifras no son muy confiables debido a que en muchas áreas la ocurrencia de la enfermedad no está bien documentada. Además, los casos leves pueden no ser diagnosticados.

Mejoras importantes en el pronóstico de la leptospirosis grave o severa se ha hecho en las últimas décadas, gracias al uso de hemodiálisis como manera de manejar la falla renal reversible que puede ocurrir en algunos casos y a una agresiva implementación de medidas de soporte.



CAPÍTULO 6

6 DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS HUMANA

6.1 DEFINICIONES OPERATIVAS ANTE CASOS DE LEPTOSPIROSIS

Caso

Debido al amplio espectro clínico, que va desde la infección subclínica hasta las formas severas de falla multiorgánica con alta letalidad es difícil establecer una definición de caso por lo que se realiza su vigilancia bajo la estrategia de “vigilancia sindrómica”, donde puede ser captado como paciente con:

a) Síndrome Febril

- ❖ Todo paciente con inicio brusco de fiebre y menos de 7 días de evolución, que tenga entre 5 y 65 años de edad.
- ❖ Se considerará de notificación inmediata obligatoria a los conglomerados de febriles sin foco infeccioso evidente (paciente febril en el cual no se ha identificado signos o síntomas relacionados a un foco infeccioso).

b) Síndrome febril icterico agudo

- ✓ Todo paciente con presentación brusca de fiebre, ictericia y ausencia de factores predisponentes conocidos en el paciente (ejemplo: hepatopatía crónica, hepatopatía inducida por fármacos y hepatopatías autoinmunes).
- ✓ Todos los casos deben ser notificados de inmediato, ya sea que ocurran en forma aislado o en conglomerados.³²

c) Síndrome febril con manifestaciones hemorrágicas

Todo paciente con inicio brusco de fiebre cuya duración es menor de tres semanas y dos de los siguientes signos:

- ✓ Erupción cutánea hemorrágica o purpúrica
- ✓ Epistaxis
- ✓ Hemoptisis
- ✓ Sangre en las heces
- ✓ Otras manifestaciones hemorrágicas
- ✓ Ausencia de factores conocidos predisponentes para hemorragia en el paciente
- ✓ Se considerará factor predisponente para hemorragia a lo siguiente (criterios de exclusión):
 - Hepatopatía crónica
 - Síndrome hemorragiparo de etiología no infecciosa como: intoxicaciones agudas, neoplasias, efectos adversos a medicamentos, enfermedades hematológicas autoinmunes y accidentes por animales ponzoñosos.

Todos los casos deben ser notificados de inmediato, ya sea que ocurran en forma aislada o en conglomerados.³²

6.2 DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO

El diagnóstico debe ser considerado en cualquier paciente con cuadro febril agudo (menor o igual a 7 días) caracterizado por cefalea, mialgias, especialmente en pantorrillas y región lumbar y/o artralgias, que puede o no estar acompañada de inyección conjuntival y en algunos casos con ictericia o evidencia de sangrado o anuria/oliguria y/o proteinuria.

El diagnóstico es más difícil cuando los pacientes presentan síntomas tales como tos, disnea, náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, artralgias y erupción en la piel. La inyección de la conjuntiva y el dolor muscular, más notable en las áreas lumbares y pantorrillas, son los hallazgos clínicos más distintivos,^{18, 33} con antecedentes de:

- ❖ Exposición a fuentes de agua (**Figura 33**), aniegos u otras colecciones hídricas potencialmente contaminadas, como canales de regadío (acequias), pozas, charcos, lagos, ríos.
- ❖ Exposición a desagües, letrinas o manejo de aguas residuales contaminadas con orina de roedores y otros animales.
- ❖ Actividades con riesgo ocupacional, como agricultura, ganadería, recolección



Figura 33. Los ríos y charcas contaminados son puntos en donde se obtiene la leptospirosis, según autoridades de Salud.⁹⁵

de basura, limpieza de acequias, trabajo con agua y desagüe, gasfitería, medicina veterinaria, técnica agropecuaria en la que se administran tratamiento a los animales, entre otros.

❖ Actividades recreativas y deportes de aventura que tienen relación con fuentes de agua potencialmente contaminadas (ríos, cochas, acequias, lagunas y otros).³²

6.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Para llegar al diagnóstico diferencial es necesario una buena anamnesis que consideren los antecedentes epidemiológicos de 15 a 20 días anteriores a la presentación de la enfermedad.

Las mayores dificultades diagnósticas se presentan en las formas anictéricas, las cuales corresponden a la mayoría de los casos, pasando desapercibidas y registradas como otros diagnósticos desde el punto de vista clínico. A pesar que usualmente presenta una evolución benigna pueden llevar también a la muerte. Dependiendo de los síntomas y signos predominantes, se ha sugerido una clasificación de las formas

anictéricas en: tipo influenza, pulmonar (tos y hemoptisis), febril pura, hemorrágica, mialgica, meníngea, etc.

En consecuencia las posibilidades de confusión diagnóstica son mayores que en la forma ictérica de la leptospirosis. En este último caso el número de diagnósticos posibles es reducido y la sintomatología más importante como fiebre, mialgia e ictericia hace sospechar el diagnóstico (**Cuadro 8**).³⁰

Según el periodo evolutivo, se ha considerado los siguientes diagnósticos diferenciales:

- ✎ Fase séptica (anictérica): dengue clásico y otros arbovirus, influenza, apendicitis aguda, bacteriemias y septicemias (bartonelosis), colagenosis, colecistitis aguda, fiebre tifoidea, infección de las vías aéreas superiores e inferiores, malaria, pielonefritis aguda, rickettsias, toxoplasmosis, meningitis, infección aguda por VIH, sífilis secundaria y otras.³⁰
- ✎ Fase inmune (ictérica): colangitis, coledocolitiasis, fiebre amarilla, dengue hemorrágico o con manifestaciones hemorrágicas, hepatitis viral, malaria por *P. falciparum*, Síndrome de Zieve, síndrome hepatorenal, esteatosis aguda del embarazo, septicemia y otros.^{8, 26, 30, 32, 45, 56, 83}

Otra forma de diferenciar dependerá de las manifestaciones clínicas dominantes.

Habitualmente se confunden con:

- ✎ Gripe u otras virosis respiratorias. Si bien se presenta en la mayor parte de los casos como un cuadro pseudogripal, debe tenerse en cuenta que la gripe predomina en épocas frías, mientras que la leptospirosis se da preferentemente en épocas cálidas o templadas. La naturaleza en brote de la gripe hace que siempre se presenten varios casos en un área geográfica, durante un periodo concreto de tiempo (2 a 3 meses con un pico máximo en 3 a 6 semanas) y con claro predominio de síntomas respiratorios como la tos y odinofagia, cumpliéndose todo el ciclo de la enfermedad en 5 a 7 días. La leptospirosis se resuelve en periodos mayores.
- ✎ Hepatitis viral
- ✎ Insuficiencia renal aguda de otras etiologías
- ✎ Malaria: Las formas leves con fiebre y malestar general pueden simular una leptospirosis, pero el carácter más alternante de la fiebre y la procedencia siempre clara de un área de malaria, orientan a este diagnóstico. No puede omitirse el hecho que hay áreas geográficas donde coexisten malaria y leptospirosis, y el diferencial toma más fuerza en las formas severas de malaria con insuficiencia renal, edema pulmonar, shock, sangrados y convulsiones.
- ✎ Síndrome de disfunción orgánica múltiple cuando se presenta o evoluciona como una sepsis.
- ✎ Dengue: Hasta el momento no hay casos autóctonos en el país pero sí un claro alerta epidemiológico. Pueden asistirse pacientes procedentes del exterior en los que se plantea diagnóstico diferencial entre dengue y leptospirosis. En común presentan la fiebre elevada desde el inicio y las mialgias intensas, en el dengue predominan claramente la astenia severa y la anorexia, cosa que no

sucede como algo dominante en la leptospirosis. Estudios en Latinoamérica señalan además que es destacable en el dengue clásico el dolor abdominal y síntomas gastrointestinales, siendo signos de severidad.⁶⁰

Cuadro 8: Diagnóstico diferencial de la Leptospirosis.

Forma clínica	Diagnóstico diferencial
Síndrome febril	Influenza, triquinosis
Síndrome icterico	Hepatitis viral
Síndrome renal	Otras causas de insuficiencia renal aguda
Síndrome hemorragiparo	Fiebres hemorrágicas virales (dengue, S. cardiopulmonar por hantavirus), hemopatías
Síndrome meníngeo	Meningitis virales u otros agentes causales de meningitis aguda linfocitaria

6.4 DIAGNÓSTICO (CONTROL DE CALIDAD INTERNO)

La función del laboratorio clínico es proporcionar datos cualitativos y cuantitativos del espécimen biológico para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades.

Las fases del Control de Calidad Interno son:

- ◆ Fase Preanalítica
- ◆ Fase Analítica
- ◆ Fase Posanalítica

Para un correcto diagnóstico de la enfermedad deben utilizarse la combinación de parámetros:

Historia clínica

1. El diagnóstico clínico-epidemiológico: Referido a los síntomas y signos que presente el paciente humano y/o animal y a los factores de riesgo como ecológicos o del medio ambiente, sociales y culturales del tipo de producción y la actividad económica desempeñada.^{27,94}
2. Paraclínicos
3. El diagnóstico de laboratorio: Basado en la determinación del agente causal por: Estudios serológicos y bacteriológicos y exámenes hispatológicos.⁹⁴

No obstante, el diagnóstico definitivo solo se puede obtener mediante pruebas de laboratorio y se basa en el aislamiento o la seroconversión, con un aumento de cuatro o más veces en el título de anticuerpos.⁴

La leptospirosis es una enfermedad de difícil diagnóstico clínico, ya que son frecuentes las enfermedades con síntomas similares a ella, debido a que las manifestaciones clínicas son frecuentemente atípicas.⁹⁴

6.5 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Diagnóstico definitivo es cuando el diagnóstico presuntivo es confirmado con pruebas de laboratorio.

6.5.1 Parámetros Paraclínicos

A todo paciente con diagnóstico presuntivo como apoyo complementario al diagnóstico diferencial y evolución realizar: Biometría hemática, recuento de plaquetas, velocidad de sedimentación globular, aminotransferasas hepáticas, creatinfosfocinasa, bilirrubinas, creatinina, sedimento urinario que incluya proteínas en orina, líquido cefalorraquídeo, amilasa sérica, radiografía de tórax y electrocardiografía ^{3,17,30},

Los hallazgos de laboratorio en muestras de sangre suele aparecer:

Alteraciones hematológicas

- ◆ Puede observarse leucocitosis moderada con desviación a la izquierda o en rango normal (a diferencia del dengue en que tienden a la leucopenia).
- ◆ Trombocitopenia ligera, sin otras evidencias de coagulopatía de consumo, en pacientes con daño renal. ^{4,17,18}
- ◆ Anemia hipocromía a partir de la segunda semana
- ◆ Velocidad de eritrosedimentación: Se eleva en forma también moderada en la enfermedad anictérica.

Alteraciones en orina

- ★ Puede evidenciar proteinuria, piuria, la aparición de leucocitos y hematuria microscópica, cilindros granulosos y hialinos pueden estar presentes, en pacientes con compromiso renal. ^{4,17}

Alteraciones bioquímicas

- ❖ Creatinina sérica, creatinina quinasa, amilasa sérica y nitrógeno ureico: Se elevan en los casos con daño renal. ^{4,17, 18} Urea en sangre se eleva más de 40 mg y creatinina en sangre a más de 1.2 mg en hombres y de 1 mg en mujeres.
- ❖ Pruebas de función hepática: En enfermos con compromiso hepático se puede observar hiperbilirrubinemia a expensas de la directa que puede pasar los 20mg/ dL por daño hepatocelular o colestásis y de la indirecta, secundario a hemólisis, elevación de la CPK, transaminasas normales o con un aumento que generalmente no pasa de 500 U/dL, estando la T.G.O usualmente más elevada que T.G.P, ^{4,17, 18} hiperaminotransferasemia y aumento de la fosfatasa alcalina.⁶⁹ Es igualmente común la elevación de los niveles de las enzimas musculares, como la creatinfosfocinasa (CPK MM).¹⁷ generalmente con elevación notable hasta de 4-5 veces.
- ❖ Pruebas de coagulación: PT (Tiempo de protrombina) y TPT(Tiempo parcial de tromboplastina) prolongados y elevación del fibrinógeno.⁶⁹

- ❖ Potasio sérico normal o disminuido, a no ser que se evidencie la insuficiencia renal aguda.
- ❖ Citoquímico de LCR (Líquido ceforraquídeo). En casos de meningitis muestra elementos inflamatorios: opalescencia, xantocromía, aumento de proteína (hasta 1g%), la glucosa del LCR es generalmente normal y células con recuento, habitualmente, entre 100 y 800/ mm³ con predominio linfocitario. En pacientes con compromiso hepático y meníngeo suele observarse el hecho, excepcional en el adulto, de xantocromía debida a presencia de pigmentos biliares en LCR.^{4, 11, 17}

NOTA: La asociación de hiperbilirrubinemia directa con transaminasas levemente elevadas y CPK (enzima creatina-fosfoquinasa) muy elevadas deben hacernos sospechar de leptospirosis.

En los casos de Enfermedad de Weil puede observarse:

- Trombocitopenia (disminución de las plaquetas) leve (en cerca del 50%), la cual es frecuentemente acompañada por falla renal
- Leucocitosis marcada.
- Azotemia y falla renal
- Elevación del tiempo de protrombina
- Elevación aguda de CPK en cerca de un 50% de los pacientes, aunque las transaminasas están sólo modestamente elevadas.¹³

La clínica con los hallazgos de laboratorio mencionados pueden sugerir un caso probable de leptospirosis pero no es específico, por lo que es necesaria la confirmación del caso por pruebas microbiológicas, serológicas o moleculares.

6.6 FASE PREANALÍTICA

El éxito de los resultados de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de leptospirosis depende en gran medida del cuidado que se ponga en la obtención, transporte y conservación de las muestras. Estos procedimientos son de mucha importancia para que el laboratorio contribuya eficientemente en el diagnóstico de la enfermedad.⁶⁸

6.6.1 Recolección de la muestra

Las muestras de elección necesarias para realizar los estudios respectivos comprenden:

- Sangre
- Suero (para pruebas de aglutinación)
- Orina
- Líquido Cefalorraquídeo
- Exudados
- Biopsia de hígado

Las muestras a tomar dependen de la fase de infección (**Cuadro 9**), las *Leptospiras* usualmente circulan en la sangre del paciente por aproximadamente 10 días después de la aparición de la enfermedad. También aparecen en otros fluidos corporales, tales como orina y líquido cefalorraquídeo⁸⁵, unos pocos días después de la aparición de la enfermedad penetran a órganos internos durante este tiempo. Títulos detectables de anticuerpos aparecen en la sangre de 5 - 10 días después de la aparición de la enfermedad, aunque algunas veces pueden tardar más, especialmente si se implementó tratamiento con antibióticos.¹⁸

Para la toma de muestra estos deben reunir las siguientes características:

6.6.1.1 Muestra de sangre (Bacteriología)

Debe tomarse la muestra sanguínea por punción venosa (área antecubital) en la fase aguda de la enfermedad, durante los primeros 10 días de la infección.^{18, 33,85} (Ver Anexo A para toma de muestra).

Condiciones específicas

Durante la primera semana de la enfermedad, el medio más seguro para detectar a las leptospirosis es el cultivo directo de sangre en medios apropiados. Si no se dispone de éstos en el momento de la toma de la muestra puede desfibrinarse o mezclarse con anticoagulantes (heparina u oxalato de sodio, las soluciones de citrato pueden ser inhibidoras) y luego subcultivarse, se transporta a temperatura ambiente.^{18, 83,85}

El cultivo de la sangre después de los 10 días de la aparición de la enfermedad no es recomendado, ya que las leptospirosis han desaparecido en su mayoría de la sangre y los anticuerpos habrán comenzado a ser detectables en el suero permitiendo el serodiagnóstico.^{33, 83}

Muestras para cultivo deben ser guardadas y transportadas a temperatura ambiente, debido a que las bajas temperaturas son perjudiciales para las leptospirosis patógenas.³³ El envío y recepción al laboratorio es inmediata, evitando su inversión durante el transporte y no debe pasar de 6 horas.^{29,85}

6.6.1.2 Muestra de sangre para serología

- ✚ Sangre coagulada o suero para serología, deben obtenerse preferiblemente dos muestras con un intervalo de varios días en base a la fecha de aparición o inicio de la enfermedad y el tiempo probable de seroconversión.^{18,33}
- ✚ Para exámenes serológicos, se toma 5 ml. de sangre usando un tubo vacío sin anticoagulantes, y a temperatura ambiente permitir que coagule, para luego centrifugar por 15 minutos a 2000 rpm y obtener el suero.
- ✚ El suero (2,5 ml aprox.) debe ser refrigerado a 4°C o congelado si la muestra se procesará de forma inmediata. Mantener la cadena de frío para el envío de la muestra.^{29,30}
- ✚ El análisis de muestras pareadas es necesario para detectar un incremento en los títulos entre ambas muestras o la seroconversión, y por tanto para confirmar el diagnóstico de la leptospirosis. Un resultado serológico negativo en la fase aguda de la enfermedad no excluye la leptospirosis.^{18,33}

6.6.1.3 Obtención de la muestra de sangre venosa para cultivo directo (en pacientes hospitalizados).

Consideraciones específicas

- ✓ Tomar la muestra durante el periodo agudo febril (1ª – 7 día de iniciada la enfermedad) de la fase leptospirémica.
- ✓ Solicitar al laboratorio de referencia 4-5 tubos con medio de cultivo los que se mantendrán a temperatura ambiente por $\pm$ 30 minutos antes de la toma de muestra.
- ✓ Realizar el hemocultivo al lado de la cama del paciente.⁵⁵

6.6.1.4 Muestra de suero

Condiciones específicas

- ★ Para obtener de una muestra adecuada es necesario conocer la dinámica de enfermedad.
- ★ Para un diagnóstico acertado, obligatoriamente se requiere de dos muestras pareadas: una en la fase leptospirémica donde los niveles de anticuerpos son muy bajos, y otra en la fase inmune donde los títulos de anticuerpos son más altos. En una infección entre la primera y segunda muestra debe haber un incremento del título de anticuerpos de 2 a 4 veces.⁵⁵
- ★ La toma de la primera muestra se hará en la fase aguda o leptospirémica, 4 a 10 días de iniciado los síntomas y la segunda muestra obligatoriamente en la fase convaleciente o inmune 7-30 días posterior a la primera muestra. Mantener en cadena de frío.⁶⁸ Otros autores mencionan que la toma de la primera muestra debe ser dentro de los primeros cinco días de iniciados los síntomas y la segunda muestra se debe realizar de 10 - 15 días después de tomar la primera muestra.⁵⁵ La toma consiste en tomar de 5 a 7 mL de suero conservado a 4°C para su envío y recepción en el laboratorio, no debe pasar de 48 horas; si sobrepasa este tiempo se recomienda transportación en congelación, guardar a -20°C.^{18,55}

6.6.1.5 Muestra de orina

Las leptospiras mueren rápidamente en la orina por lo que el uso de orina para cultivo puede ser valioso solamente cuando es posible obtener una muestra limpia que pueda ser inoculada en un medio de cultivo apropiado en no más de 2 horas después de haber sido recogida (Ver Anexo A para toma de muestra).¹⁸

Condiciones específicas

La leptospiruria es debido a la colonización de los túbulos renales y se presenta a partir de los 14 a 28 días después de la infección. En pacientes con dieta alcalina y tratados con antibióticos este estado es limitado.

- ◆ Las muestras de orina se pueden obtener al comienzo de la segunda semana y hasta 30 días después de la instalación de los síntomas.⁸¹ Debe enviarse 30 a 50 mL de la primera micción, en un frasco estéril, resistente, oscuro, rotulado y a temperatura ambiente.^{29,85}
- ◆ Tomar las muestras de orina asépticamente, por colección del chorro medio o catéter (en pacientes hospitalizados).⁶⁸ Para la alcalinización de la orina, el paciente debe beber la noche anterior un vaso de agua con una cucharadita de ± 1 g de bicarbonato de sodio. Una alternativa es tomar una pastilla de acetazolamida en el desayuno del día anterior a la toma de muestra.
- ◆ La orina es un líquido biológico donde proliferan muy fácilmente las bacterias contaminantes, por lo cual la muestra debe ser procesada dentro de las 2 horas después de haber sido obtenida. Es necesario protegerla de la luz y mantenerla a temperatura ambiente. Se puede refrigerar a 4 °C hasta su procesamiento (máximo 6 horas pero no es lo adecuado).^{68,85}

6.6.1.6 Muestra de L.C.R (Líquido cefalorraquídeo)

Condiciones específicas

El conocimiento de la patogénesis de la enfermedad es importante en la selección de la muestra clínica apropiada en cada fase de la enfermedad. En pacientes con compromiso meníngeo se puede observar y aislar leptospiras de LCR entre los 4 a 10 días después de iniciada la enfermedad (Ver Anexo A para toma de muestra).⁶⁸

- ✿ Tomar de 1 a 3 mL, depositar en tubo estéril, conservado a temperatura de refrigeración, no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio debido a que el LCR es de fácil contaminación bacteriana, por ello debe procesarse inmediatamente.^{29, 68,85}
- ✿ Recomendación: No congelar ni refrigerar la muestra.

6.6.1.7 Muestra de tejido para cultivo

Condiciones Específicas

Realizar la toma de la muestra de órganos (riñón, hígado y cerebro) en pacientes fallecidos con sospecha de leptospirosis.

Los órganos, son un excelente medio de cultivo para la proliferación bacteriana. Por ello, la muestra debe ser procesada dentro de las 4 horas de su obtención, manteniéndola protegida de la luz y a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C - 8°C (máximo 6 horas) hasta su procesamiento (Ver Anexo A para toma de muestra).⁶⁸

CUADRO 9: Condiciones de obtención, conservación y envío de muestras para el diagnóstico de Leptospirosis. ^{18,30}

Pruebas	Muestras	Período de toma de muestra	Cantidad	Transporte	Conservación
Serología	Suero agudo	4- 10 días de inicio de los síntomas	1 vial (2 mL- 3mL)	Cadena de frío a 4-8°C	-20°C a -70°C
	Suero convaleciente	7 a 30 días de inicio de los síntomas.	1 vial (2 mL- 3mL)	Cadena de frío a 4-8°C	-20°C
Aislamiento y PCR	Sangre total con heparina	Entre el 1er al 7mo día (periodo febril de la fase septicémica).	1 mL hasta 5 mL	TA	Estéril con anticoagulante EDTA. Heparina 2 gotas u oxalato de sodio 0,5 mL de una solución a 1%. No usar citrato*
	Líquido cefalorraquídeo	4 a 10 días después de los síntomas	2 mL	TA	Estéril. TA máximo por 4 días
	Orina	10-28 días después del inicio de síntomas.	50 mL	TA	Estéril. TA máximo 2 a 4 horas
	Tejido(hígado, pulmón, cerebro)	Necropsia	2 cm	TA	TA máximo 2 a 4 horas
Histopatología	Tejido(hígado y riñón)	Necropsia	2cm	Enviar en formol al 10%. a T A.	Estéril, enviar a 4 °C en recipientes estériles y bien cerrados en un plazo máximo de 6 horas. Para estudios histopatológicos, enviar 2 mL de cada tejido en 5 mL de formol al 10%.

TA: temperatura ambiente

* Enviar inmediatamente al laboratorio. De no ser posible, remitir máximo dentro de los 5 días siguientes.

6.7 FASE ANALÍTICA

El diagnóstico de laboratorio de leptospirosis se basa en la identificación del microorganismo en cultivo por medio de técnicas bacteriológicas que son las más complejas, pero brindan resultados muy importantes tales como: ^{17, 28}

- ❖ La observación
- ❖ El aislamiento
- ❖ Identificación del microorganismo
- ❖ La seroconversión o el incremento de cuatro veces en el título de anticuerpos en la prueba de MAT (Serología)

Se describen los diversos procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad aceptados por la OMS: serológicos, bacteriológicos y las pruebas biológicas. El estudio postmortem es a veces necesario para el diagnóstico retrospectivo.³

6.7.1 Criterios de confirmación de laboratorio

En orden de prioridad:

- 1) Aislamiento de la bacteria a partir de sangre, orina, L.C.R. o tejidos.
- 2) Detección de ADN *Leptospira* por la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de sangre, orina, L.C.R. o tejidos.
- 3) Seroconversión en dos muestras pareadas de suero de 4 o más veces de título de anticuerpos por la prueba de Microaglutinación (MAT), siendo necesario 2 a 3 muestras, con intervalos de 15 días. Si el paciente tiene menos de 7 días de enfermedad y presenta títulos bajos necesariamente se deberá tomar una segunda muestra. Aumento significativo de 50% de la titulación de anticuerpos en dos muestras pareadas por la prueba de ELISA IgM.
- 4) La confirmación serológica está dada por la prueba de Microaglutinación (MAT). Cualquier resultado positivo mediante otra técnica diagnóstica serológica (ELISA, DIPSTICK, IFI, HA) debe ser confirmada por esta prueba.³²

6.7.2 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Los métodos de diagnóstico se pueden dividir en dos grupos: directos e indirectos. Los métodos directos son de máxima efectividad a partir del octavo al décimo día del inicio de la enfermedad, pudiéndose aislar la *Leptospira* en la sangre, el hígado (biopsia) y el líquido cefalorraquídeo en los primeros 8 días y después de la observación y aislamiento será efectivo a partir de la orina o de la biopsia renal. ⁴⁰

Detección directa

Son los métodos que permiten la observación directa de la *Leptospira* en los productos biológicos y los que tienen como fin el aislamiento de la misma como⁴⁰:

- 🕒 **Examen directo por técnicas microscópicas**
- 🕒 **Cultivos y aislamientos**

6.7.2.1 DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DIRECTO (TÉCNICAS MICROSCÓPICAS).

Consiste en la observación directa de las leptospiras en el microscopio bajo las siguientes técnicas:

- ◆ Examen directo en campo oscuro
- ◆ Examen directo en campo claro

Ambas son pruebas presuntivas, se utilizan previas y posteriormente a los aislamientos microbiológicos de leptospiras en sangre, orina, LCR y órganos (**Figura 34 y 35**).

Los métodos de coloración que se pueden usar son:

- ◆ Coloración de plata observar **Figura 35** (Murray & Fielding, 1936; Gangadhar & Rajasekhar, 1998).
- ◆ Coloración por inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales de conejo marcados con fluoresceína.⁴⁵

Examen directo en campo oscuro

- ☉ Las leptospiras son muy delgadas y se colorean muy pobremente con los colorantes habituales, como para ser observadas bajo un microscopio de campo claro convencional. En la microscopía de campo oscuro, una luz oblicua es emitida hacia las leptospiras sobre el portaobjeto mediante el uso de un condensador especial, mientras la luz central es interrumpida.¹⁹
- ☉ Este método es bajo en sensibilidad y especificidad, se requiere de mucha experiencia para obtener un resultado confiable.⁹⁴
- ☉ La observación de leptospiras mediante microscopio de campo obscuro se puede realizar en especímenes de:
 - Muestras de sangre (Figura 36)
 - Muestras de orina (Figura 38)
 - Muestra de biopsia hepática, de riñón y pulmón
 - Muestras de L.C.R., durante la fase aguda de la enfermedad.^{2, 28, 31,67}

La sangre, el LCR y la orina se someten a examen directo mediante microscopio de campo oscuro. La detección de leptospiras móviles en estas muestras se optimiza con la centrifugación a 1.500Xg durante 30 minutos, antes centrifugar sangre tratada con oxalato de sodio o heparina a 500x durante 15 minutos para eliminar los eritrocitos.⁹⁷

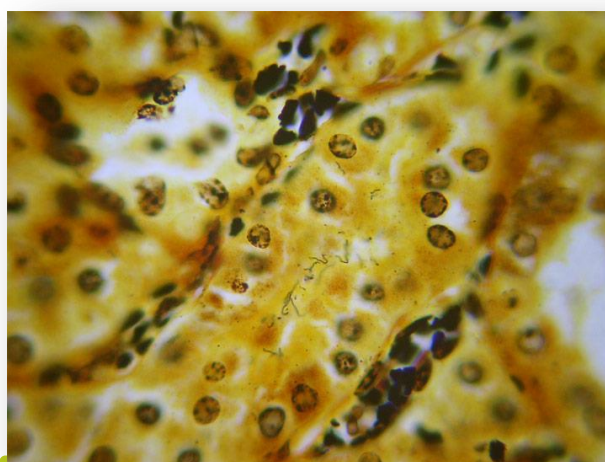


Figura 34. Técnica de tinción argéntica Warthin-Starry, especial para visualizar leptospiras. Riñón de comadreja con leptospiras en la luz tubular 1000X.⁹⁶

Las leptospiras se destacan como hebras de plata sobre el fondo oscuro. Es esencial usar un microscopio de campo oscuro de buena calidad (Figura 42).⁴⁵

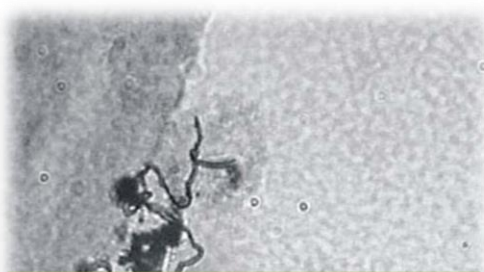
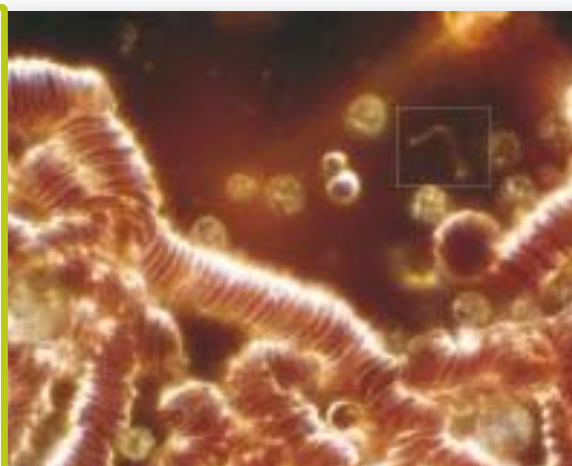


Figura 35. Leptospiras en médula ósea (tinción Warthin-Starry).¹²

Figura 36. *Leptospira* sp., en el examen directo de una muestra de sangre obtenida por punción venosa en tubo con anticoagulante, para observación entre portaobjetos y cubreobjetos con microscopio de campo oscuro, 40X.

En la fase aguda de la enfermedad, durante la respuesta febril, las leptospiras circulan en la sangre y se pueden observar al microscopio. Nótese la presencia de una forma bacteriana sugestiva de *Leptospira* sp., con ganchos en ambos extremos y movimiento ondulatorio. La observación directa presenta baja sensibilidad, debido al escaso número de leptospiras presentes en la sangre, con menores posibilidades de observarla, si ya se ha iniciado la terapia con antibióticos. Debe tenerse en cuenta que el observador poco experto puede confundirlas con cadenas proteínicas de la sangre anticoagulada (seudoespiroquetas) y esto puede alterar la especificidad del método. Por este motivo, toda observación directa de una forma sanguínea sugestiva de *Leptospira* sp., se debe confirmar siempre con un cultivo positivo.⁹⁸



Desventajas

- La microscopía de campo oscuro es técnicamente exigente; reconocer las leptospiras es difícil, en particular cuando están presentes en poca cantidad. Los artefactos, tales como trazos de fibrina en sangre, son fácilmente confundidos con leptospiras.
- Falsos positivos ocurren con frecuencia. En consecuencia, la microscopía de campo oscuro es útil solamente para quienes tienen considerable experiencia observando leptospiras.
- Falsos positivos como falsos negativos son fáciles de realizar motivo por el cual los resultados de la microscopía de campo oscuro de material clínico debe ser siempre confirmada con otras pruebas.⁴⁵

La visualización directa en microscopía de campo oscuro no debe utilizarse como procedimiento único de diagnóstico.^{3, 32}

La sensibilidad es muy baja, debido a que sólo se la puede detectar cuando la concentración de leptospiras está entre 100-200/mL.

Examen directo en campo claro

Para su observación las leptospiras pueden ser coloreadas por una variedad de métodos de coloración, pero muy débilmente como Gram³³ o Giemsa que es necesario realizar extensiones gruesas teñidas con el colorante en sangre recién obtenida, de infecciones incipientes.^{15,32}

También se utiliza coloración de rojo Congo e impregnación Argéntica (**Figura 38**). Estos métodos son empleados para aumentar la sensibilidad del examen directo y se utilizan en estudios histopatológicos (Ver Anexo E para las Tinciones).^{45, 94}

Microscopia de Fluorescencia

Es empleado extensivamente en la demostración de Leptospiras en el campo de la veterinaria utilizando muestras biológicas (**Figura 37**)

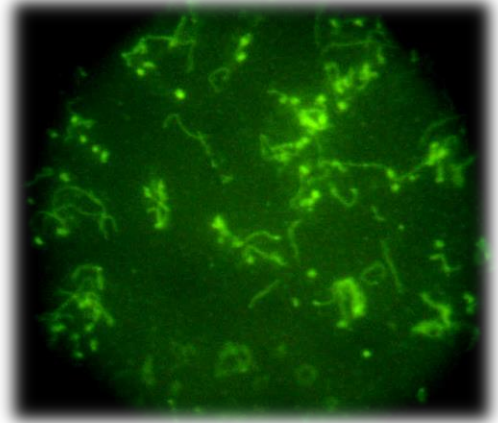


Figura 37. Inmunofluorescencia⁹⁹

Otros formas de observación

- ✓ Microscopia de interferencia (**Figura 40**).
- ✓ microscopia electrónica de barrido (**Figura 39**).
- ✓ Inmunohistoquímica (**Figura 41**).



Figura 38. Se ven tres organismos argirófilos de *Leptospira icterohaemorrhagiae* encontrados en la orina de las ratas del alcantarillado, en Irapuato, Guanajuato, que infectaron a 12 trabajadores. Tinción argéntica X 1,000.⁴⁵

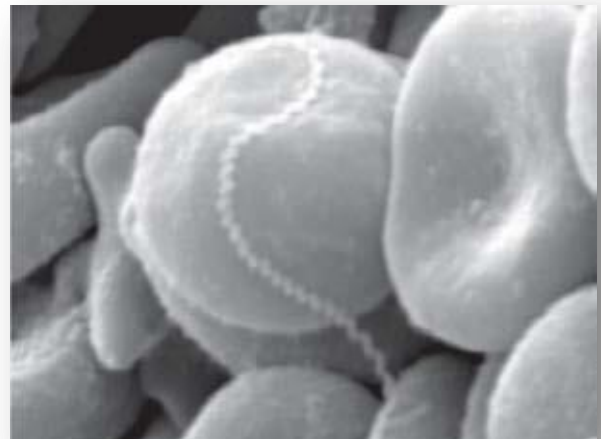


Figura 39. *Leptospira* sobre la superficie de un eritrocito obtenido a partir de sangre periférica de un paciente con leptospirosis crónica, observada con microscopia electrónica de barrido.¹⁰⁰



Figura 40. *Leptospira pomona*. Cultivo con medio de Stuart, microscopia de interferencia. Esta cepa fue aislada en la orina de un trabajador de las porquerizas en Pénjamo, Guanajuato. El enfermo trabajó con cerdos muy contaminados y leptospirúricos durante ocho años.⁴⁵

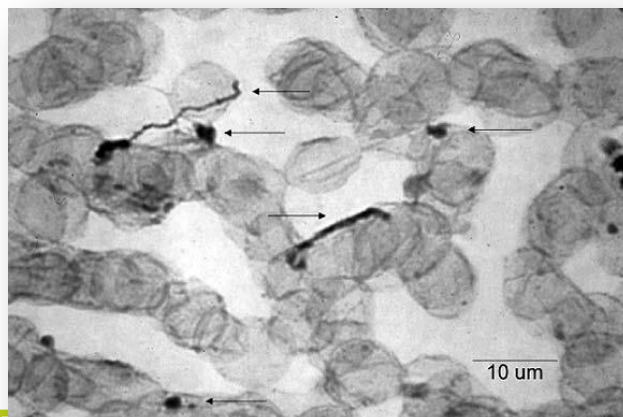


Figura 41. Leptospiras en sangre, detectadas mediante Inmunohistoquímica. Las flechas señalan leptospiras típicas y formas granulares.¹⁰¹



Figura 42. Con microscopia de campo oscuro. En el centro de la preparación, se observa una *Leptospira* obtenida por cultivo de un trabajador del alcantarillado de Irapuato, Guanajuato. Medio de Stuart X 1,000.⁴⁵

6.7.2.2 DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO (CULTIVO Y AISLAMIENTO)

Durante el periodo febril de leptospirosis se puede aislar el microorganismo del líquido cefalorraquídeo; después de la primera semana puede incluso cultivarse a partir de la orina.

El aislamiento es considerado el “estándar de oro” en el diagnóstico de leptospirosis.

El diagnóstico definitivo de leptospira se realiza mediante el aislamiento bacteriológico utilizando los medios microbiológicos (Korthof, Fletcher y EMJH) y finalmente la tipificación empleando métodos serológicos o moleculares. Es una prueba confirmatoria de utilidad para vigilancia epidemiológica.³²

Las leptospiras son fácilmente cultivables, requieren de ácidos grasos como fuente de energía, proliferan en una situación aeróbica a 28 a 30°C.¹⁵

Los requerimientos para el crecimiento de las leptospiras son particulares pero no exigentes. Los únicos compuestos orgánicos que se conocen como nutrientes

esenciales son las vitaminas B1 y B12 y ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga (>C15) constituyen tanto la fuente de energía como de carbono y son requeridos como fuente de lípidos celulares debido a que las leptospiras no pueden sintetizar ácidos grasos desde el principio. Los ácidos grasos libres, debido a su toxicidad inherente, deben ofrecerse a las leptospiras como un compuesto con albúmina. Los carbohidratos no son fuentes adecuadas de energía ni de carbono. Si bien los aminoácidos se utilizan en forma limitada, los mismos no pueden satisfacer los requerimientos de nitrógeno de estos organismos.

El piruvato, nutriente no esencial, ayuda el inicio del crecimiento de leptospiras de difícil desarrollo. En contraste con la mayoría de las otras bacterias, las leptospiras no usan fuentes externas de bases de pirimidina para incorporarlas dentro de su ADN o ARN. Por este motivo, son resistentes a la actividad antibacteriana del 5-fluoracil, análogo de la pirimidina. En consecuencia, este compuesto es usado en medios selectivos, para aislar las leptospiras a partir de fuentes contaminadas.³³

Factores que afectan la viabilidad de las Leptospiras.

Existen factores externos que deben tomarse en cuenta debido a que afectan la supervivencia de las leptospiras in vitro.

- ★ Cristalería lavada inadecuadamente.
- ★ Medios de cultivo inapropiados.
- ★ Sustancias inhibidoras.
- ★ Tratamiento con antibióticos.
- ★ Contaminación.
- ★ Temperatura de incubación (28-30°C)
- ★ pH del medio (7.2-7.4) .¹⁰

MEDIOS PARA EL CULTIVO DE LEPTOSPIRAS

Se ha descrito una amplia variedad de medios para el cultivo de leptospiras. (Ver Anexo B para la preparación de medios de Cultivo). Estos pueden ser divididos en seis grupos:

- Medio tradicional conteniendo aproximadamente de 8 a 10% de suero de conejo (Stuart, Korthof, Fletcher, Vervoort, Schüffner). El suero de conejo contiene la más alta concentración de vitamina B12 ligada, la cual es esencial para la multiplicación de las leptospiras. El título de aglutininas antileptospiras en suero de conejo es usualmente bajo, comparado con el encontrado en otros animales pero los sueros deben ser revisados para determinar presencia de anticuerpos. Los medios de Schüffner y Korthof tienen la desventaja de contener fosfato el cuál puede precipitar, lo que no es deseable en la prueba de aglutinación microscópica (MAT). El medio semisólido Fletcher resulta adecuado para el aislamiento y mantenimiento de cepas de referencia hasta 3 meses.
- El medio Tween80/albúmina sérica de bovino (BSA) o Ellinghausen & McCullough y su modificación por Johnson & Harris (EMJH). El componente más costoso de este medio es la BSA. ^{28, 33,45} Los medios líquidos como EMJH permiten el desarrollo de las leptospiras en forma abundante y son

habitualmente utilizados para el desarrollo de cepas utilizadas en las pruebas serológicas.^{2, 33,40}

- Medio bajo en proteína o medio libre de proteína, usualmente utilizado para la preparación de vacunas (Shenberg, 1967; Bey & Johnson, 1978).
- Medio enriquecido. Empleado para intensificar el crecimiento de leptospiras con requerimientos nutricionales complejos, tales como el serovar *hardjo*; los medios pueden enriquecerse agregando suero (p.ej. 1 - 4% de suero fetal bovino (FCS) y suero de conejo) u otros ingredientes tales como hidrolizado de lactoalbúmina, superóxido dismutasa y piruvato (Ellis, 1986). El medio EMJH es frecuentemente enriquecido agregando 1% de suero de conejo y 1% de FCS.
- Medio selectivo con 5-fluorouracil (y/u otro antimicrobiano como neomicina, ácido nalidixico, actidione, sulfadiazol, rafimpicina, anfotericina B). Estos aditivos pueden suprimir el crecimiento de bacterias contaminantes en muestras clínicas no estériles, sin afectar las leptospiras, pero pueden causar una reducción en el crecimiento de las leptospiras. Esto es particularmente cierto con el sulfadiazol.^{2, 33,40}
- Medio diferencial: Este medio se utiliza para la diferenciación de especies por sus características fenotípicas, está compuesto por EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos más 8 azaguanina, ya que éste compuesto (8-AZ) es una purina que se incorpora al medio de cultivo y se utiliza como inhibidor del crecimiento. La cepa patógena *Leptospira interrogans* no crece en presencia de 8-azaguanina y la cepa no patógena **Leptospira biflexa** ha demostrado resistencia a la acción bacteriostática, por lo que ésta especie si crece en éste medio diferencial.¹⁷

Los cultivos en embrión de pollo se han utilizado con buenos resultados para fines de aislamiento, desarrollándose las leptospiras en la membrana corioalantoidea en un término medio de 10 días.¹¹

Siembra

-  Se siembran unas gotas de sangre heparinizada o anticoagulada con oxalato de sodio en los tubos de medios semisólidos enriquecidos.⁹⁷ Deben inocularse solo volúmenes pequeños de sangre u orina porque los volúmenes más grandes pueden introducir sustancias de interferencias. Los medios deben ser inoculados con 1 a 2 gotas de la muestra en 10 ml de medio semisólido (por tubo).^{28, 102}
-  Después de la fase aguda se debe hacer urocultivos, ya que después de la primera semana, las leptospiras se alojan en los riñones, y la orina contienen grandes cantidades de bacterias.² La orina se debe sembrar poco después de la recolección, dado que la acidez (diluida en el medio líquido) puede dañar las espiroquetas. Se agrega 1 a 2 gotas de orina sin diluir y una dilución 1:10 de orina a 5 mL de medio. El agregado de 200 microlitros de 5 -fluorouracilo (un fármaco oncológico) impide la contaminación con otras bacterias sin dañar las leptospiras. Las muestras tisulares sobre todo las hepáticas o las renales, se pueden macerar en condiciones de asepsia y sembrar en diluciones de 1:1,

1:10 y 1:100, como cultivos los cultivos de orina (Ver Anexo C para Siembra en medios de cultivo).⁹⁷

Incubación

La incubación de los cultivos se realiza a temperatura ambiente o a 28-30°C en la oscuridad durante un lapso de 6 a 8 semanas.^{28,97}(otros autores reportan 5 a 6 semana).¹⁰²

Interpretación

Después de una a dos semanas las leptospiras producen una zona difusa de proliferación cerca de la porción superior del tubo y más tarde un anillo de crecimiento al nivel del tubo que corresponde al nivel de la tensión óptima de oxígeno para los microorganismos (**Figura 43**).¹⁵

Debido a su lento desarrollo y que los microorganismos crecen por debajo de la superficie con un desarrollo de forma de banda de 0.5 a 1 cm, se debe analizar una vez por semana materiales obtenidos de un par de centímetros por debajo de la superficie de los cultivos en caldo para detectar crecimiento con un preparado en fresco observado con microscopio de campo oscuro (**Figura 45**). Las leptospiras muestran una movilidad de tipo sacacorchos.^{28,97}

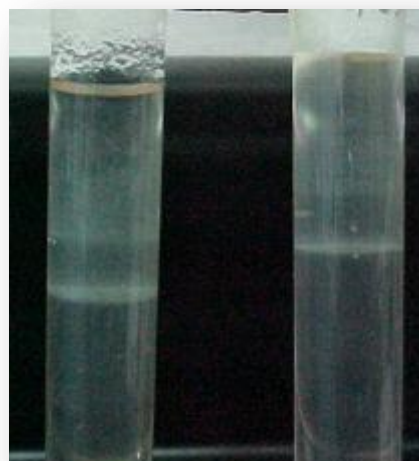


Figura 43. Cultivo positivo de leptospiras en medio EMJH. Para observar el desarrollo macroscópico en el medio líquido, caracterizado por la opalescencia “nube”, agitar suavemente el cultivo y observar a través de la luz natural o artificial. La presencia de sedimento o turbidez indica que el cultivo está contaminado.¹⁵

El tiempo de incubación para obtener el crecimiento óptimo varía de unos cuantos días a 4 semanas o más, pero generalmente se alcanza de 6 a 14 días. Durante el periodo de crecimiento máximo la concentración de organismos varía de 1 a 4 X10⁸ / mL.⁴⁰

Su tiempo de duplicación es de 6-16 h, con un periodo de incubación de aproximadamente 2 semanas.⁵⁸

No debe considerarse el cultivo como negativo sino hasta transcurrido un mes (otros autores reportan hasta 4 meses).³³ El crecimiento en medios líquidos se manifiesta por enturbiamiento (**Figura 44**); y en los medios semisólidos, el desarrollo se inicia a 1-2 cm de la superficie, pero la morfología colonial no es característica.⁴⁵

En los medios de cultivo después de 15 días las leptospiras empiezan a presentar polimorfismo, observándose formas irregulares muy largas, con pérdida de sus espiras, o bien formas granulosas.⁴⁰

Desafortunadamente las leptospiras crecen muy lentamente y para el momento que pueden ser identificadas en el cultivo, el paciente tendrá anticuerpos detectables por serología. Por esta razón, el cultivo no contribuye a un diagnóstico rápido en la fase temprana de la enfermedad. También es un método relativamente insensible, sin embargo, el cultivo puede ser un método útil para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes que mueren muy rápido después de la aparición de los síntomas y antes que los anticuerpos puedan ser detectables.³³



Figura 44. Crecimiento en medio líquido.¹³



Figura 45. *Leptospira* sp. al examen directo por microscopio de campo oscuro (de cultivo de sangre en medio líquido Elling-Hausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), después de cuatro semanas de incubación a temperatura de 25 °C a 28 °C, 40X.

Obsérvese la abundante cantidad de formas sugestivas de *Leptospira* sp., en este cultivo. Por ser microorganismos de crecimiento lento, se les debe hacer seguimiento a los cultivos con el microscopio de campo oscuro, al menos por un periodo de ocho semanas -la Organización Mundial de la Salud recomienda seguimiento de 12 a 16 semanas-, antes de reportarse como negativos.

Para tener éxito en el cultivo de este microorganismo, se requieren condiciones especiales para su realización, como sembrar la muestra en el menor tiempo posible después de su obtención. En el caso de remitir las muestras para que se cultiven en otro laboratorio debe hacerse a temperatura ambiente pues las bajas temperaturas son deletéreas para las especies patógenas. Es necesario tener en cuenta estas condiciones si se desea tener éxito en el aislamiento de la bacteria.⁹⁸

6.7.2.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las leptospiras se pueden distinguir de otras espiroquetas sobre la base de la cantidad de espiras y los ganchos de los extremos.

Para diferenciar entre las leptospiras patógenas y no patógenas, desde el punto de vista fisiológico los métodos más apropiados son: el crecimiento a diferentes temperaturas en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos y la 8-azaguanina. Las leptospiras patógenas se caracterizan por no crecer en presencia de 8-azaguanina y a temperatura de 13°C¹⁸, los saprofitos tienen la capacidad de crecer a temperatura de 10°C e inferiores o al menos 5 °C por debajo de la temperatura de crecimiento de las leptospiras patógenas.⁹⁷

Otra forma para diferenciar *Leptospira interrogans* patógena de la *Leptospira biflexa* no patógena es a través de pruebas bioquímicas tales como: ^{17, 103}

- 1) *Leptospira interrogans*
 - a. Catalasa fuertemente positiva(**Figura 46**)
 - b. Peroxidasa débilmente positivo o negativo

- 2) *Leptospira biflexa*
 - a. Catalasa débilmente positivo o negativo
 - b. Peroxidasa fuertemente positivo

(Ver Anexo D para la realización de pruebas Bioquímicas)

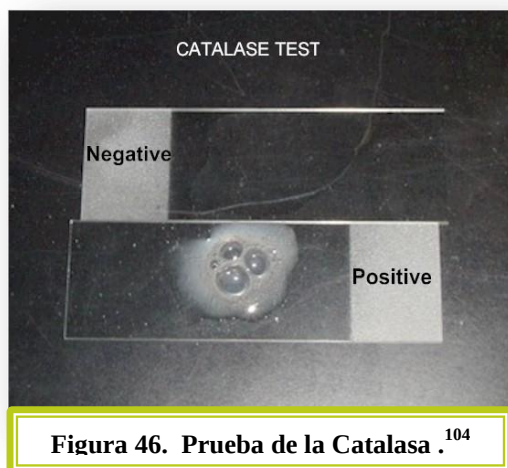


Figura 46. Prueba de la Catalasa .¹⁰⁴

6.7.2.4 DIAGNÓSTICO INDIRECTO (SEROLÓGICOS)

El diagnóstico de leptospirosis en muchos casos se confirma por métodos serológicos.

Ponen de manifiesto los anticuerpos específicos, es decir, constituyen métodos de diagnóstico inmunológico.⁴⁰

Los métodos inmunológicos alcanzan su efectividad dos semanas después de iniciados los síntomas, persistiendo positivos mucho tiempo después que han desaparecido totalmente las leptospiras del organismo, aunque los títulos de anticuerpos se encuentran disminuidos con relación al periodo en que hay manifestaciones clínicas, por lo que son utilizados tanto para estudios clínicos como epidemiológicos.⁴⁰

El diagnóstico serológico de leptospirosis requiere un incremento de cuatro veces o más del título de anticuerpos aglutinantes (es posible detectar títulos por arriba de 1:10000) y estos aparecen en primer lugar cinco a siete días después de la infección y poco a poco llegan a un punto máximo a las cinco a ocho semanas.^{15, 91}

Métodos serológicos.

1) Detección del antígeno

La detección de antígenos de leptospira en material biológico ofrece mayor sensibilidad y especificidad que la microscopia por campo oscuro. La producción de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos de leptospira ha permitido la utilización de diferentes técnicas para el diagnóstico, entre las cuales se encuentran:

102

2) PRUEBA DE TAMIZAJE: Prueba de Ensayo inmunoenzimático (ELISA) Indirecto IgM

El método de ELISA es usado como una prueba serológica adicional, rápida, o como una alternativa a la prueba de Microaglutinación (MAT). Es el método más usado para detectar leptospirosis aguda. Los anticuerpos de tipo IgM son los que se producen primariamente y éstas se pueden detectar específicamente por ELISA (**Figura 47 y 48**).^{32, 54}

Las pruebas de detección de IgM se utilizan principalmente porque estos anticuerpos se vuelven detectables durante la primera semana de enfermedad lo que permite iniciar el tratamiento; y la detección tardía de IgG permite diferenciar infecciones recientes de pasadas.^{2, 28, 33, 97, 102}

La detección de anticuerpos IgM con una sola muestra es considerada confirmatoria de una infección reciente. La técnica se considera más sensible que MAT, es fácil de estandarizar, los antígenos se pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos. Con las nuevas técnicas moleculares se ha implementado un ELISA utilizando antígenos recombinantes como LipL32, OmpL1, LipL41, Hsp58 y LipL36, indicando que rLipL32 puede ser un antígeno útil en el diagnóstico serológico de leptospirosis.

Figura 47. Kit de Diagnóstico para Leptospira (IgM).¹⁰⁵Figura 48. Kit ELISA para Leptospira.¹⁰⁶

3) DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

La detección de anticuerpos es el método serológico más utilizado en el diagnóstico de leptospirosis. Los anticuerpos pueden ser detectados desde el día 6 al 10 del inicio de la enfermedad y generalmente alcanzan niveles pico dentro de la 3ra a 4ta semana. Los niveles de anticuerpos gradualmente disminuyen pero pueden permanecer detectables por años. Los métodos serológicos pueden dividirse en dos grupos: aquellos que son específico de género y los que son serogrupo específico. La prueba serológica ampliamente utilizada en la investigación de leptospirosis a nivel mundial sigue siendo la prueba de aglutinación microscópica (MAT).¹⁰²

PRUEBA CONFIRMATORIA

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA (MAT).

Es la prueba de diagnóstico estándar de referencia internacional para la confirmación serológica de una infección reciente o pasada causada por leptospiras.³²

Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos antileptospiras en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad. Es el método de referencia para el diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos aglutinantes contraantígenos vivos de *Leptospira* con el fin de determinar el serovar causante de la infección,^{31, 55, 65} debido a su alta sensibilidad y especificidad.^{17, 32}

El MAT es considerado el método de referencia; consiste en hacer reaccionar sueros de pacientes sospechosos o enfermos con suspensiones de antígeno vivo de leptospira (serovares) con 6 a 8 días de crecimiento en medio líquido EMJH, para aumentar la sensibilidad de la prueba se recomienda utilizar un panel de los serovares más representativos de la región.

Los sueros se enfrentan en diluciones seriadas (**Figura 50**) con igual volumen de una suspensión de $1.5 - 2 \times 10^8$ leptospiras (antígeno). Después de incubar, la reacción antígeno-anticuerpo es visualizada a través de la aglutinación en un microscopio de campo oscuro. El título final de anticuerpos se considera como la dilución más alta de suero que produce el 50% de la aglutinación (50% de leptospiras aglutinadas y 50% de leptospiras libres, con respecto al control), MAT detecta anticuerpos de clase IgM e IgG (**Figura 49**).^{33, 45} Los anticuerpos IgM contra *Leptospira* spp llegan a ser perceptibles durante la primera semana de enfermedad.¹⁷

Para que el antígeno sea óptimo para la prueba tiene que observarse en el microscopio de campo oscuro entre 150 a 200 leptospiras por campo o hasta lograr una turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland.¹⁷

Los puntos de corte utilizados en los laboratorios varían de una región a otra, sin embargo se ha considerado en caso de obtener una sola muestra, que títulos serológicos = 1:800 confirman el diagnóstico. Los títulos comprendidos entre 1:50 y 1:800 deben ser interpretados en el marco de la situación clínico-epidemiológico del paciente. Algunos consideran un título de 1:100 como positivo, mientras que otros aceptan 1:200, 1:400 o 1:800 como diagnóstico de una infección actual o reciente.³³

Requerimientos de la muestra para MAT

★ Sangre completa o suero recogido en tubo seco, en cantidad de aproximadamente 5 ml., en base a muestra extraída lo más precozmente posible frente a sospecha de la enfermedad.^{51, 65}

★ Antígenos

Los antígenos que se utilizan en esta técnica son cultivos de leptospiras vivas, de 10 días de crecimiento en medio líquido de EMJH, con enriquecimiento.

Para la selección del panel de antígenos se utilizan los criterios determinados por los organismos de referencia internacionales

coordinados por OMS. Estos Laboratorios proveen de los serovares necesarios en forma anual a pedido del laboratorio especializado.

Los sub-cultivos en el laboratorio de diagnóstico sufren variantes que pueden dificultar la lectura, por lo que es necesario la preparación de sueros hiperinmunes para el control periódico de las cepas.⁵¹ Esta técnica es cualitativa y cuantitativa

Al igual que otras pruebas serológicas, se requiere estudiar dos muestras pareadas de 7 a 14 días de intervalo entre la primera y la segunda muestra, si se observa seroconversión o un cambio en el título de al menos, cuatro veces el título inicial es considerado confirmativo. Existen estudios que reportan una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92 % y 95 %, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95 % y negativo 100 %. A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva y requiere de la experiencia del observador, requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras y esto representa un riesgo laboral.^{17, 33, 102}

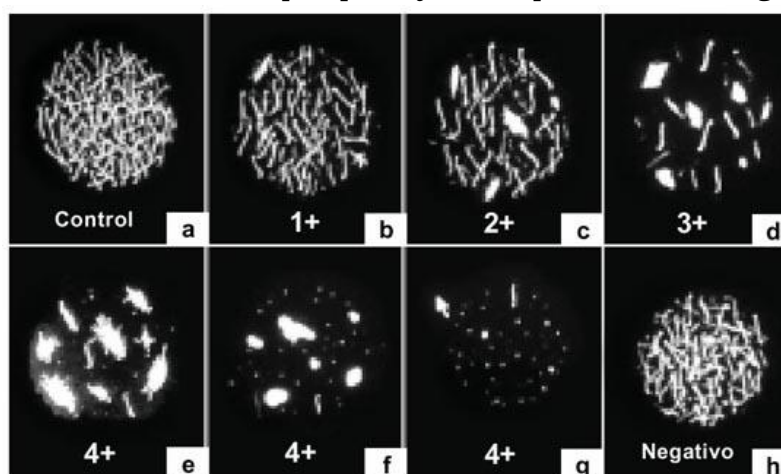


Figura 49. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) a: lámina control; B: lámina con 25% de aglutinación (zonas como copos de algodón); c) lámina con 50% de aglutinación; d) lámina con 75% de aglutinación; e) lámina con 100% de aglutinación; f) lámina con 100% de aglutinación y lisis; g) lámina con 100% de lisis; h: lámina negativa.³³

Especificidad de la técnica de MAT

Los pacientes producen, normalmente, anticuerpos aglutinantes contra el serovar infectante; sin embargo, anticuerpos con reacción cruzada frente a otros serovares también son a menudo encontrados siendo esto particularmente notable al inicio de la infección. En las primeras semanas de la enfermedad, las reacciones cruzadas heterólogas con otros serovares pueden ser aún más fuertes que la reacción homóloga con el serovar infectante.

Ocasionalmente, una reacción heteróloga puede ser positiva mientras que una reacción homóloga es o permanece negativa, fenómeno llamado reacción paradójica. El título de los anticuerpos de reacción cruzada tiende a disminuir relativamente rápido, después de algunos meses, mientras que los anticuerpos serogrupo y serovar específicos pueden persistir por un tiempo más largo, algunas veces por años.³³

Se ha encontrado que:

- Anticuerpos aglutinantes con frecuencia reaccionan solamente con ciertos serovares o serogrupos.
- Muchos serovares pueden circular y causar enfermedad en un área determinada.
- La prevalencia de diferentes serovares puede cambiar como resultado de la introducción de nuevos huéspedes de mantenimiento, prácticas de agricultura, etc. Nuevos serovares pueden ser introducidos.³³

Por esta razón, se deben mantener en el laboratorio paneles de leptospiras vivas pertenecientes a diferentes serovares para ser usadas como antígenos en la MAT. El panel deben incluir como mínimo, todos los serovares que circulan localmente. Si el panel está incompleto, los anticuerpos del serovar que está ausente en el panel puede no ser detectado y el serodiagnóstico dar resultados imprecisos o falsos negativos. Si los serovares circulantes localmente no son conocidos o están sujetos a cambio, el panel debe constar o incluir serovares representantes de todos los serogrupos.³³

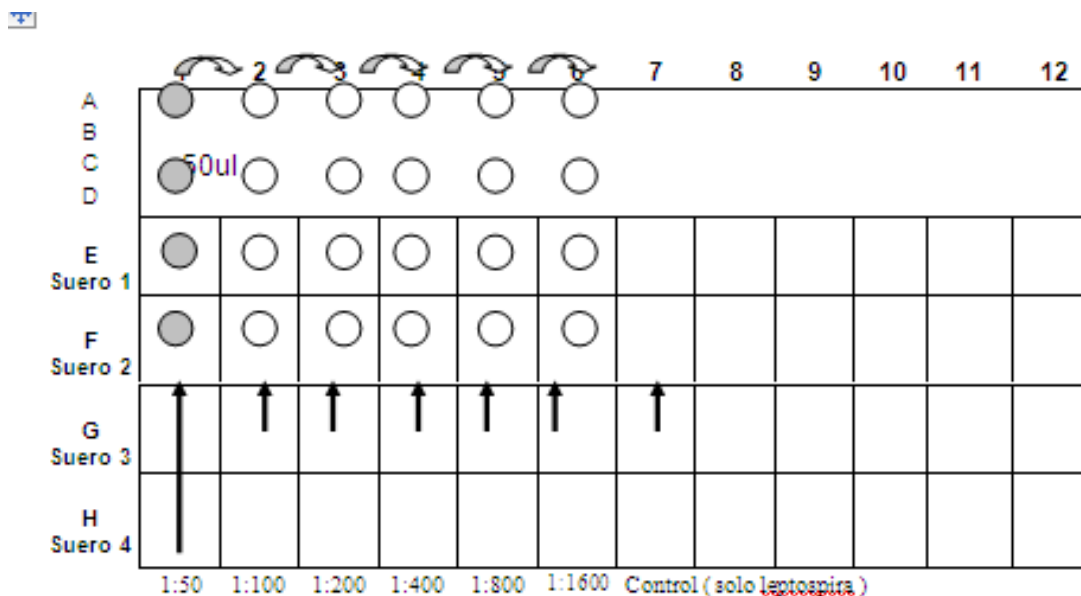


Figura 50. Diluciones seriadas para MAT.⁶⁵

OTRAS PRUEBAS SEROLÓGICAS (DIAGNOSTICO PRESUNTIVO)

La falta de instalaciones para el aislamiento, realización del MAT o PCR, en los países en desarrollo ha permitido adoptar métodos diagnósticos simples y rápidos (**Figura 52 y 53**) como los kits comerciales de ELISA para la detección de IgM que utilizan antígeno de la cepa patoc1 *L.biflexa* (el inconveniente de esta prueba es que no puede evaluarse el serovar infectante) entre otros como: ¹⁰²

❖ **Microprueba de aglutinación cápsula (MCAT)**

❖ **LEPTO Dipstick (Figura 51)**

Detecta anticuerpos específicos para *Leptospira* tipo IgM. La prueba es rápida y no requiere equipo especial. La sensibilidad y especificidad es similar a la ELISA para detección de IgM. Usualmente los anticuerpos se detectan a los 7-10 días del apareamiento de la enfermedad.

❖ **Prueba de aglutinación macroscópica (SAT)**

Aglutinación Macroscópica en placa. Este es un método rápido de aglutinación descrito por Galton y col donde empleaba diversos serovares de *Leptospira* que eran formolados y se enfrentaban al suero de paciente (**Figura 53**).⁹⁴

❖ **Prueba de hemoaglutinación indirecta (HA)**

Se utilizan antígenos preparados a partir de cepas de *Leptospira biflexa* para sensibilizar glóbulos rojos del tipo O-negativo fijados previamente con aldehído pirúvico. Los glóbulos sensibilizados se agregan a diferentes diluciones del suero de paciente, se incuba por dos horas. Cuando la muestra es negativa se observa un botón de glóbulos en el fondo de los pocillos. Esta prueba es bastante sensible, específica y de gran utilidad para el diagnóstico temprano de la infección, pero es laboriosa y no sustituye a la prueba MAT.⁹⁴ Detecta anticuerpos específicos tipo IgM a los 7 – 10 días de la enfermedad.

Interpretación: Un título mayor o igual a 1:80 de un solo suero tomado de un caso sospechoso diagnosticará la enfermedad. Títulos menores de 1:80 o negativos pero con sospecha permanente de leptospirosis deberá tomarse una segunda muestra para demostrar aumento en títulos de 2 o más diluciones.

❖ **Prueba de aglutinación macroscópica con antígeno termoresistente (TR)**

Este antígeno fue elaborado por Mazonelli y col. utilizando cultivos de *Leptospira* inactivados con calor.

Este es una prueba rápida que requiere solo 1 gota de antígeno y 1 gota de suero que se mezclan y se dejan en agitación en un rotador por cinco minutos para luego visualizar la microaglutinación. Se ha reportado que este antígeno detecta anticuerpos del tipo IgM y resulta positivo hasta 45 días después del inicio de los síntomas.⁹⁴

★ **Inmunofluorescencia Indirecta**

Es una técnica útil para muestras de orina, suero y órganos pero poco utilizada.⁵¹

Se basa en la fluorescencia que emiten los anticuerpos marcados con isocianato de fluoresceína, estos son usados como conjugados y sirven para

detectar en forma indirecta los anticuerpos antileptospiras presentes en el suero del paciente, que se unen a los antígenos presentes en las láminas sensibilizadas. Es una técnica ampliamente utilizada, tan sensible y específica como el ELISA pero requiere de reactivos y del microscopio de fluorescencia que encarecen la prueba.⁹⁴

❖ **LEPTO Dri-Dot**

Esta técnica consiste de partículas de látex coloreadas y sensibilizadas con un antígeno de *Leptospira* que es secado directamente sobre una tarjeta de aglutinación especial. La prueba se basa en el hallazgo de anticuerpos específicos de *Leptospira* presentes en el suero del paciente que al reaccionar con el antígeno causan una aglutinación granular. El ensayo no requiere de equipos especiales y los resultados se obtienen en 30 segundos. Los ingredientes son altamente estables y pueden ser almacenados a temperatura ambiente. La sensibilidad de la prueba es alta (90%) y su especificidad de 92%.^{52, 102}

Interpretación: El resultado es positivo cuando existe aglutinación y es negativo cuando la suspensión permanece homogénea. Los sueros recolectados en etapas muy tempranas de la enfermedad son negativos, es necesario tomar una segunda muestra siete días después de la primera.

Ventajas: Fácil y rápida de hacer, bien estandarizada, alta estabilidad de los reactivos, no necesita refrigeración, no requiere de equipo especial y es muy fácil de leer.¹⁰²

Son fácilmente realizadas y dan resultados relativamente rápidos. Los resultados de las pruebas de rastreo, tanto si son positivos o negativos, deben ser confirmados por otras pruebas y preferiblemente por la MAT.^{33,94, 102}

LEPTO Dipstick assay



Figura 51: Lepto Dipstick assay .¹³



**Figura 52: Prueba Rápida de *Leptospira*:
Detección cualitativa de anticuerpos de
Leptospira interrogans.⁵⁴**



**Figura 53. Leptorapide es una prueba de
aglutinación rápida del látex para la diagnosis de la
leptospirosis humana.¹⁰⁷**

6.7.2.5 ESTUDIOS MOLECULARES

El diagnóstico molecular es útil para detectar leptospirosis, sobretodo en materiales contaminados o de difícil aislamiento, o cuando no están viables.

Para la taxonomía e identificación actualmente se utilizan la PCR, la restricción de ADN por endonucleasas y las que utilizan anticuerpos monoclonales.³

La PCR (polimerasa chain reaction) identifica el ADN de manera específica con elevada sensibilidad y en corto período de tiempo a partir de cualquier material clínico(s) (sangre, orina, tejidos post mortem). Es un método de amplificación de segmentos específicos del DNA, por ej., en muestras clínicas como sangre, hasta que alcancen niveles detectables. De esta manera, la presencia de leptospirosis es confirmada por la detección e identificación de segmentos específicos del ADN de *Leptospira*.^{30, 31,33}

La PCR tiene como ventajas la confirmación rápida del diagnóstico en la fase inicial de la enfermedad y la detección del ADN del microorganismo, no dependiendo de la viabilidad del agente.

El punto crítico de la técnica PCR es la etapa de extracción del ADN, debiéndose ajustar a los diferentes tejidos y fluidos.¹⁰²

Una de las mayores desventajas es que es una técnica de costo elevado, pero su utilidad para el diagnóstico es crítica ya que permite demostrar al agente en los primeros ocho días de la enfermedad, mientras que los anticuerpos aparecen en forma significativa hasta después de los 15 días y el cultivo puede llegar a tardar hasta dos meses.^{17,31}

La técnica de PCR tiene una gran sensibilidad, puede detectar la presencia de dos o tres copias de la secuencia buscada, así como también especificidad ya que puede reconocer género, especie y variedad de un microorganismo en menos de 3 horas (**Figura 54**).¹⁷

En la actualidad, se ha descrito un PCR cuantitativo en tiempo real, con alta sensibilidad, que permite detectar a la *Leptospira* distinguiendo entre especies patógenas y no patógenas en muestras clínicas y ambientales, permitiendo un diagnóstico rápido, que puede servir incluso cuando el paciente ya ha comenzado su tratamiento antibiótico.²³

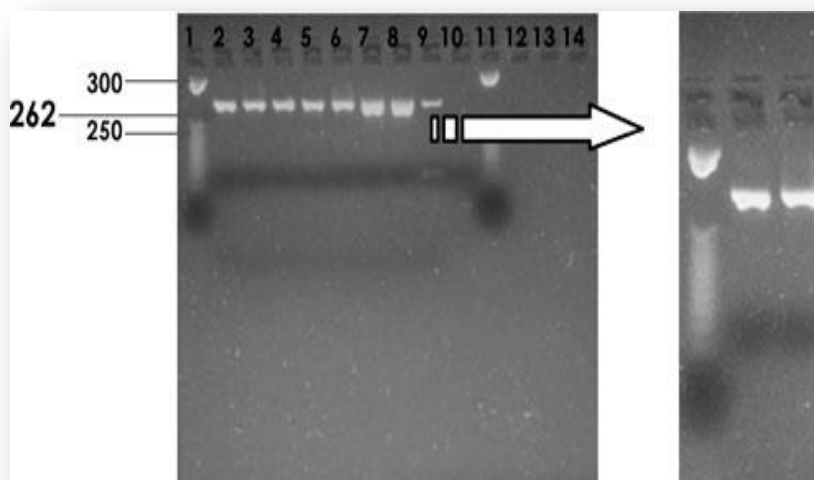


Figura 54. Caracterización de cepas patógenas y saprofitas

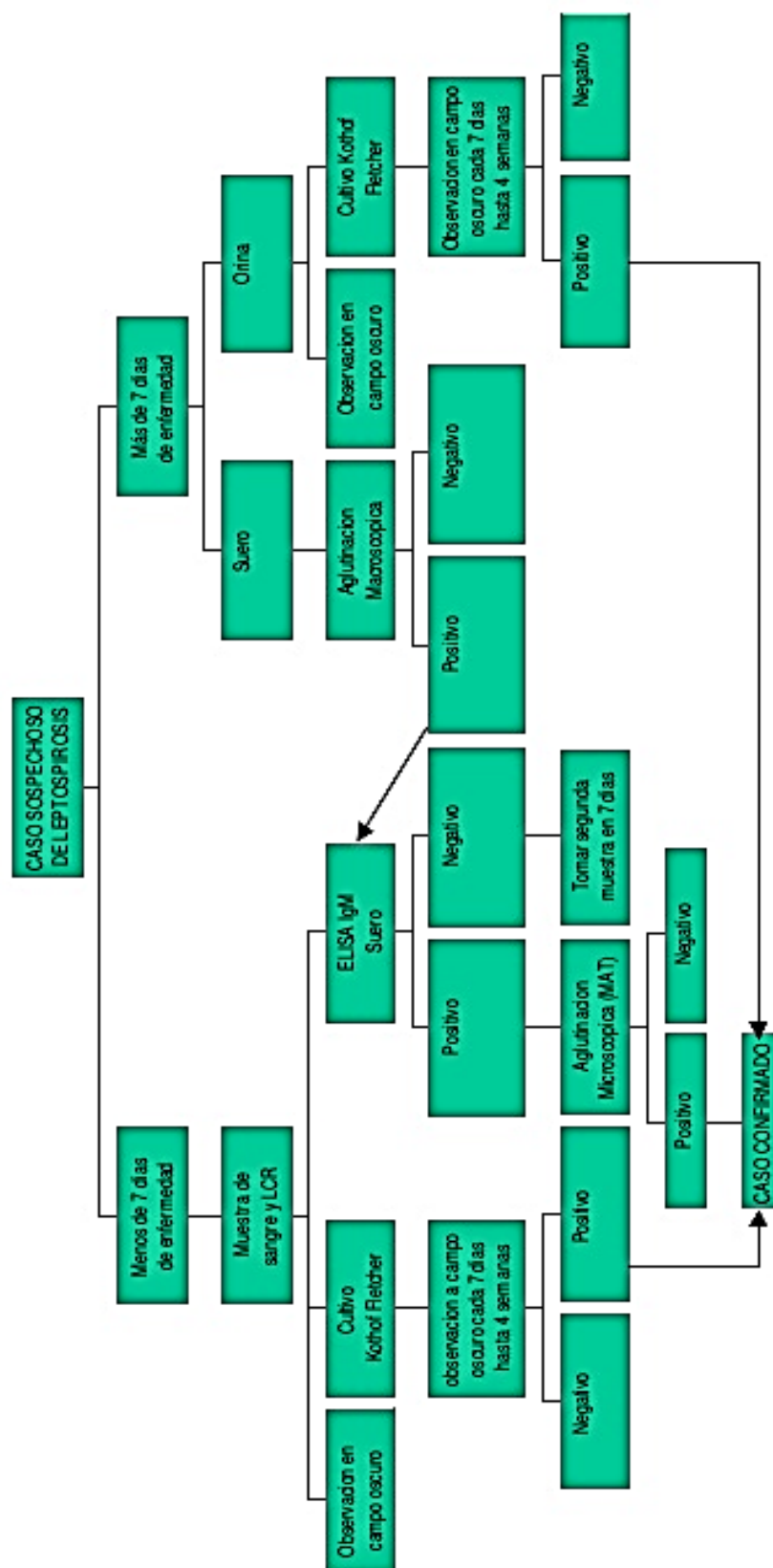
En la parte izquierda de la figura se observa la banda de 262 pb en muestras y controles positivos que identifica leptospirosis patógenas (carriles 2 a 9); en los carriles 1 y 11, el marcador de peso molecular con bandas de 300 y 250 pb; en el carril 10, el blanco de reactivos.

En la derecha se observa una ampliación de la foto que evidencia claramente las bandas ³⁸

Cuadro 10: Diagnóstico por laboratorio de leptospirosis en función del tiempo de inicio de la enfermedad.⁵²

Método	Muestras en estudio				
	Fase de la enfermedad	SANGRE	LCR	ORINA	BIOPSIA
Búsqueda de leptospiras por campo oscuro	De 15 días en adelante o después del inicio de terapia antibiótica	-	-	+	-
Cultivo en medio de Fletcher	Después de 3 días	+	+	+	+
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Después de 3 días	+	+	+	+
Titulación de anticuerpos por pruebas IgM	Después del día 5°	+	-	-	-
Titulación de anticuerpos por MAT	Primera muestra inicio de síntomas (fase aguda) segunda muestra (fase convaleciente) con intervalo entre muestras de 15 días	+	-	-	-
Estudio histopatológico	Post mortem	-	-	-	+

Flujograma para Diagnóstico de Leptospirosis



6.8 FASE POSANALÍTICA

6.8.1 Informe de resultados

Se presentan tan pronto como la información útil esté disponible de acuerdo a:



Criterios de laboratorio

El cual especifica que todo caso sospechoso confirmado por una o más de las siguientes pruebas de laboratorio:

✓ **Aislamiento:**

Aislamiento de leptospiras patógenas durante la fase aguda de la enfermedad, obtenidas por cultivo de sangre (en los primeros 7 días) o del líquido cefalorraquídeo (del cuarto al décimo día) y de la orina después del décimo día.

✓ **Serología:**

1. Serología positiva mediante la prueba de aglutinación microscópica (MAT), con aumento de 4 veces o más de los títulos entre la fase aguda y convaleciente, con intervalo de 2 semanas o más entre las 2 muestras y estudiadas en el mismo laboratorio. En caso de disponer de una única muestra, un título serológico igual o superior a 1/800 en la MAT, confirma el diagnóstico. Los títulos comprendidos entre 1/50 y 1/800 deben ser interpretados en el marco de la situación clínico-epidemiológica del paciente.⁵¹

En caso de disponer de dos muestras con 10 días de intervalo una serología positiva en la MAT con aumento de 4 veces o más de los títulos entre la fase aguda y la fase convaleciente.

2. Pruebas ELISA positiva para IgM (punto de corte de acuerdo al instructivo de la casa productora); considerándose significativa de acuerdo a la situación clínico-epidemiológica y análisis del paciente. Biopsia positiva (por inmunofluorescencia o coloraciones de plata) en muestras de hígado, riñón, pulmón. Reacción en cadena de la polimerasa en muestras de sangre, LCR, orina o tejido. Un resultado negativo de cualquier prueba serológica en una muestra recolectada antes del séptimo día de inicio de síntomas, no descarta un caso probable de leptospirosis, se debe tomar una segunda muestra después del séptimo día de inicio de la enfermedad para obtener un diagnóstico.⁵²

✓ **Clínico-epidemiológico:**

Todo caso sospechoso con clara evidencia de asociación epidemiológica.

El médico interpreta los datos y receta el medicamento más indicado para el paciente.⁵¹

CAPÍTULO 7

7 TRATAMIENTO

El tratamiento con antibióticos efectivos debe ser iniciado tan pronto como se sospeche un diagnóstico de leptospirosis y preferiblemente antes del quinto día de la aparición de la enfermedad.^{39, 50} Teniendo en cuenta que la leptospirosis es una enfermedad tratable si se detecta y se trata a tiempo con antibióticos (Cuadro 11).⁵⁴

La hidratación es el procedimiento fundamental para el tratamiento a fin de evitar la descompensación ocasionada por la fiebre, anorexia y vómitos. Los principios de hidratación son los ampliamente conocidos.²⁹

Los beneficios de los antibióticos después del quinto día de la enfermedad son discutibles. Sin embargo, la mayoría de los médicos trata con antibióticos independientemente de la fecha de la aparición de los síntomas.³³

Existe controversia sobre la eficacia del tratamiento antimicrobiano en la leptospirosis leve y febril, por lo que los cuadros más leves de leptospirosis probablemente no requieren tratamiento alguno.

Los casos menos severos pueden ser tratados con antibióticos orales como la amoxicilina, ampicilina, doxiciclina o eritromicina. Cefalosporinas de tercera generación, tales como ceftriaxona y cefotaxime, y antibióticos quinolónicos parecen ser también efectivos.^{33, 83} También se hace con penicilina, tetraciclina o estreptomina.^{2, 63} Cuando se hace en forma temprana se acorta la evolución del paciente, pero cuando se hace después de cuatro días de evolución, no se modifica el curso de la enfermedad.²

Los casos severos (icterohemorrágica y/o pulmonar) deben ser tratados con Penicilina vía intravenosa (1.5 millones U/ I.V cada 6 horas), o Ceftriaxona (1g/I.V por día), o Ampicilina (1g/I.V cada 6 horas), por 7 días. También es necesario hospitalización y cuidado intensivo con una estricta atención al balance de líquidos y electrolitos.

CUADRO 11: 27,29, 30, 32, 34,35, 39, 48, 62

Tratamiento de Leptospirosis leve

Adultos	Doxiciclina 100 mg. c/12 horas (V.O) x 7 días
	Amoxicilina 500mg c/8 horas (V.O) x 7 días a 10 días
	Ciprofloxacina 500mg c/12 horas (V.O) x 7 días
	Penicilina en dosis de 6.000.000 U/día por 7 días
	Eritromicina 500 mg c/6 horas (V.O) por 7 días
Niños hasta 40 Kg	Amoxicilina 30-50 mg/kg/día dividido en 3 dosis(V.O) por 7 días
	Eritromicina 25-50 mg/kg/día dividido en 4 dosis (V.O) por 7 días.
Gestantes	Amoxicilina 500 mg/ c/8 h (V.O) por 7 días
	Eritromicina 500 mg c/6h (V.O) por 7 días
Embarazadas	Amoxicilina 500 mg VO cada 6 horas
	Claritromicina 500 mg cada 12 horas
No usar doxiciclina	

Todos los regímenes usados serán por 7 días

Tratamiento de Leptospirosis moderada a severa

En los casos más graves es fundamental administrar los antibióticos adecuados lo más pronto posible. Los casos severos de leptospirosis deben ser tratados con altas dosis de penicilina endovenosa.

Adulto	Bencilpenicilina G sódica 6-12'000,000 UI/día (EV) dividido en 6 dosis de 7 a 10 días
	Ceftriaxona 1 a 2 g c/12 horas (EV) por 7- 10 días (*)
	Ciprofloxacina 200 mg c/12 horas (EV) de 7 a 10 días
Niños hasta 40 Kg	Ampicilina 50 mg x Kg x día (E.V dividido en cuatro dosis de 7 a 10 días
	Bencilpenicilina G. sódica 100,000 a 200,000 UI/Kg x día (EV) en fracción de 4 a 6 dosis de 7 a 10 días.
	Ceftriaxona 50 a 100 mg/Kg x día (EV) dividido en dos dosis c/12 horas de 7 a 10 días.
	(*)El 10% de pacientes alérgicos a penicilina podrían presentar reacciones alérgicas a las cefalosporinas.
	Bencilpenicilina G sódica 6-12'000,000 UI/día (EV) dividido en 6 dosis de 7 a 10 días
Gestantes	Ampicilina 0.5 – 1 g. c/6 horas (EV) por 7 a 10 días
	Ceftriaxona 1 a 2 g c/12 horas(EV) por 7 a 10 días(*)
	(*) El 10% de pacientes alérgicos a penicilina podrían presentar reacciones alérgicas a las cefalosporinas.

La doxiciclina no tiene problemas de absorción si se administra con las comidas o leche, la tetraciclina en cambio, no debe administrarse con las comidas o leche.²⁹

El manejo de casos moderados a graves debe ser en forma hospitalaria. Todo paciente con diagnóstico presuntivo de leptospirosis debe ser hospitalizado cuando presenta los siguientes síntomas de alarma: fiebre elevada que no cede a antipiréticos (39°C), vómitos persistentes, dolor abdominal intenso que puede llegar al abdomen agudo, ictericia, manifestaciones hemorrágicas (gingivorragia, hemoptisis, melena, petequias generalizadas), dificultad respiratoria, trastornos hemodinámicos (shock), oliguria y signos meníngeos.¹⁷

Los médicos nunca deben esperar los resultados del laboratorio para empezar el tratamiento con antibióticos debido a que las pruebas serológicas no son positivas

hasta cerca de una semana después de la aparición de los síntomas y los cultivos pueden no resultar positivos hasta después de varias semanas.⁸³

7.1 Profilaxis

Para grupos de personas que ingresen a zonas endémicas en forma temporal (personal militar, practicantes de deportes de aventura, brigadistas y otros), se recomienda aplicar, de la siguiente manera:

- ✎ Mayores de 12 años una dosis semanal de 200 mg de doxiciclina por un mes
- ✎ De 8 a 12 años una dosis semanal de 100 mg de doxiciclina por un mes
- ✎ De 8 a 4 años, 250mg cada 8 horas de amoxicilina durante 3 días
- ✎ Menores de 4 años, 125mg cada 8 horas de amoxicilina durante 3 días
- ✎ Embarazadas, 500 mg cada 8 horas de amoxicilina durante 3 días
- ✎ Adultos doxiciclina 200 mg vía oral una vez por semana o amoxicilina 500 mg vía oral una vez por semana.^{17, 53,83}

El tratamiento quimioprofiláctico está recomendado mientras dure la estadía.^{17, 83}

7.2 Quimioprofilaxis

Para grupos de personas que ingresen a zona endémica en forma temporal (personal militar, practicantes de deporte de aventura, brigadistas y otros)

- ❖ Adultos
 - ✓ Doxiciclina 200 mg. V.O una vez por semana por 2 semanas
 - ✓ Amoxicilina 500 mg. V.O una vez por semana
 - ❖ Niños hasta 40 Kg
 - ✓ Amoxicilina 250 mg V.O una vez por semana
- El tratamiento quimioprofiláctico está recomendado mientras dure la estadía.^{30, 34,48}

7.3 Tratamiento de soporte

Las medidas terapéuticas de soporte constituyen aspectos importantes y deben ser iniciadas rápidamente, evitando complicaciones de la enfermedad principalmente las renales.

La hidratación de preferencia endovenosa, es la terapia más importante en las formas graves de la enfermedad, ya que los pacientes presentan deshidratación debido a la fiebre, vómitos, diarrea, anorexia y lesiones vasculares.

En casos graves con oliguria, se debe tener cuidado con la reposición hídrica excesiva, que puede empeorar la insuficiencia respiratoria, pudiendo llegar hasta insuficiencia cardíaca.

Tan pronto el paciente pueda ingerir alimentos, debe instituirse una dieta balanceada, restringiendo la ingesta de proteínas en los casos de uremia.³⁰

Si a pesar de las medidas adoptadas, no mejora la insuficiencia renal se debe indicar precozmente la diálisis peritoneal o derivación a un establecimiento de salud que cuente con unidad de cuidados intensivos (UCI).

En lugares que no se cuente con unidad de cuidados intensivos deberán tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- ❖ La saturación de oxígeno debe mantenerse por encima del 90%, mediante administración por máscara o catéter, la ventilación artificial en los casos que evolucionen con insuficiencia respiratoria aguda o Síndrome de Distress respiratorio del adulto.
- ❖ Las alteraciones cardíacas deben ser tratadas mediante la corrección de las alteraciones metabólicas, como la hipopotasemia y con la ayuda de drogas inotrópicas y antiarrítmicas, cuando este indicado.
- ❖ Después de la reposición de la volemia en los pacientes que evolucionen con hipotensión y oliguria. En los chocados se recomienda la utilización de dopamina a dosis baja (0.5 a 3 microgramos / Kg /min.)
- ❖ La vitamina K debe siempre administrarse por vía endovenosa en los casos de disminución de la actividad de protrombina,
- ❖ Antiácidos exentos de magnesio, antagonistas de H_2 ó inhibidores de la bomba de protones pueden ser utilizados dependiendo de la situación particular de cada paciente.^{30,48}

7.4 Seguimiento de los pacientes con leptospirosis

Se recomienda realizar control clínico en los pacientes diagnosticados como leptospirosis leve, a fin de detectar signos de alarma o complicaciones.

El control serológico se realizará entre los siete y 21 días en relación a la primera muestra.

El paciente que no ha cumplido con el esquema de tratamiento indicado, tendrá mayor riesgo de complicaciones, por lo que se realizará la visita domiciliar necesaria para su seguimiento y recuperación.^{30, 48}

7.5 Secuelas a largo plazo

Las secuelas a largo plazo incluyen fatiga crónica y otros síntomas neuropsiquiátricos tales como dolor de cabeza, parestias, parálisis, cambios de humor y depresión. En algunos casos, pueden ocurrir uveítis e iridociclitis como una presentación tardía de la leptospirosis. Los síntomas oculares pueden ser atribuidos a la persistencia de las leptospiras en los ojos, en donde están protegidas de la respuesta inmune del paciente.

Además del compromiso ocular, se desconocen otros síntomas tardíos o persistentes. La existencia de infecciones persistentes o crónicas no ha sido confirmada y las “cicatrices” causadas durante la fase aguda de la enfermedad no han sido demostradas.³³

7.6 Inmunización en humanos

La inmunización por medio de vacunas parece proveer un cierto grado de protección. Las vacunas son en principio, una suspensión de leptospiras muertas y la protección es principalmente serovar específica. En aquellas áreas donde muchos serovares están causando leptospirosis, la vacuna debe incluir los diferentes serovares que circulan localmente.^{10,33, 108} En algunos países, p.ej. China, en donde muchos serovares circulan, las vacunas consisten de una mezcla de unos pocos serovares de los más prevalentes.³³ Se usan dos inyecciones subcutáneas de 1ml a intervalos de 7

días y luego de 5 años una segunda inyección.⁶Anticuerpos protectores son producidos solamente contra los serovares presentes en la vacuna usada.^{33, 108}

La información sobre vacunas humanas (**Figura 55**) es limitada y están disponibles solo en ciertos países. Se ha reportado que las vacunas proporcionan algún grado de protección y esto es particularmente importante en áreas en donde ocurren las formas más serias de leptospirosis, donde el acceso al servicio médico es limitado o en donde es probable que exista demora para recibir el tratamiento.

Sin embargo, la protección es, relativamente, de corta duración siendo necesario el refuerzo a intervalos regulares para mantener los títulos de anticuerpos protectores. Las vacunas también pueden producir efectos colaterales tales como dolor en el sitio de inoculación y fiebre.^{33,108}

Recientemente se han desarrollado algunas vacunas nuevas, como las de subunidades, y se está evaluando la posibilidad de desarrollar otras en base a los lipopolisacáridos y de algunos antígenos proteicos, como se detalla a continuación.

- ★ Subunidades.- Las vacunas de subunidades tienen menos efectos secundarios que las de células muertas. Por ejemplo, Fort Dodge Animal Health utiliza un novedoso proceso de fabricación que separa los inmunógenos de superficie de los detritos celulares (Birnbau, 1998; Koizumi y Watanabe, 2005).
- ★ Lipopolisacáridos (LPS).- Las variaciones en la composición de carbohidratos de los LPS reflejan una diversidad antigénica en leptospiras patógenas. La inmunidad proporcionada por los LPS como inmunógenos es generalmente específica al serovar y se podrían desarrollar vacunas a partir de estas (Koizumi y Watanabe, 2005).
- ★ Antígenos proteicos: Las proteínas inmunogénicas, especialmente las de la membrana de la superficie externa de las proteínas de la leptospira, pueden ser vacunógenos efectivos. La identificación de las proteínas, que podrían generar una protección cruzada, se ha convertido en el mayor foco de investigación de la leptospirosis, comenzando con el estudio del genoma leptospiral (Koizumi y Watanabe, 2005).⁶



Figura 55. Vacuna trivalente contra la leptospirosis humana (vax-SPIRAL®) desarrollada y producida por el Instituto Finlay (Cuba) Consistente en un preparado de células inactivadas de leptospira, de los tres serogrupos de mayor circulación en el país, absorbidas en un gel de hidróxido de aluminio.¹⁰⁹

CAPÍTULO 8

8 SEGURIDAD

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico serológico y bacteriológico de la leptospirosis debe aplicar las medidas de bioseguridad.⁶⁸

Se deben controlar las medidas necesarias aplicables a:

- ❖ El personal
- ❖ La vestimenta
- ❖ Los ambientes
- ❖ La obtención de muestras
- ❖ El envío de muestras al laboratorio
- ❖ Los casos de accidentes
- ❖ El laboratorio

8.1 Medidas para el control de la enfermedad en el hombre

Fundamentalmente relacionadas con la disminución de la población de roedores como principal fuente de transmisión de la enfermedad, evitar la exposición a fuentes de agua contaminadas y minimizar factores de riesgo para el personal involucrado en la actividad agrícola, minera y laboratorios de diagnóstico (Figura 56).⁸¹

8.2 Medidas de bioseguridad en el laboratorio



Figura 56: Seguridad.⁶⁶

Para trabajar con leptospiras se requieren los procedimientos estándar de un laboratorio microbiológico.⁴⁵

- ✚ Se requieren medidas básicas de Bioseguridad tipo II, con campana de bioseguridad (flujo laminar, luz ultravioleta), microscopio con condensador de campo oscuro, baño de maría, nefelómetro, incubadora a 30°C, refrigerador, congelador a -20°C y a -70°C, lector de placas de ELISA y autoclave.
- ✚ Se recomienda el uso de un área libre de corrientes de aire y con piso, paredes y ventanas lisas y fáciles de lavar y desinfectar.
- ✚ Las leptospiras son susceptibles a la desecación, ácidos, a desinfectantes y antisépticos fenólicos y detergentes, y al calor. Los derrames o salpicaduras en pisos y mesas del laboratorio y pisos de bioterios deben ser desinfectados. Las mesas de trabajo deben tener material absorbente, se deben lavar con hipoclorito de sodio al 6%.
- ✚ Las placas de microtitulación donde se realiza la técnica de MAT deben ser colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante una hora, el

material reutilizable se trata durante 24 horas con benzal, preparado según el fabricante.

- ✚ Los accidentes de laboratorio suponen el mayor peligro para el personal de laboratorio, en especial aquellos que involucran penetración en la piel y cortaduras, junto con salpicaduras en los ojos provenientes de agujas de jeringas usadas para la inoculación de animales.
- ✚ El uso de la boca para pipetear cultivos de *Leptospira* y suero está estrictamente prohibido.
- ✚ Todo el material de vidrio debe tener su seguridad verificada (p.ej. sin bordes cortantes) antes de ser lavados.
- ✚ Portaobjetos y pipetas deben desinfectarse y desecharse. Si es posible, utilizar plástico descartable.
- ✚ El personal de laboratorio que manipula muestras de sangre o suero humano para cultivo o serología también está expuesto al riesgo de otras infecciones (hepatitis viral, VIH, etc.), que pueden ser serias o incluso fatales. Se debe usar guantes cuando se manipulan muestras de suero. Las muestras de suero de pacientes deben ser calentadas a 56°C por 30 minutos para eliminar agentes infecciosos.⁸¹
- ✚ Si ocurre un accidente, por el cual un miembro del personal se infecta o cree estar en riesgo de infección con leptospirosis patógenas, se recomienda comenzar un tratamiento profiláctico con antibióticos. Cuando se manipulan nuevos aislamientos y cepas virulentas, se requiere que todo el personal reporte o notifique cualquier enfermedad febril.
- ✚ Se deben tomar medidas para prevenir el contacto directo de las manos sin protección u otra parte de la piel o ropa con salpicaduras de suero o sangre de derrames o fugas de recipientes.
- ✚ El personal de laboratorio debe tener una muestra de suero de control, congelada, para compararla con otra, si ocurre un accidente de laboratorio o se sospecha de una exposición a la infección.
- ✚ Todo el personal debe estar inmunizado contra hepatitis B. Debe considerarse la inmunización contra leptospirosis, dependiendo del grado de exposición a animales infectados y la disponibilidad de una vacuna apropiada. Otras vacunas contra otras zoonosis, tales como la rabia, deben ser administradas cuando sea necesario.⁴⁵

8.3 Personal de laboratorio

Debe usar bata, guantes, cubre boca y lentes de seguridad (**Figura 57**), estar previamente capacitado, conocer el manejo de los residuos peligrosos biológico infeccioso (RPBI) según la NOM-087- ECOL-SSA1-2002, y conocer el riesgo que implica el manejo de la bacteria. Durante el trabajo evitar la formación de aerosoles y de corrientes de aire por movimientos bruscos. El riesgo principal para el personal de laboratorio son los accidentes causados por cortaduras o salpicaduras en los ojos cuando se inoculan los animales con leptospirosis.



Figura 57. Seguridad en el laboratorio.¹¹⁰

8.4 Medidas de Control

- ★ Notificación de todos los casos a la autoridad correspondiente.
- ★ Aislamiento del paciente y precauciones respecto a la sangre y los líquidos corporales de las personas enfermas. Desinfección concurrente de los artículos contaminados con orina.
- ★ Investigación de todos los casos, contactos y de la probable fuente de infección, investigación de probable exposición a animales infectados y aguas contaminadas⁸¹
- ★ Las vacunas elaboradas para seres humanos no constituyen una opción aceptable en la actualidad. La vacunación de animales de granja y mascotas previene la enfermedad pero no el estado de portador ni la excreción de leptospiras por la orina.⁵⁶

8.5 Medidas Preventivas

- ✓ Educación a la población respecto a los modos de transmisión de la enfermedad.
- ✓ Evitar nadar y vadear en aguas que puedan estar contaminadas. Evitar el contacto con agua fresca, barro y vegetación que probablemente esté contaminada con orina, especialmente cuando la persona tiene erosiones o heridas.
- ✓ Consumo de agua hervida cuando no se disponga de agua potable.
- ✓ Utilizar elementos de protección cuando se realizan actividades recreacionales en aguas potencialmente contaminadas.
- ✓ Proteger por medio de botas, guantes, y delantales a los trabajadores expuestos por su ocupación al riesgo de leptospirosis.
- ✓ Identificar aguas y suelos que puedan estar contaminados. Drenaje de terrenos bajos cuando sea posible.
- ✓ Realizar control de roedores en las viviendas y en las áreas alrededor de las casas y lugares de trabajo. Efectuar construcciones a prueba de roedores.
- ✓ Protección cuando se manipulan animales muertos o cuando se limpian los lugares donde se guardan o juegan los animales.
- ✓ La inmunización de los animales de granja y domésticos evita la enfermedad, pero no necesariamente la infección ni la eliminación de los microorganismos con la orina.
- ✓ La inmunización de las personas con riesgo de exposición ocupacional a serovariedades específicas se ha utilizado en diferentes países.
- ✓ Se ha demostrado que la doxiciclina es eficaz como medida de prevención de leptospirosis en personal expuesto, cuando se administra por vía oral una dosis de 200 mg a la semana durante los períodos de exposición elevada.⁸¹

8.6 Recomendaciones para la vigilancia epidemiológica de leptospirosis

- ❖ La importancia de efectuar vigilancia epidemiológica según la recomendación de la OMS, radica en que:
- ❖ Es una zoonosis de distribución mundial, propia de países de clima subtropical o tropical húmedo.
- ❖ Una gran variedad de animales salvajes y domésticos pueden ser fuentes de infección de esta enfermedad.

- ❖ La Leptospirosis está vinculada a algunas actividades ocupacionales en lugares de clima templado.
- ❖ La enfermedad evoluciona desde una forma leve a letal, dependiendo de la serovariedad de la leptospira.
- ❖ Es una enfermedad que probablemente pasa por alto y se subnotifica en muchos países, debido al diagnóstico clínico difícil y la falta de laboratorios de diagnóstico.⁸
- ❖ La OMS recomienda la notificación inmediata de casos sospechosos o confirmados a nivel periférico (hospitales, laboratorio), debiéndose investigar todos los casos. La vigilancia basada en hospitales permite obtener así información sobre los casos más graves. La serovigilancia indica las variedades prevalentes.
- ❖ La definición de caso recomendada corresponde a enfermedad febril aguda con cefalea, mialgia y postración asociada a: sufusión conjuntival, irritación meníngea, anuria/oliguria/y o proteinuria, ictericia, hemorragias (intestinal, pulmonar), arritmias o insuficiencia cardíaca, erupción cutánea y el antecedente de exposición a animales infectados o a un ambiente contaminado con orina de animales. El criterio recomendado para caso confirmado corresponde a aquel que es confirmado por un laboratorio competente, mediante aislamiento o serología positiva.

La definición de un Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Leptospirosis debe, por lo tanto, tener como base la existencia de un laboratorio de diagnóstico y la capacitación del personal médico, veterinario, epidemiólogos y biólogos que faciliten la detección y estudio de los casos y reservorios.

La vigilancia de esta enfermedad proporciona así la base para establecer las estrategias de intervención en Salud Pública.⁸¹

8.7 Comunicación y Educación para la Salud

Con referencia a educación para la salud el personal de los establecimientos de salud debe informar, orientar y capacitar a la población (**Figura 58**) sobre:

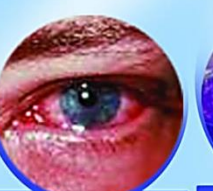
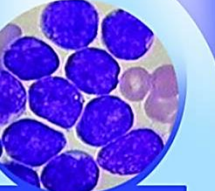
- ⊕ Los procesos que modifiquen el comportamiento de las personas para mejorar su salud, la de su familia y de la comunidad en que vive.
- ⊕ La importancia de la leptospirosis como enfermedad, sus mecanismos de transmisión, los factores de riesgo, la eliminación de reservorios y portadores, así como las medidas de prevención indispensables para evitar su propagación.
- ⊕ Limitar la convivencia estrecha con los animales domésticos y de interés económico, encaminados a reducir la probabilidad de contraer la leptospirosis.
- ⊕ El lavado de manos de todos los miembros de la familia, antes de comer y después del contacto con los animales, sus productos, subproductos o desechos.
- ⊕ La trascendencia de limpiar, desinfectar y aislar con cercas, los lugares destinados u orientados para la crianza del ganado y otros animales.³⁰

LEPTOSPIROSIS

Es una enfermedad que afecta a animales salvajes y domésticos, el hombre se contamina en forma directa a través de la piel excoriada y mucosas al hacer contacto con agua, tierra o vegetación contaminada con orina de animales infectados y de forma indirecta al ingerir agua o alimentos contaminados con orina de animales infectados



Síntomas característicos

				
Fiebre y dolor de cabeza.	Dolor en pantorrillas y muslos.	Náuseas, Vómito, Diarrea y dolor abdominal.	Conjuntivitis.	Leucocitosis

Medidas de prevención

				
Lave con agua y jabón frutas y verduras.	Si no dispone de agua segura para consumo humano, desinfecte con puriagua, solicítelo gratuitamente en la unidad de salud mas cercana	Proteja los alimentos y utensilios de cocina.	Deposite la basura en recipientes con tapadera, no más de 2 días. Si no hay servicio de recolección, entierre la, nunca la queme.	Use mascarilla, delantal y botas, cuando manipule carne u otro tipo de alimentos.

Recuerde

				
Evite el contacto con aguas estancadas.	Chapode alrededor de la vivienda.	Limpie las cisternas adecuadamente.	Si presenta alguno de los síntomas mencionados, visite el establecimiento de salud más cercano. No se automedique.	Si observa nidos o lugares de mayor concentración de ratas, acuda al establecimiento de salud más cercano.

Figura 58. Recomendaciones.⁵⁶

9 REFERENCIAS

1. Fernández R. Leptospirosis, una revisión actualizada. (publicación periódica en línea) 25 de febrero de 2013(citada 2012 Veterinaria Argentina, 29(291)). Se consigue en: URL: http://produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/zoonosis/22-leptospirosis.pdf
2. Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Médica Panamericana; 2007.p.1031-1036.
3. García Portela R. Leptospirosis humana. (publicación periódica en línea) 3 de Abril 2013 (citada Hospital Abel Santamaría, Pinar del Río). Se consigue en: URL: <http://files.sld.cu/boletincnscs/files/2010/11/respub2010-dr-garcia-portela.pdf>
4. Enna ZM y Pizarro R. Leptospirosis: Puesta al día (publicación periódica en línea) 3 de Abril de 2013 (citada Hospital Dr. Lucio Córdova Santiago Chile. rev chil infect 2007; 24 (3): 220-226, versión impresa issn 0716-1018). Se consigue en: URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-10182007000300008&script=sci_arttext
5. Perez Garcia R. Leptospirosis y enfermedad de Weil (publicación periódica en línea) 3 de Abril de 2013(citada lunes, 12 de noviembre de 2012: revisado y actualizado el 15-2-2013).Se consigue en: URL: <http://drrafaelperezemergency.blogspot.mx/2012/11/leptospirosis-y-enfermedad-de-weil.html>
6. Dammert N. Leptospirosis: una revisión bibliográfica. Facultad de Medicina Veterinaria. (publicación periódica en línea) 4 de Abril de 2013(citada 2005 Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Se consigue en : URL: http://www.sapuvetnet.org/antigo/pdf%20files/monografia_leptospira.pdf
7. Botella S. Seguridad y Salud en el trabajo, Fichas Prácticas: Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 4 de Abril de 2013(citada diciembre 2009, N° 55 • Profesoras del máster de Prevención de riesgos laborales de la universidad Politécnica de Valencia). Se consigue en: URL: http://www.insht.es/inshtweb/contenidos/documentacion/textosonline/rev_insht/2009/55/60_fichas_practicas.pdf
8. Secretaria de Salud del Estado de Tabasco: Salud en Tabasco. Leptospirosis: pleomorfismo Clínico en el Síndrome Febril (citada Diciembre, 2002/ vol.8, número 003, México, p.128-132). Se consigue en: URL: core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/5368704
9. Braselli A. Leptospirosis. (publicación periódica en línea). 5 de Abril de 2013.Se consigue en: <http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm>
10. Sociedad Argentina de Infectología. Leptospirosis: publicación de la Comisión de emergentes y enfermedades endémicas. (publicación periódica en línea) 5 de Abril de 2013. (citada 2abril 2012, número 1). Se consigue en: URL: http://www.sadi.org.ar/files/numero%20dos_abril%202012.pdf

11. Gallegos Mesén A. Medicina tropical: Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 6 de Abril de 2013(citada revista Médica de Costa Rica y Centroamérica lxvii (592) 115-121 2010). Se consigue en: URL: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/592/art2.pdf>
12. Velasco Castrejón O. Leptospira ¿simulador o causante de leucemia? (publicación periódica en línea) 7 de Abril de 2013 (citada Rev Cubana med trop v.57 n.1 ciudad de la Habana ene.-abr. 2005). Se consigue en: URL: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0375-07602005000100003&script=sci_arttext
13. Marcano RJ. Medicina Preventiva: Santa Fe. Cuidado con la leptospirosis! (publicación periódica en línea) 3 de Julio 2013(citada junio 30, 2013; Caracas Venezuela). Se consigue en: URL: <http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/leptospirosis.htm>
14. Simposio Internacional de Microbiología Médica. 5ª reunión anual del Departamento de Microbiología. Leptospirosis Humana en México. (publicación periódica en línea) 15 de Abril de 2013(citada 09 de diciembre de 2011). Se consigue en: URL: http://todos.cicese.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=265:simposio-internacional-de-microbiologia-medica-5o-reunion-anual-del-departamento-de-microbiologia&catid=9:breviario
15. Brooks G. Microbiología Médica. 25ª ed. México: McGraw -Hill; 2011. p. 301, 308-310
16. Caino H. Leptospirosis. Facultad de Ciencias Médicas. (publicación periódica en línea) 16 de Abril de 2013(citada 2006 octubre; 1(3): 30).Se consigue en. URL: <http://revista.med.unlp.edu.ar/archivos/200610/4%20curcio%20-%20leptospirosis.pdf>
17. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: Caracterización Fenotípica, Serológica y Molecular de *Leptospira* spp en fuentes de agua de consumo humano en Masagua, Escuintla. (publicación periódica en línea) 16 de Abril de 2013(citada 26 de junio de 2008 Departamento de Microbiología). Se consigue en: URL: http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=aislamiento%20e%20identificaci%c3%b3n%20de%20leptospira%20%20interrogans%20en%20fuentes%20de%20agua%20de%20la%20aldea%20el%20milagro%2c%20masagua&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0ccwqfjaa&url=http%3a%2f%2fbiblioteca.usac.edu.gt%2ftesis%2f06%2f06_2974.pdf&ei=glotuafmi42a2awmvyg4ba&usg=afqjcnfievixc4w99mmtxgfnoa660kella&bvm=bv.42965579,d.b2u
18. Secretaria de Salud. Secretaría de Prevención y Promoción de la Salud: Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 16 de Abril de 2013(citada Septiembre ,2012). Se consigue en: URL: http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/pdfs/vig_epid_manuales/14_2012_manual_leptospirosis_vfinal_21nov12.pdf.
19. Red de revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Primer reporte en Cuba de *Leptospira interrogans* serovar *tarassovi* y caracterización

- clínica epizootológica en focos de leptospirosis porcina. (publicación periódica en línea) 2 de Mayo de 2013. (citada Sistema de información Científica. Issn. 1695-7504. vol. vi, n° 4, abril 2005) Se consigue en: URL: <http://www.redalyc.org/pdf/636/63612647002.pdf>
20. Instituto de Higiene. Del Monte A. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 18 de Abril de 2013. (citada Departamento de bacteriología y virología). Se consigue en: URL: <http://www.higiene.edu.uy/leptos.htm>
 21. Fotos dibujos imágenes. Dibujos de los pulmones: Biología Química.(publicación periódica en línea) 20 de Mayo de 2013 (citada jueves 11 de octubre de 2012).Se consigue en: URL: <http://biologiafotosdibujosimagenes.blogspot.mx/2012/10/dibujos-de-los-pulmones-pulmon.html>
 22. Rodríguez G.M. Estado actual de la leptospirosis. (publicación periódica en línea) 12 de Abril de 2013 (citada MVZ- Córdoba 2000; 5:(1), 61-63)). Se consigue en: URL: <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-51/61.pdf>
 23. Céspedes ZM. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. (publicación periódica en línea) 2 de Mayo de 2013(citada rev. perú. med. exp. Salud pública. oct. /dic 2005, vol.22, no.4 p.290-307). Se consigue en: URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1726-46342005000400008&lng=es&nrm=iso. issn 1726-4634
 24. Carneiro M. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: estudio clínico y epidemiológico. (publicación periódica en línea) 16 de Abril de 2013(citada rev chil infect 2004; 21 (4): 339-344). Se consigue en: URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-10182004000400008&script=sci_arttext
 25. García González R. Leptospirosis; un problema de Salud Pública, departamento de Microbiología y Parasitología; Facultad de medicina .UNAM (citada rev latinoamer patol clin, vol. 60, núm. 1, pp 57-70 • enero - marzo, 2013). Se consigue en: URL <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2013/pt131g.pdf>
 26. Ruiz Solís A. Leptospirosis. (tesis doctoral) Universidad Popular del Estado de Puebla; junio de 1997.
 27. Salud Uninorte Barranquilla. Leptospirosis icterica: síndrome de Weil's. (publicación periódica en línea) 20 de Abril de 2013 (citada 19: 31-40, 2004). Se consigue en: URL: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/artpdfred.jsp?icve=81719004>
 28. Koneman Elemer W. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas color. 5ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.; 2004. p. 945-947
 29. Instituto Nacional de Salud Leptospirosis: Oficina General de Epidemiología. (publicación periódica en línea). 5 de Mayo de 2013 (citada documentos monográficos n°2). Se consigue en: URL: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%c3%b3dulo%20t%c3%a9cnico%20%20leptospirosis.pdf>

30. Ministerio de Salud. Norma Técnica para la Atención Integral de la Leptospirosis humana. (publicación periódica en línea) 30 de junio (citada 24 de julio de 2006). Se consigue en: URL: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/leptopirosis/normat%c3%89cnicaparala%20atenci%c3%93nintegraldelaleptosp irosishumana.pdf>
31. Medina Duque AE. Universidad de San Carlos de Guatemala. Determinación de la presencia de Anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en cerdas de cinco granjas tecnificadas de Guatemala, utilizando la prueba de microaglutinación (MAT). (citada Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Guatemala, febrero de 2008). Se consigue en: URL: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1080.pdf
32. Norma Técnica de Salud para la atención integral de la persona afectada con Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 26 de Abril de 2013(citada mts n° 049-minsa/dgsp-v.01 r.m. 675-2006/minsa. 24 de julio del 2006).Se consigue en : URL: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/archivo/2011/leptospirosis.pdf
33. Organización Panamericana de la Salud. Leptospirosis humana: guía para el Diagnóstico, vigilancia y Control (publicación periódica en línea) 29 de junio de 2013(citada vp/ops/oms, 2008). Se consigue en: URL: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>
34. Ministerio de Salud El Salvador .Lineamientos Técnicos para la atención y control de Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 25 de mayo de 2013 (citada el 3 Noviembre de 2012). Se consigue en: URL: [http://www.fosalud.gob.sv/phocadownload/lineamientos_leptospirosis_18_nov.p df](http://www.fosalud.gob.sv/phocadownload/lineamientos_leptospirosis_18_nov.pdf)
35. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de medicina interna. Hospital General de Castellón. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 2 de junio de 2013 (citada rev med univ navarra/vol. 50, n° 2, 2006, 3-6leptospirosis). Se consigue en: URL: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:i6u9hyx6faqj:www.unav.es/revistamedicina/50_2/articulo%25201-%2520leptospirosis.pdf+rev+med+univ+navarra/vol+50,+n%c2%ba+2,+2006,+3-6+leptospirosis&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx
36. Flores Castro R. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. (publicación periódica en línea) 19 de Mayo de 2013(citad Gaceta Médica de México. 2010;146:423-29).Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2010/gm106j.pdf>
37. Coordinación de Salud Municipal. Imparten pláticas al personal del rastro municipal para que cumplan con las Normas y el Manejo higiénico de la carne. (publicación periódica en línea) 2 de Junio 2013 (citada martes 18 dic 2012). Se consigue en: URL: http://www.opb.gob.mx/opb2011/index.php?option=com_content&view=article&id=1740&catid=46:sala-de-prensa&itemid=181

38. Hernández Rodríguez P. Leptospirosis: una zoonosis que afecta a la salud pública y la Producción pecuaria. (publicación periódica en línea) 25 de Mayo de 2013(citada rev. cienc. anim. Bogotá – Colombia n° 4 pp. 15-23 | 2011 | issn 2011-513x. aprobado: 11 de mayo del 2011). Se consigue en: URL:<http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/ca/article/view/313>
39. Swapan K. Microbiología. Basadas en la resolución de problemas. 1ª ed. España: Elsevier; 2007. p. 345-346.
40. Murray PR. Microbiología Médica .6ª ed. España: Elsevier; 2009. p. 416-419.
41. Vásquez HA. Género *Treponema y Leptospira*. (publicación periódica en línea) 5 de Junio de 2013 .Se consigue en: URL: [http://webzoom.freewebs.com/investigacionvasquez/generotreponema%20y%20leptospira%20micro%202013%20\[modo%20de%20compatibili.pdf](http://webzoom.freewebs.com/investigacionvasquez/generotreponema%20y%20leptospira%20micro%202013%20[modo%20de%20compatibili.pdf).
42. Verdasquera Corcho D. Enfrentamiento a brotes epidémicos de Leptospirosis humana. (publicación periódica en línea) 20 de Junio de 2013(citada rev panam infectol 2011; 13(1):28-35). Se consigue en: URL: http://www.revista-api.com/2011/pdf/01/api_01_11_e.pdf
43. Science daily. Key protein in leptospirosis bacterium identified. (publicación periódica en línea) 28 de Junio de 2013(citada nov. 1, 20079. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/10/071027174533.htm>
44. Cabezas A. Dinámica de Ac antileptospirales en pacientes enfermos de leptospirosis con hemocultivos positivos. (publicación periódica en línea) 2 de julio de 2013. (citada Facultad de ciencias médicas de guinea Ecuatorial. **dirección provincial de salud pública de pinar de río. Cuba).
45. Federación Mexicana de patología Clínica. Leptospirosis humana. historia natural, diagnóstico y tratamiento. (publicación periódica en línea). 21 de Junio de 2013 (citada rev. méx patol clin, octubre - diciembre, 2005. vol. 52, núm. 4, pp 246-256). Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2005/pt054f.pdf>
46. Solano chinchilla A. Leptospirosis en humanos. (publicación periódica en línea) 15 de julio de 2013(citada rev cost. de ciencias médicas. vol 17/n 2, junio de 1996). Se consigue en: URL: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v17n2/art4.pdf>
47. Kumate J. Manual de Infectología clínica. 16ª ed. México: Méndez editores; 2001. p. 535-537.
48. Norma técnica de salud para la atención integral de la persona afectada con Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 26 de Mayo de 2013 (citada nts n° 049-minsa/dgsp-v.01 r.m. 675-2006/minsa. Dirección general de salud de las personas. 1ª edición- 2006) Se consigue en: URL: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/archivo/2011/leptospirosis.pdf

49. Khaldoon´s. Medical pictures. Medical website. Leptospira. (publicación periódica en línea) 5 de Julio (citada sep 2009). Se consigue en: URL: <http://www.drkhaldoon.com/apps/photos/photo?photoid=52574254>
50. García Martos P. Microbiología clínica Aplicada. 3ª ed. España: ediciones Díaz de Santos; 1997. p. 12.
51. Ministerio de Salud Pública. Ministerio de Ganadería, Agricultura y pesca guía de Control y Manejo de Leptospirosis. (publicación periódica en línea). 19 de Mayo de 2013(citada OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.01/02). Se consigue en: URL: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/leptos.pdf>
52. Hugo Álvarez V. Protocolo de vigilancia de Leptospirosis: Vigilancia y control en salud pública.(publicación periódica en línea) 3 de Mayo de 2013 (citada 25 de septiembre 2009) http://www.idesac.gov.co/files/archivos_pdf/leptospirosis%20protocolo.pdf
53. Subdirección de vigilancia y control. Protocolo leptospirosis. Evento de vigilancia: Leptospirosis (publicación periódica en línea) 10 de Abril de 2013 (citada semestre de 200ins-página 1 de 16). Se consigue en: URL: <http://www.minsalud.gov.co/documentos%20y%20publicaciones/protocolo%20de%20leptospirosis.pdf>
54. Diagnósticos de leptospirosis. Standars diagnostics, inc. (publicación periódica en línea).8 de Junio de 2013(citada rev. sc 1004. lef 16sp). Se consigue en: URL: http://www.ctr.com.mx/img_prod/leptospira_f.pdf
55. Bello Pieruccini S. Manual de Leptospira .Instituto Nacional de Salud. (publicación periódica en línea) 26 de Junio de 2013 (citada código: mnl-r01.001.5030-008, 13 julio de 2011). Se consigue en: URL: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examen-es-de-inter%c3%a9s-en-salud-publica/microbiologa/mnlr011%20003%205030-008%20manual%20de%20leptospira%20v%2000%20ok.pdf>
56. Ministerio de Salud. Lineamientos para la Vigilancia y Control de la Leptospirosis en el Salvador. (publicación periódica en línea) 10 de Mayo de 2013 (citada 28 el octubre de 2010). Se consigue en: URL: http://www.who.int/medical_devices/survey_resources/medical_devices_for_emergency_leptospirosis_el_salvador.pdf.
57. Samartino Ernesto L. CONBRAVET Gramado, Rio Grande do Sul Brasil. Epidemiología de la Leptospirosis humana y animal. (publicación periódica en línea). 15 de Junio de 2013. (citada octubre 2008). Se consigue en: URL: http://www.sovergs.com.br/palestras/dr_luis_samartino_%20epidemiologia_de_la_leptospirosis_humana_y_animal.pdf
58. Elizalde Campos A. Identificación de Leptospira en la patogénesis de la uveítis crónica en la Ciudad de México. (publicación periódica en línea) 28 de Mayo de 2013 (citada rev mex oftalmol; julio-agosto 2004; 78(4):165-170). Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexoft/rmo-2004/rmo044b.pdf>
59. Boza. Ricardo Sobre la patogénesis de la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 10 de Julio de 2013 (citada rev. costarric. cienc. méd vol.20 no.1-2 San

- José jun. 1999). Se consigue en: URL:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=s0253-29481999000100011&script=sci_arttext
60. Gamarra R. Leptospirosis. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. (publicación periódica en línea) 10 de Junio de 2013. (citada revisión bibliográfica - 2009). Se consigue en: URL:
http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/gamarra_leptospira.pdf
61. Fernandez. J. Bacteriología. (publicación periódica en línea) 25 de Julio de 2013(citada octubre 2012). Se consigue en: URL: <http://bacteriologiaenenfermeria.blogspot.mx/>
62. Harvey Richard A. Microbiología .2ª ed. España: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.p. 168-169.
63. Bernard D. Tratado de Microbiología con inclusión Inmunológico y Genética molecular. 3ª ed. España: Salvat editores; 1985. p. 619-621.
64. Carrión A D. Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. (publicación periódica en línea) 15 de Abril de 2013(citada revista. rev. perú. med. exp. salud publica v.22 n.4 lima oct. /dic 2005). Se consigue en: URL:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s1726-46342005000400007&script=sci_arttext
65. Mori Álvarez L. *Leptospira sp.* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (publicación periódica en línea) 22 de Junio de 2013 (citada facultad de medicina veterinaria.2009). Se consigue en: URL:
<http://www.docstoc.com/docs/155266561/diapositiva-1---universidad-nacional-mayor-de-san-marcos>
66. Adventur Elisa. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 1 de Julio de 2013 (citada dec 20, 2009 in articles, medical. Se consigue en: URL:
<http://www.ar.co.za/2009/12/leptospirosis/>
67. Alfaro C. Epidemiología y Diagnóstico de la Leptospirosis como fundamentos para el Diseño de estrategias de Control. (publicación periódica en línea) 153 de Mayo de 2013. (citado número 6 septiembre-diciembre 2004 revista digital CENIAP, Maracay, Aragua, Venezuela). Se consigue en: URL:
www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaro_c/arti/alfaro_c.htm
68. Manual de Procedimientos Bacteriológico y Serológico para el Diagnóstico de la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 22 de junio de 2013. Se consigue en: URL: http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1049_ins-nt34.pdf.
69. Programa de zoonosis del CENAVECE. ¿Qué lo orienta a pensar que es Leptospirosis? Secretaría de Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y control de enfermedades. (publicación periódica en línea) 06 de Marzo de 2013. (citada segunda edición. agosto, 2008. secretaria de salud). Se consigue en: URL:
<http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/leptospirosis.pdf>

70. Dr. Álvarez G. Mortalidad por Leptospirosis desde 1999 hasta 2006. (publicación periódica en línea) 20 de Marzo de 2013 (citada Hospital Universitario Arnaldo Milian Castro. Villa Clara. Cuba 3/09/2007, enfermedades infecciosas, Medicina Tropical). Se consigue en: URL: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/653/2/>
71. Hemstree George. Sistemas renal y urinario. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo. Publicación periódica en línea) 21 de Marzo de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.insht.es/inshtweb/contenidos/documentacion/textosonline/enciclopediaoit/tomo1/8.pdf>
72. Shubhangi Kene. foto de archivo - 3d anatomía del riñón. (publicación periódica en línea) 19 de Marzo de 2013. Se consigue en: URL: http://es.123rf.com/photo_14631033_3d-anatomia-del-rinon.html
73. Franciscus A. Introducción sobre el hígado. (publicación periódica en línea) 25 de Junio de 2013 (citada hcsp • versión 4 (sp) • noviembre de 2012. hoja informativa hcsp). Se consigue en: URL: http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/sp_factsheets/el%20h%edgado.pdf
74. De Campbell y Reece. Biología. (publicación periódica en línea) 5 de Junio de 2013 (citada 03 mayo 2008). Se consigue en: URL: <http://www.vi.cl/foro/topic/8200-sistema-digestivo-apuntes/page-2>
75. Tortosa I Moreno A. Sistema Cardiovascular: Anatomía. (publicación periódica en línea) 5 de Mayo de 2013 (citada en Colegio Oficial Infermeri de Barcelona). Se consigue en: URL: <http://www.infermeravirtual.com/files/media/file/100/sistema%20cardiovascular.pdf?1358605522>
76. El corazón humano. Características principales, aspectos y datos generales importantes. (publicación periódica en línea) 5 de mayo de 2013 (citada anatomía - fisiología - propiedades). Se consigue en: URL: <http://quemundo.info/index.php/1-anatomia-humana/85-el-corazon>
77. Santos Milanés H. Anatomía, fisiología y patología Respiratoria. (publicación periódica en línea) 6 de Mayo de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion5/capitulo67/capitulo67.htm>
78. Greenlee J. Archivo de imágenes: Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 6 de Mayo de 2013 (citada crédito: iowa state university, college of veterinary medicine, department of veterinary pathology 2004-2013). Se consigue en: URL: <http://www.cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/disease-images.php?name=leptospirosis&lang=es>
79. Depto. de Anatomía. "Curso de Neuroanatomía". Meninges, sistema ventricular e irrigación encefálica. (publicación periódica en línea) 7 de Mayo de 2013 (citada Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile). Se consigue en: URL: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/departamentos/anatomia/cursoenlinea/download/irriga.pdf>

80. Meninges y Líquido Cerebroespinal. (publicación periódica en línea) 8 de Mayo de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo1/neuro3morfo.html>
81. Departamento de Epidemiología del Ministerio de salud. Leptospirosis. (publicación periódica en línea). 3 de Abril de 2013. Se consigue en: URL: <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/leptospirosis.htm>
82. Resúmenes basados en: Harrison's Principles of Internal Medicines. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 5 de Agosto de 2013 (citada 17th ed. Mc-Graw Hill Medical. enero 16 de 2010). Se consigue en: URL: <http://tomatetumedicina.wordpress.com/tag/litos/>.
83. Organización Panamericana de la Salud .Area de Vigilancia de la Salud y Prevención y Control de Enfermedades Reglamento Sanitario Internacional/alerta y respuesta y enfermedades epidémicas. Leptospirosis - Notas descriptivas. (publicación periódica en línea) 21 de Junio de 2013 (citada 12 de marzo de 2012). Se consigue en: URL: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821&Itemid=39696&lang=es
84. Restrepo A.M. Fundamentos de Medicina: Enfermedades Infecciosas. 6ª. ed. Colombia Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2004. p. 247-250.
85. Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-199 para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de la Leptospirosis en el humano. (publicación periódica en línea). 30 de Mayo de 2013 (citada 18 de octubre de 2000). Se consigue en: URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/029ssa29.html>
86. Marcos Anglada. 21-05-2008 Apropol noticias. santa fe: internan a dos policías con posible contagio de leptospirosis. http://www.apropol.org.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=1298&Itemid=36
87. Huston J .Global Health, Local Knowledge. Leptospirosis outbreak follows flooding in Philippines. (publicación periódica en línea) 28 de Julio de 2013 (citada jan 4, 2012). Se consigue en: URL: <http://diseasedaily.com/leptospirosis-outbreak-follows-flooding-philippines>
88. Cárdenas R. Iquitos en emergencia: inundaciones provocan brote de Leptospirosis, que cobró su tercera víctima mortal. (publicación periódica en línea) 2 de Agosto de 2013 (citada 26 de Abril de 2012). Se consigue en: URL: <http://www.larepublica.pe/26-04-2012/iquitos-en-emergencia-inundaciones-provocan-brote-de-leptospirosis-que-cobro-su-tercera-victima-mort>
89. Céspedes Manuel. Evaluación de la Protección Inmunológica a partir de los Extractos antigénicos de *Leptospira licerasae serovar varillal*. (publicación periódica en línea) 22 de Mayo de 2013 (citada Laboratorio Nacional de zoonosis bacteriana, dirección ejecutiva de enfermedades transmisibles Centro Nacional de Salud Pública). Se consigue en: URL: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/zop/zona_evento_01/presetaci%c3%b3n%20leptospira.pdf

90. Rodríguez Bedoya. Proceso Vigilancia y Control en Salud Pública, Informe del evento Leptospirosis, hasta el séptimo periodo Epidemiológico del año 2013. (publicación periódica en línea) 6 de Agosto de 2013 (citada 2012 – sep – 05). Se consigue en: URL: http://ins.gov.co/lineas-de-accion/subdireccion-vigilancia/informe%20de%20evento%20epidemiologico/leptospirosis%20periodo%20vii%202013.pdf?mobile=1&source=%2flineas-de-accion%2fsubdireccion-vigilancia%2f_layouts%2fmobile%2fview%2easpx%3flist%3db631879e%252dd2b3%252d4cb8%252d835e%252d4377789a6121%26view%3d9e454483%252d4ace%252d4231%252da535%252dcba37147e923%26currentpage%3d1
91. Leptospirosis Epidemiología y Situación Mundial. (publicación periódica en línea) 521 de Febrero de 2013(citada miércoles, 06 de junio de 20012, AMSE Asociación de Médicos de Sanidad Exterior). Se consigue en: URL: http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=184:leptospirosis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&itemid=50
92. Zúñiga Carrasco I. Panorama Epidemiológico de la Leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos 2000-2010. (publicación periódica en línea) 21 de Julio de 2013 (citada enf inf microbiol 2013 33 (2): 71-76). Se consigue en: URL: http://www.amimc.org.mx/revista/2013/33_2/panorama.pdf
93. SINAVE/DGE/salud 2013. Información preliminar: Incluye sólo casos confirmados. Vigilancia Epidemiológica semana 26, 2013. Casos por entidad federativa de enfermedades zoonóticas hasta la semana epidemiológica 25; rabia y fiebre del oeste del Nilo hasta la 26 del 2013. (publicación periódica en línea) 10 de Agosto de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem26/pdf/cua8.pdf>
94. Aguirre L. Dirección de Epidemiología y Análisis estratégico. Leptospirosis en la Salud Pública. (publicación periódica en línea) 10 de Mayo de 2013(citada 16 junio de 2005). Se consigue en: URL: http://redesastre.inia.gob.ve/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=113&itemid=28.
95. López E .Leptospirosis se extiende. (publicación periódica en línea) 30 de Julio de 2013 (citada grupo editorial la Prensa. Managua, 15 de octubre, 2010) Se consigue en: URL: <http://www.laprensa.com.ni/2010/10/15/nacionales/40761-leptospirosis-se-extiende>
96. Instituto de Patobiología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (publicación periódica en línea) 20 de Mayo de 2013 (citada 2002. cnia inta. (c.p.1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina) Se consigue en: URL: <http://cnia.inta.gov.ar/patobiologia/images/lepto2.htm>
97. Bayle Scott .Diagnóstico Microbiológico 12ª ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 2009.p. 539-541.
98. Agudelo Flórez P. Imágenes en Biomedicina. Diagnóstico de Leptospirosis de Muestras de sangre y cultivo por observación en Microscopio de campo oscuro.

- (publicación periódica en línea) 28 de Junio de 2013(citada Biomédica 2008; 28:7-9, Universidad CES, Sabaneta, Antioquia). Se consigue en: URL: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/103/488>
99. Dra. Brihuela. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 13 de Julio de 2013. Laboratorio de Leptospirosis. Instituto de Patobiología. INTA Castela. Se consigue en: URL: http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/lepto/leptovb.htm
100. Velasco C.O. Leptospirosis crónica en México: diagnóstico microscópico y evidencias que respaldan su existencia e importancia. (publicación periódica en línea) 17 de Mayo de 2013 (citada rev mex patol clín, vol. 56, núm. 3, pp 157-167 • julio - septiembre, 2009). Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2009/pt093a.pdf>
101. Velasco C.O. Daño miocárdico grave por Leptospirosis: informe de un caso fatal en México. (publicación periódica en línea) 22 de Julio de 2013(citada marzo de 2009. arch cardiol mex 2009; 79(4):268-273). Se consigue en: URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1405-99402009000400008&script=sci_arttext
102. Cárdenas Marrufo M. Manual de técnicas de Diagnosticas especializadas. Universidad autónoma de Yucatán. (publicación periódica en línea) 01 de Junio de 2013 (citada m-fmed-leip-03, 30 de marzo de 2010). Se consigue en: URL: <http://www.medicina.uady.mx/principal/sgc2011/pdf/formatos/leip/proc3/m-fmed-leip-03.pdf>.
103. Macfaddin Jean f. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica.3ª ed. Buenos Aires, Bogotá: Médica Panamericana; 2004. p. 73,81.
104. Club de informática Médica y telemedicina (universidad de panamá): Prueba de catalasa: distinguir staphylococcus de streptococcus. (publicada en línea) 2 de Mayo de 2013 (citada telmeds.org 21 de aug de 2013). Se consigue en: URL: <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/cocos-gram-positivos-piogenos-de-importancia-medica/prueba-de-catalasa-distinguir-staphylococcus-de-streptococcus/>
105. Rapidtest.com .Diagnostic test kits images :ELISA-picture parasitology antibody kits leptospira-igm kit.Se consigue en: URL: <http://www.rapidtest.com/picture/elisa-picture/parasitology%20antibody%20kits/leptospira-igm+kit.jpg.php>
106. *Leptospira bovina hardjo*. (publicación periódica en línea) 5 de Agosto de 2013 (citada ELISA. 1999-2013 alibaba.com, inc. o afiliados.Reino Unido). Se consigue en: URL: <http://spanish.alibaba.com/product-free/bovine-leptospira-hardjo-elisa-133286433.html>
107. Prueba rápida de Leptorapide para la leptospirosis humana. Tipo: equipos patológicos del análisis.(publicación periódica en línea) 6 de Agosto de 2013 (citada Reino Unido. 2013).Se consigue en:

URL:<http://spanish.alibaba.com/product-free/leptorapide-rapid-test-for-human-leptospirosis-108128169.html>

108. Tamargo B. Protección inducida por nanococleatos derivados de Proteoliposomas de *Leptospira interrogans* serovar *canicola*. (publicación periódica en línea) 10 de Julio de 2013 (citada vaccimonitor 2012; 21(1):3-9). Se consigue en: URL: http://www.researchgate.net/publication/230554276_proteccion_inducida_por_nanococleatos_derivados_de_proteoliposomas_de_leptospira_interrogans_serovar_canicola
109. Menéndez J. Vax-spiral: vacuna cubana contra la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 28 de Julio de 2013 (citada Red Latinoamericana de información científico técnico en vacunas, 08/2013. (Se consigue en: URL: . <http://www.bvv.sld.cu/search/?pg=gv&id=579&t=coolnews>
110. Valverde Jiménez M. Centro nacional de referencia de Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 5 de Agosto de 2013 (citada INCIENSA. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en nutrición y Salud.03/10/2012). Se consigue en: URL: http://www.inciensa.sa.cr/inciensa/centros_referencia/leptospirosis.aspx
111. QFB García del valle A. y QFB. Zamudio Duran M. Manual de biología Médica: 9 semestre. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1998. p. 118 y 150.
112. Cajal R. Centro de Genómica y Proteómica: Unidad de Proteómica. (publicación periódica en línea) 2 de Agosto de 2013 (citada Facultad de farmacia – UCM, Madrid) Se consigue en: URL: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/gyp/proteomica/formularios/platatincion.pdf>

CAPÍTULO 9

10 ANEXOS

10.1 ANEXO A

10.1.1 TOMAS DE MUESTRAS

CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

- ❖ Informar al paciente en forma clara y sencilla, de acuerdo a su grado de instrucción, sobre los procedimientos a realizar.
- ❖ Obtener la muestra empleando la técnica apropiada y teniendo en cuenta el período de la enfermedad y el lugar correcto de muestreo, evitando su contaminación.
- ❖ Obtener suficiente cantidad de muestra para asegurar el aislamiento de la bacteria.
- ❖ Obtener la muestra antes del inicio de la terapia antibacteriana. Si el paciente ya hubiera recibido alguna dosis del antibacteriano, el laboratorio debe ser informado al respecto.
- ❖ Para prevenir riesgos, colocar las muestras en un recipiente secundario apropiado para su transporte al laboratorio.
- ❖ Enviar las muestras al laboratorio para su procesamiento inmediatamente después de haber sido obtenidas.⁶⁸

Toma de muestra de sangre

Procedimiento

- ✎ Identificar el tubo al vacío con el nombre completo o código del paciente de quien se obtendrá la muestra de sangre.
- ✎ Utilizar un tubo al vacío con anticoagulante: EDTA, heparina u oxalato de sodio. No usar citrato de sodio por su acción inhibitoria de desarrollo de algunos serovares de leptospirosis.
- ✎ Extraer 5 mL de sangre venosa y mantener a temperatura ambiente.
- ✎ Remitir la muestra inmediatamente al laboratorio. De no ser posible, se puede mantener la misma por un periodo máximo de 5 días a temperatura ambiente, aunque no es recomendable

NOTA: El proceso de transporte de la muestra de sangre con anticoagulante para el aislamiento de la bacteria no se refrigera, se mantiene a temperatura ambiente.^{68, 83}

Obtención de la muestra de sangre venosa para cultivo directo (en pacientes hospitalizados)

Procedimiento

- ★ Obtener 2-3 mL de sangre venosa con una jeringa de 5 mL (sin anticoagulante).
- ★ Con ayuda de un mechero de alcohol, flamear la boca de los tubos con medio de cultivo.

- ★ Inocular 1 gota (aproximadamente 50 µL) en el primer tubo, 2 gotas en el segundo y 3 gotas en el tercer y cuarto tubo.
- ★ Cerrar las tapas herméticamente y mezclar inclinando los tubos y rotándolos sin agitar.
- ★ Identificar y remitir inmediatamente al laboratorio en posición vertical.

Obtención de la muestra de suero

Procedimiento

- ❖ Identificar los viales con el nombre completo o código del paciente.
- ❖ Utilizando un tubo al vacío o una jeringa, extraer 5 mL de sangre venosa sin anticoagulante.
- ❖ Colocar la muestra en un tubo estéril y dejarlo reposar en plano inclinado por 30 minutos, luego centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
- ❖ Utilizando una pipeta Pasteur estéril, separar el suero y colocar por alícuotas en crioviales, cuidando de no incluir hematíes.
- ❖ Conservar en una refrigeradora o en un congelador de -20°C hasta su transporte al laboratorio donde será procesado.⁶⁸

Obtención de la muestra de orina del chorro medio

☉ Obtención de muestras de orina en mujeres

Materiales:

-  Guantes de látex estériles
-  Cinco o más piezas de gasa estéril de tamaño adecuado, pudiendo ser de 4" x 4".
-  Jabón
-  Agua tibia estéril
-  Frasco estéril de boca ancha con tapa de rosca

Procedimiento

- ◆ Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha y hora de obtención de la muestra.
- ◆ Lavarse las manos con jabón y abundante agua.
- ◆ Preparar una pieza de gasa para la limpieza de los genitales externos humedeciéndola con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- ◆ Separar los labios mayores con dos dedos de una mano y limpiar el área expuesta pasando de adelante hacia atrás.
- ◆ Descartar la gasa
- ◆ Con otra gasa humedecida, enjuagar el área de adelante hacia atrás. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- ◆ Finalmente secar el área de adelante hacia atrás con un trozo de gasa seca
- ◆ Mantener separados los labios mayores mientras la paciente empieza a orinar. Luego del chorro inicial, colocar el frasco estéril para colectar el chorro medio.
- ◆ Al terminar de orinar, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.

- ◆ Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio.⁶⁸

🕒 **Obtención de muestra de orina en varones**

Material

- ◆ Guantes de látex
- ◆ Cinco o más piezas de gasa estéril
- ◆ Jabón
- ◆ Agua tibia estéril
- ◆ Frasco estéril de boca ancha

Procedimiento

- ★ Rotular el frasco con el nombre del paciente, fecha y hora de obtención de la muestra y el procedimiento a utilizar para su obtención.
- ★ Lavarse las manos con jabón y abundante agua.
- ★ Preparar una pieza de gasa con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- ★ Realizar la higiene de los genitales, retraer el prepucio antes de lavar el glande con la gasa humedecida con jabón y descartar la gasa.
- ★ Enjuagar el glande, usando una gasa húmeda. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- ★ Secar la zona, usando uno o más piezas de gasa seca.
- ★ Indicar al paciente que mantenga el prepucio retirado e inicie la micción directamente en un recipiente (orina para descartar).
- ★ Después del chorro inicial, colocar el frasco estéril para coleccionar la muestra del chorro medio.
- ★ Obtenida la muestra, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.
- ★ Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio.

Muestra LCR

Material

- ◆ Algodón
- ◆ Gasa estéril
- ◆ Tubo o frasco con tapa rosca estéril
- ◆ Guantes de látex estériles
- ◆ Jeringas estériles de 5 mL

Procedimiento

- ⌚ Limpiar la piel con alcohol 70% alrededor de la punción en la columna lumbar.
- ⌚ Poner al paciente en posición fetal y realizar la punción lumbar con una aguja N° 20 especial y extraer aproximadamente 5 mL de LCR en forma aséptica.
- ⌚ Con un mechero Bunsen, flamear la tapa del frasco o tubo y luego trasvasar el LCR de la jeringa.
- ⌚ Rotular y transportar la muestra inmediatamente al laboratorio.⁶⁸

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE TEJIDO PARA CULTIVO

Materiales

- ★ Guantes de látex
- ★ Cinco o más piezas de gasa estéril
- ★ Jabón
- ★ Agua tibia estéril
- ★ Frasco estéril de boca ancha

Procedimiento

- ✓ Rotular el frasco con el nombre del paciente y la fecha de obtención de la muestra
- ✓ Una vez realizada la autopsia en forma estéril, cortar con un bisturí una pequeña porción de hígado, cerebro y riñón y traspasarlo en un frasco de boca ancha
- ✓ Obtenida la muestra, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo
- ✓ Transportar el frasco con la muestra hacia el laboratorio.⁶⁸

Estos deben enviarse en frascos estériles, sin adición de sustancias químicas y en condiciones de refrigeración; no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio, en caso contrario, pueden congelarse y enviarse con hielo seco o en nitrógeno líquido al laboratorio, mediante lo cual se evita su descomposición durante su transportación cuando ésta sobrepasa las 24 horas.⁸⁵

ENVÍO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Describir los procedimientos y condiciones para la conservación y transporte de las muestras al laboratorio.

PROCEDIMIENTO

- ✎ Para transportar las muestras al laboratorio deben colocarse en un envase secundario, de material resistente a roturas o filtraciones.
- ✎ Todas las muestras son enviadas al laboratorio lo más pronto posible
- ✎ En caso sea necesario transferir las muestras a otros laboratorios. Los responsables de su envío elegirán el sistema de embalaje apropiado para la conservación de las muestras durante el tiempo que demanda el transporte hasta llegar al laboratorio.⁶⁸

CONDICIONES ESPECÍFICAS

Las muestras deben ser mantenidas y conservadas con sus características lo más cercanas a su estado originario, debiendo evitarse temperaturas extremas, pH extremos o desecamientos excesivos.

10.2 ANEXO B

10.2.1 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es cualquier sustancia que puede ser usada para el cultivo de microorganismos, puede ser llamada un medio o, dicho con mayor precisión un medio de cultivo.

FORMAS DE LOS MEDIOS

Los medios líquidos pueden ser transformados en semisólidos o sólidos mediante el agregado de agar.

☉ Forma líquida

Los medios líquidos son esenciales para el aislamiento de leptospiras y para cultivos que van a ser usados como antígenos en pruebas de aglutinación. Las partículas de agar, presentes en el medio semisólido, interfieren con la interpretación de estas pruebas.

El desarrollo de las leptospiras en el medio líquido, se evidencia por la turbidez, aunque algunas veces lo sea por una apariencia granular en el fondo de los tubos en los cuales están creciendo; ambos pueden verse a simple vista pero debe confirmarse por la observación en el microscopio.

☉ Forma semisólida

Los medios semisólidos contienen 0,1 - 0,5% de agar (p/v). Tales medios son de preferencia para el aislamiento de varias cepas y para el mantenimiento a mediano plazo (hasta varios años). El crecimiento se inicia fácilmente en estos medios y, usualmente, es más fácil su visualización en forma de uno o más anillos densos de crecimiento, varios milímetros debajo de la superficie del medio. La ausencia de anillos, sin embargo, no necesariamente significa ausencia de leptospiras. Medios semisólidos en tubos con tapa de rosca son usados, por lo general, para el mantenimiento de cultivos de reserva, que son conservados a temperatura ambiente y, preferiblemente, son transferidos cada tres meses a medios frescos.

☉ Forma sólida

Los medios sólidos contienen 0,8 - 1,3% de agar (p/v) y son dispuestos en tubos o en placas. Cuanto más baja sea la concentración de agar, mayor será la tendencia de las leptospiras a ocupar toda la placa y crecer a través de todo el medio; con una concentración alta de agar, las colonias son más pequeñas. El crecimiento ocurre bajo la superficie. Las placas deben ser selladas para crear una cámara húmeda y prevenir así la deshidratación. Este método puede usarse para el aislamiento de cepas a partir de materiales naturalmente contaminados o cultivos contaminados, o para clonar leptospiras de cultivos mixtos de *Leptospira*. En 1% de agar las colonias crecen bajo la superficie y son visibles después de 7 a 14 días para la mayoría de los serovares. La morfología de la colonia de una cepa móvil cambia con el tiempo.

La morfología de las colonias bajo la superficie no se ha demostrado una característica útil para diferenciar entre las distintas cepas de *Leptospira*.

33,55

1) PREPARACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO DE EMJH (ELLINGHAUSEN AND McCULLOUGH, MODIFICADO POR JOHNSON Y HARRIS).

Este medio se prepara mezclando un volumen de suplemento de ácidos grasos y albúmina (SAGA) y nueve volúmenes de medio basal.

Es esencial usar agua destilada estéril (autoclavada) para el SAGA, AFAS, porque éste solo puede ser esterilizado por filtración y las *Leptospiras*, incluyendo las saprofitas contaminantes pueden pasar a través del filtro.

Requerimientos

Material de vidrio estéril: Frascos de 5 litros (x5); frascos de 3 litros (x1); cilindro de medición de 2 litros (x1); cilindro de medición de 1 litro (x1); pipetas Pasteur.

Reactivos químicos: Na₂HPO₄, p.ej. Merck 1.06586.0500; KH₂PO₄, p.ej. Merck 1.04873.1000; NaCl, p.ej., Merck 1.06404.1000; NH₄Cl, p.ej. Merck 1.01145.0500; Vitamina B1 (tiamina), p.ej. Merck 1.08181.0025; glicerol, p.ej. Merck 1.04093.1000; seroalbúmina bovina fracción V, p.ej. Sigma A9647; CaCl₂·2H₂O, p.ej. Merck 1.02382.0500; MgCl₂·6H₂O, p.ej., Merck 1.05833.0250; FeSO₄·7H₂O, p.ej. Merck 1.03965.0100; CuSO₄·5H₂O, p.ej. Merck 1.02790.0250; ZnSO₄·7H₂O, p.ej. Merck 1.08883.0100; Vitamina B 12(cianocobalamina), p.ej., Merck 5.24950.0010; Tween 80, p.ej. Merck 8.22187.0500; Piruvato de sodio, p.ej. Merck 1.06619.0050.

Soluciones madre (stock): Estas soluciones se muestran en las Cuadros A16.1 y A16.2. Las cantidades dadas son para 20 litros de medio EMJH.^{33, 55}

Cuadro A16.1 Soluciones madre de suplemento de albúmina-ácidos grasos.

Reactivos	Cantidades (g) ml de agua estéril	po100	Volumen	Temperatura de almacenamiento
CaCl₂·2H₂O	+	1,0 (cada uno)	30 ml	-20°C
MgCl₂·6H₂O				
	0,4		20 ml	- 20 °C
ZnSO₄·7H₂O	0,3		2ml	+4 °C
CuSO₄·5H₂O				
Vitamina B 12	0,02		20 ml	- 20 °C
	10,0		250 ml	-20 °C
Tween 80	10,0		20 ml	-20 °C
Glicerol				

Tabla A16.2. Soluciones madre de medio base

Reactivos	Cantidades (g) ml de agua estéril	po100	Volumen	Temperatura de almacenamiento
				-20°C
NH₄Cl	25.0		20 ml	

Vitamina B1 (tiamina)	0,5	20 ml	- 20 °C
------------------------------	-----	-------	---------

Método

Suplemento de ácidos grasos y albúmina (2 litros)

Se prepara como sigue:

- ❖ Disolver 200 g de seroalbúmina bovina (BSA) en 1200 ml de agua destilada estéril, agitando suavemente con una barra magnética (evitando hacer espuma). Puede llevar varias horas disolver la albúmina dependiendo del lote de BSA.
- ❖ Retirar todas las soluciones madre fuera del congelador.
- ❖ Agregar 30 ml de la solución madre de cloruro de calcio/cloruro de magnesio; 20 ml de solución madre de sulfato de zinc; 2 ml de la solución madre de sulfato de cobre; 1 g de sulfato ferroso; 0,8 g de piruvato de sodio; 20 ml de solución madre de vitamina B 12; 20 ml de la solución madre de glicerol; 250 ml de la solución madre de Tween 80.
- ❖ Agregar agua destilada estéril hasta 2 litros.
- ❖ Ajustar el pH a 7,4 - 7,6 con 1N de NaOH usando papel de pH de rango corto o un potenciómetro. (Tenga cuidado de lavar el electrodo del potenciómetro solamente con agua)

2) Medio de Korthof

Reactivos

- ◆ Bactopeptona 0.8 gr
- ◆ NaCl 1.4 gr
- ◆ Na₂HCO₃ 0.02 gr
- ◆ KCl 0.04 gr
- ◆ CaCl₂ (hidratado) 0.04 gr
- ◆ Na₂HPO₄ 2H₂O 0.88 gr

Elaboración

1. Disolver todos los reactivos en un litro de agua destilada.
2. Calentar a ebullición durante 20 minutos.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Meter el medio en refrigeración durante un día.
5. Filtrar con papel Whatman N° 1.
6. Poner 9 ml del medio filtrado en tubos con tapa de rosca.
7. Esterilizar en autoclave a 15 libras durante 15 minutos.
8. Adicionar cada tubo con 1 ml de suero de conejo descomplementado a 56°C.
9. Para preparar el medio semisólido se agrega al medio base 0.1 o 0.2 % de agar y se realiza todo lo anteriormente indicado. ¹⁰²

3) Buffer de Fosfatos pH 7.2 (PBS)

Reactivos

- NaCl 9gr.
- KH₂PO₄ 0.144gr
- Na₂HPO₄ 0.430gr

Elaboración

Se disuelven los reactivos en un litro de agua destilada, procurando que la solución tenga un pH de 7.2¹⁰²

4) Determinación de Proteínas por el Método de Bradford

Reactivos

-  Azul de Comassie 5mg
-  Etanol al 96 % 2.5mL
-  Ácido ortofosfórico al 85% 5 mL

Elaboración

1. Disolver 5 mg de azul de Comassie en 2.5 ml de Etanol al 96%
2. Añadir 5 mL de Ác. Ortofosfórico al 85%
3. Diluir hasta 50 ml con H₂O destilada
4. Dejar reposar 24 h en oscuridad y filtrar dos veces con papel de filtro o con filtros de 45nm. ¹⁰²
5. Conservar en botella oscura no más de 15 días.

Patrón de BSA (albumina Sérica Bovina), 100 µg/ml en H₂O

Intervalo de medida 1 (0,1-1,4 mg/ml)							
Soluciones patrón (mg/ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
Solución primaria de Proteínas I (ml) (10mg/ml)	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40
Agua bidestilada (ml)	9.80	9.60	9.40	9.20	9.00	8.80	8.60
Leer absorbancia a 595 nm							

5) Buffer de carbonatos pH 9.6

Reactivos

- ❖ Na₂CO₃ 0.795g
- ❖ NaHCO₃ 1.465g
- ❖ NaN₃ 0.2g

Elaboración

Se disuelven los reactivos en un litro de agua destilada, procurando que la solución tenga un pH de 9.6.38

6) PBS- Tween (0.05%)

Reactivo

-  Tween 20 150µl

Elaboración

1. Se disuelve los reactivos en 300 ml de PBS.38Destilada estéril (autoclavada) para evitar una posible contaminación con leptospirosis saprofitas del agua).
2. Medio basal (20 litros)
3. Disolver 20 g de Na₂HPO₄ ; 6 g de KH₂HPO₄ , 20 g NaCl en 2 litros de agua destilada (Use un frasco de 5 litros)
4. Agregar 20 ml de solución madre de cloruro de amonio (NH₄Cl) y 20 ml de solución madre de vitamina B1 (tiamina).
5. Agregar agua destilada para un volumen total de 4 litros
6. Transferir 1 litro a cada uno de los 4 frascos de 5 litros
7. Agregar 4 litros de agua destilada a cada uno de los cuatro frascos.

8. Ajustar el pH a 7,4 con 1N NaOH en el anterior.
9. Autoclavar por 30 minutos a 121 °C.

7) Medio completo

Consiste en 18 litros de medio basal y 2 litros de suplemento de albúmina ácido graso (AFAS), dando un total de 20 litros.

Filtración: Se usa un filtro Millipore o Seitz (0,22µm). Por ejemplo, se puede usar un soporte de filtro tipo

316 de Millipore, diámetro 142 mm, en combinación con un vaso regulador de presión de 20 litros.

Coloque un filtro Millipore de 0,22 µm tipo GSWP 14200 (la parte brillante del filtro hacia arriba) seguido por una gasa tipo AP 3212400 y un filtro Millipore de 0,45 µm tipo HAWP 14200 en la base del soporte.

Dos prefiltros de fibra de vidrio se colocan arriba de este filtro. Todos los filtros se empapan con agua destilada y el sistema de filtro se esteriliza por autoclavado. La elección final de los filtros dependerá del medio y de la cantidad a ser filtrada.

Enriquecimiento: Agregar, asépticamente, suero de conejo y/o suero fetal bovino al medio de EMJH para obtener una concentración final de 1 - 4% (v/v).

8) Medio selectivo: Agregue 5-fluorouracil asépticamente al medio EMJH para una concentración final de 0,01 - 0,04%

Control de calidad

Se lleva a cabo como sigue:

- ★ Revisar la ausencia de leptospiras saprofitas y otros contaminantes. El medio se deja por una semana a 30 °C, una semana a 37 °C y dos semanas a temperatura ambiente. Si el medio se pone turbio, revisar microscópicamente y descartarlo si se encuentra contaminado.
- ★ Control positivo: Inocular una alícuota de medio a 1:10 v/v con cultivo de *Leptospira*, incubar y revisar crecimiento después de una semana.¹⁰⁸
- ★ Si se agrega suero de conejo o suero fetal bovino para enriquecer el medio, éstos deben ser revisados por MAT para detectar anticuerpos contra leptospiras. Los sueros deben resultar negativos.

9) PREPARACIÓN DEL MEDIO FLETCHER

Este es un medio semisólido, apropiado para cultivar *Leptospira* y mantenerlas viables por un período largo de tiempo sin subcultivar. Este medio se prepara agregando suero de conejo al medio base de Fletcher.

Requerimientos

Reactivos químicos: Se requiere lo siguiente: Na₂HPO₄, p.ej. Merck 1.06586.0500; KH₂PO₄, p.ej. Merck 1.04873.1000; NaCl, p.ej. Merck 1.06404.1000; Bacto Peptona, p.ej. Difco 0118; Extracto de carne, p.ej. Difco 0126; Agar Noble, p.ej. Difco 0142.

Solución madre: Se requieren dos soluciones madre, a saber: (1) solución de fosfato A: disolver 11.876 g de Na₂HPO₄, en 1 litro de agua destilada; y (2) solución de fosfato B: disolver 9.078 g de KH₂PO₄ en 1 litro de agua destilada. Las dos

soluciones tampón se autoclavan por 30 minutos a 121 °C y pueden ser almacenadas a 4 °C por varios meses.

Suero de conejo: Este debe ser revisado con la MAT para la presencia de anticuerpos antileptospiras. El resultado de la MAT debe ser negativo.

Método

Medio base de Fletcher

Se prepara como sigue:

- Disolver los siguientes reactivos en 820 ml de agua destilada: 0,3 g de Bacto Peptona; 0,5 g de NaCl; 0,2 g de Extracto de carne; 1,5 g de Agar Noble.
- Agregar 80,8 ml de solución madre de solución de fosfato A y 19,2 ml de solución madre de solución de fosfato B.
- Mezclar minuciosamente.
- Ajustar a pH 7,6 - 8,0 usando 1N NaOH.
- Autoclavar
- Después de autoclavar, pero antes que el medio se enfríe, agitar vigorosamente la botella. Es necesario prevenir que el agar se asiente en el fondo de la botella.
- Guardar a 4°C o fraccionar en tubos cuando aún está a 50°C.

Preparación del medio final

El procedimiento es como sigue:

- Recoger el suero de conejo preferiblemente con muy pocos glóbulos rojos. Alternativamente, se puede usar suero de conejo comercial, sin células sanguíneas lisadas.¹⁰⁸
- Inactivar el suero por 30 minutos a 56 °C en baño María
- Cuando el medio base de Fletcher ha sido guardado a 4°C, calentar a 50 °C.
- Agregar 80 ml de suero de conejo a 920 ml de medio
- Fraccionar el medio de Fletcher en tubos en volúmenes de 4-5 ml.
- Guardar el medio a 4 °C hasta usarlo.

Control de calidad: Incube una alícuota de medio Fletcher con un cultivo de Leptospira y revise el crecimiento después de una semana de incubación a 30 °C.

10) PREPARACIÓN DEL MEDIO DE KORTHOF-BABUDIERI

Este es un medio líquido apropiado para el cultivo de Leptospira. Su formulación es una modificación del medio original de Korthof. Se prepara agregando suero de conejo al medio basal de Korthof-Babudieri, siendo utilizado en el Centro Nacional de Leptospirosis en Roma para mantener la colección de las cepas de Leptospira. Su formulación requiere Peptona Proteose No. 3- Difco (en lugar de Peptona Witte) y vitamina B3 (nicotinamida) en lugar de vitamina B1, pero no requiere CaCl₂.

Es esencial usar agua destilada estéril (autoclavada), porque la preparación final puede sólo ser filtrada y las leptospiras, incluyendo las saprofitas contaminantes, pueden pasar a través del filtro.³³

Requerimientos

Se requiere lo siguiente:

Material:

Frascos de 3 litros (x2); frasco de 250 ml (x1); probeta de medición de 1 litro (x1); probeta de medición de 100 ml (x1); embudo (x1); pipetas de 5 ml; pipetas de 1 ml; tubos; filtros Millipore (0,22 μ m); papeles de filtro (Whatman No.1 o equivalente); balanza analítica; centrífuga; incubadora (30°C), baño María; pH metro.

El electrodo del pH debe ser enjuagado con agua destilada estéril (autoclavada) para evitar posibles contaminaciones con leptospiras saprofitas.

Reactivos: Peptona Proteasa No. 3, Difco; NaCl; NaHCO₃; KCl; KH₂PO₄; Na²HPO₄; Na²HPO₄.2H₂O

Vitamina B3 (nicotinamida); suero de conejo; células de sangre lisadas; vitamina B12 (cianocobalamina).

11) Medio basal de Korthof

Se prepara como sigue:

- ★ Disolver los siguientes componentes en 900 ml de agua destilada estéril (use un frasco de 3 litros):
 - 0,80 g peptona proteasa No. 3 (Difco); 1,40 g NaCl; 0,02 g NaHCO₃ ; 0,04 g KCl; 0,18 g KH₂ PO₄; 0,96 g Na₂ HPO₄ 4.2H₂O; 0.001 g de vitamina B3 (nicotinamida).
- ★ Mezclar lo anterior y agregar agua destilada estéril hasta 1 litro.
- ★ Autoclavar por 20 minutos a 121 °C.
- ★ Enfriar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- ★ Pasar por papel de filtro (Whatman No.1 o su equivalente).
- ★ Verificar el pH (el pH final del medio debe estar en el rango de 7,2 – 7,4).
- ★ Autoclavar por 30 minutos a 116 °C.

Suero de conejo

- ◆ Recoger el suero de conejo (puede usar suero comercial de conejo). Debido a que puede existir variación de un animal a otro, se recomienda usar una mezcla de sueros de conejos (obtenidos de animales con una dieta libre de antibióticos).
- ◆ Revisar por MAT la presencia de anticuerpos contra leptospiras. Los resultados de la MAT deben ser negativos.
- ◆ Inactivar el suero por 120 minutos a 56 °C en baño María.
- ◆ Centrifugar a alta velocidad (22 000 g por 30 minutos) para remover residuos celulares.
- ◆ Esterilizar el sobrenadante por filtración usando un filtro Millipore de 0,22 μ m.
- ◆ Fraccionar el suero de conejo en volúmenes de 30 ml en tubos; guarde a -70 °C hasta su uso.

Células sanguíneas lisadas

- ✚ Recoger 5 ml de sangre de conejo (de un animal seronegativo y libre de dietas con antibióticos) en un frasco de 250 ml conteniendo esferas de vidrio.
- ✚ Mezclar agitando suavemente por 10 - 15 minutos para remover la fibrina.
- ✚ Agregar 10 ml de agua destilada estéril, mezclar y dejar toda la noche a 4 °C.
- ✚ Centrifugar a alta velocidad (22 000 g por 30 minutos) para remover residuos celulares.

- + Esterilizar el sobrenadante por filtración usando un filtro Millipore de 0,22 μm .
- + Reparta el sobrenadante en volúmenes de 2 ml en tubos; guarde a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.³³

Vitamina B12

- Disolver 100 mg de vitamina B 12 en 10 ml de agua destilada pH 4,5 (usar agua destilada estéril y ajustar su pH a 4,5 con 1N HCl).
- Esterilizar por filtración con un filtro Millipore de 0,22 μm .

Preparación del medio final

- ☉ Agregar al medio basa de Korthof lo siguiente: 60 ml de suero de conejo estéril e inactivado por calor; 2 ml de células sanguíneas lisadas estériles e inactivadas por calor; 0,1 ml de solución madre de B12 estéril.
- ☉ Esterilizar por filtración con un filtro Millipore de 0,22 μm .
- ☉ Repartir el medio Korthof en volúmenes de 4-5 ml en tubos.
- ☉ Tindalizar por tres veces de 60 minutos a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ☉ Almacene el medio a 4°C hasta su uso.

Control de calidad

- ◆ Verificar la ausencia de leptospiras saprofitas. El medio se deja 1 semana a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 2 semanas a temperatura ambiente. Si el medio muestra turbidez, revise microscópicamente y, si se encuentra contaminación, se debe desechar.
- ◆ Control positivo: inocular e incubar ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) una alícuota de medio Korthof 1:10 con un cultivo de *Leptospira* y revisar el crecimiento después de una semana.³³

10.3 ANEXO C

10.3.1 SIEMBRA DE LAS MUESTRAS

MUESTRA DE SANGRE (HEMOCULTIVO)

Materiales y equipos

- ✓ Cabina flujo laminar
- ✓ Estufa de 28°C -30°C
- ✓ Mechero Bunsen
- ✓ Propipeta o pipeteador automático
- ✓ Microscopio de campo oscuro
- ✓ Pipeta Pasteur
- ✓ Jeringas descartables
- ✓ Láminas porta-objetos
- ✓ Laminillas cubre-objetos
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Contenedor de material contaminado
- ✓ Medios de cultivo:
 - a. Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b. Tubo con medio EMJH

Procedimiento

- ★ Mantener la muestra a temperatura ambiente durante el transporte hasta su procesamiento, por un período máximo de 5 días después de su obtención.
- ★ Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca de un mechero Bunsen.
- ★ Los medios deben mantenerse a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar los cultivos. Los tubos deberán rotularse con el nombre o código del paciente y la fecha. Se emplearán 4 ó 6 tubos por paciente.
- ★ Tomar el tubo que contiene la sangre con anticoagulante, sacar el tapón y flamear la boca con el mechero Bunsen.
- ★ Tomar aproximadamente 1 mL de muestra de sangre con una pipeta pasteur estéril ayudado por una propipeta, luego volver a tapar el tubo que contiene la muestra.
- ★ Abrir la tapa del tubo que contiene el medio y flamear la boca, inocular 1 o 2 gotas de sangre en la parte central del medio, volver a flamear la boca, tapar el tubo y colocarlos en una gradilla sin agitar.
- ★ Realizar el mismo procedimiento para los otros tubos con medio.
- ★ Concluida la siembra y colocados los tubos sembrados en una gradilla, incubar los tubos con medio EMJH o Fletcher a 28°C- 30°C, en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas.
- ★ Registrar en el protocolo las fechas de siembra y las observaciones subsiguientes.⁶⁸

Lectura

- 📌 Trabajar en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero de Bunsen.
- 📌 Controlar los cultivos cada 5-7 días, transfiriendo 1-2 gotas del cultivo sobre una lámina porta-objeto, limpia y sin ralladuras, cubrir con una

laminilla y observar al microscopio de campo oscuro con objetivo de 40X. Observar por lo menos 5 preparaciones de cada cultivo.⁶⁸

- Si se observa la presencia de leptospiras, microorganismos muy móviles, tanto en el medio líquido o semisólido, realizar el subcultivo en 2 tubos con nuevo medio para la conservación de la cepa e identificación posterior.
- Incubar los cultivos originales y los subcultivos por 7 días a 28°C- 30°C
- Si los hemocultivos son negativos, seguir incubando y controlando cada 7 días hasta 4-8 semanas antes de descartar como negativa la muestra. Si el volumen inicial es pequeño, se puede agregar nuevo medio de cultivo.

Interpretación

- La presencia de leptospiras indica la positividad del caso.
- Generalmente, el aislamiento de otras bacterias indica que la muestra se contaminó durante el procedimiento de toma de muestra o siembra en los medios.
- El no aislamiento de leptospiras posterior a las ocho semanas de realizado la siembra, nos puede indicar que el paciente no estuvo con leptospirosis o la muestra se tomó en un período no adecuado posterior a la leptospiremia.
- El crecimiento de leptospiras en un medio semisólido, es usualmente característico por la aparición de un disco visible que se forma por debajo de 1-3 cm de la superficie, el cual contiene una gran cantidad de leptospiras. Sin embargo, la ausencia del disco no indica necesariamente la ausencia de leptospiras

SIEMBRA DE LA MUESTRA DE LÍQUIDO CEFALORAQUÍDEO

Materiales y equipos

- ◆ Cabina flujo laminar
- ◆ Estufa de 28°C – 30°C
- ◆ Mechero Bunsen
- ◆ Propipeta o pipeteador automático
- ◆ Microscopio de campo oscuro
- ◆ Pipeta Pasteur
- ◆ Jeringas descartables
- ◆ Láminas porta objetos
- ◆ Laminillas cubre objetos
- ◆ Guantes de látex
- ◆ Contenedor de material contaminado
- ◆ Medios de cultivo
 - a) Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b) Tubo con medio EMJH

Procedimiento

- Mantener la muestra a temperatura ambiente durante el transporte hasta su procesamiento por un período máximo de 4 días después de tomada la muestra.
- Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca de un mechero Bunsen.

- Mantener los medios a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar los cultivos.
- Rotular los tubos con el nombre o código del paciente y la fecha. Se emplearán 4 ó 6 tubos por paciente.
- Tomar el frasco que contiene la muestra de LCR, abrir la tapa del frasco y flamear la boca con el mechero Bunsen.
- Tomar la muestra con una pipeta de 5 mL estéril ayudado por un pipeteador automático aproximadamente 3 mL, luego tapar el frasco con la muestra.
- Abrir la tapa del tubo que contiene el medio y flamear la boca, luego inocular en el tubo con medio 0,5mL de LCR, cerrar el tubo y colocarlo sin agitar en una gradilla.
- Realizar el mismo procedimiento para los otros tubos con medio
- Incubar a 28°C -30°C en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas.

SIEMBRA DE LA MUESTRA DE ORINA

Materiales y equipos

- ◆ Cabina flujo laminar
- ◆ Estufa de 28°C – 30°C
- ◆ Centrífuga
- ◆ Mechero Bunsen
- ◆ Propipeta o pipeteador automático
- ◆ Microscopio de campo oscuro
- ◆ Pipeta pasteur
- ◆ Jeringas descartables
- ◆ Láminas porta-objetos
- ◆ Laminillas cubre-objetos
- ◆ Guantes de látex
- ◆ Contenedor de material contaminado
- ◆ Medios de cultivo:
 - a) Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b) Tubo con medio EMJH

Procedimiento

- ⊕ Mantener la muestra a temperatura ambiente durante su transporte hasta su procesamiento por un periodo máximo de 2 horas después de tomada la muestra o refrigerado a 4 de 6 horas, aunque no es lo adecuado.
- ⊕ Los medios deben mantenerse a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar la siembra.⁶⁸
- ⊕ Rotular los tubos con nombre o código del paciente y la fecha. Se emplearán 4 o 6 tubos por paciente.
- ⊕ Traspasar la muestra de orina a tubos de vidrio (13 mL) y luego centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 1 mL de buffer fosfato salino pH 7,4 o solución salina fisiológica a 0,9%.
- ⊕ A partir del sedimento resuspendido, realizar diluciones sucesivas hasta 1:10 000.
- ⊕ Sembrar 0,5 mL de la resuspensión en 4,5 mL de medio EMJH o Fletcher que contiene el antibiótico 5-fluorouracil (100-200 mg/mL) de este primer tubo (dilución 1:10) sembrado, extraer 0,5mL y sembrar en un tubo que contiene

4,5 mL de medio. De este segundo tubo (dilución 1:100), extraer 0,5 mL y sembrar en un tubo con 4,5 mL de medio. Realizar este procedimiento hasta que la dilución final de la orina sea 1:10 000.

- ⌚ Concluída la siembra, colocar los tubos sembrados en una gradilla e incubar a 28°C -30°C condiciones aeróbicas por 4-8 semanas. ⁶⁸

Interpretación

Generalmente, la muestra de orina tiende a contaminarse y acidificarse rápidamente. Por ello, es importante realizar el cultivo en el menor tiempo posible después de colectado la muestra.

SIEMBRA DE LA MUESTRA DE UN ORGANO

Materiales y Equipos

- ✎ Cabina flujo laminar
- ✎ Estufa de 28°C – 30°C
- ✎ Mechero Bunsen
- ✎ Morteros
- ✎ Propipeta o pipeteador automático
- ✎ Microscopio de campo oscuro
- ✎ Pipeta Pasteur
- ✎ Jeringas descartables
- ✎ Láminas porta-objetos
- ✎ Laminillas cubre-objetos
- ✎ Guantes de látex
- ✎ Contenedor de material contaminado
- ✎ Medio de Cultivo
 - a) Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b) Tubo con medio EMJH

Procedimiento

- ★ Mantener la muestra a temperatura ambiente durante su transporte hasta su procesamiento por un período máximo de 4 horas después de tomada la muestra o refrigerado de 4°C – 8°C por un período máximo de 6 horas. ⁶⁸
- ★ Los medios deben mantenerse a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar la siembra.
- ★ Rotular los tubos con nombre o código del paciente y la fecha. Se emplarán 4 o 6 tubos por paciente.
- ★ Trasvasar la muestra a un mortero, luego realizar un macerado con arena lavada y estéril, hacer un machacado del órgano, agregar 2 mL de PBS y absorber la suspensión y pasarlo a un tubo con PBS de 5 mL, luego se mezcla enérgicamente y se deja reposar en posición vertical.
- ★ A partir del sobrenadante, extraer 0,5 mL y sembrar en 4,5 mL de medio EMJH o Fletcher. Repetir este mismo procedimiento para tres tubos más.
- ★ Concluída la siembra, colocar los tubos sembrados en una gradilla e incubar a 28°C- 30°C en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas. ⁶⁸

10.4 ANEXO D

10.4.1 PRUEBAS BIOQUIMICAS

La catalasa y la Peroxidasa son las enzimas que catalizan el rompimiento del peróxido de hidrogeno H_2O_2 .

Catalasa

Comprobar la presencia de la enzima catalasa.

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo y por lo tanto descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Técnica:

- ◆ Prueba en portaobjeto:
Transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos.
Añadir una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3%
Homogeneizar el inóculo
Método en tubos o placas de agar
Añadir unas gotas (aproximadamente 0.1 mL) de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre la superficie del desarrollo de una placa.
En la prueba semicuantitativa en tubos, el agar se vuelca formando una superficie plana en lugar de inclinada.

Interpretación:

- ✓ Prueba cualitativa
Prueba positiva: aparición rápida y producción sostenida de burbujas de gas efervescencia.
- ✓ Prueba semicuantitativa
Prueba positiva: una columna de 50 mm o más.¹¹¹

Oxidasa

La prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

Técnica:

Con una parte de la colonia a estudiar se hace un frotis sobre un área impregnada con reactivo de una tira de prueba para oxidasa.

También puede realizarse utilizando el reactivo de Kovacs para oxidasa (solución acuosa al 1% de bicloruro de tetrametil- p-fenilendiamina) el reactivo de Gordon y McLeod; el reactivo de Nadi; el de Carpenter o discos impregnados.¹¹¹

Interpretación:

- Colonias oxidasa positivas: la colonia toma un color rosado, después marrón finalmente negro. Cuando se emplea una mezcla del reactivo dimetil-p-fenilendiamina- a-naftol, la reacción oxidasa positiva está indicada por un color azul.
- Colonias oxidasa negativas: No se produce cambio de color en las colonias; o se adquiere un color rosa pálido por el reactivo.¹¹¹

10.5 ANEXO E

10.5.1 TINCIONES

TINCIÓN DE GRAM

Ésta es una tinción diferencial usada para demostrar las propiedades tintoriales de bacterias de todos los tipos.

Las bacterias Gram positivas retienen el colorante de cristal violeta después de la decoloración y se ven de color azul oscuro.

Las bacterias Gram negativas no son capaces de retener el colorante cristal violeta después de la decoloración y se contratiñen de color rojo con el colorante de safranina.

Las características tintoriales pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes, viejos, muertos o en degeneración.

Técnica

- 1) Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar al aire.
- 2) Se fija el material en el portaobjeto pasándolo 3 ó 4 veces a través de la llama de un mechero de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de tinción.
- 3) Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie con solución de cristal violeta.
- 4) Después de 6 – 30 segundos de exposición al cristal violeta se lava totalmente con agua destilada.
- 5) Se cubre el frotis con solución de yodo de Gram durante 12 – 60 segundos. Se lava nuevamente con agua.
- 6) Se sostiene el frotis entre los dedos pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona hasta que no se desprenda color violeta (1-2 segundos, no más de 5 segundos).
- 7) Se lava con agua corriente y se coloca otra vez sobre el soporte. Se cubre la superficie con contratinción de safranina durante 10 – 30 segundos. Se lava con agua corriente.
- 8) Se coloca el preparado en posición vertical dejando que drene el exceso de agua.
- 9) Se examina el frotis en el microscopio.

Interpretación

Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul oscuro y las bacterias Gram negativas se ven de color rojo rosado.¹¹¹

TINCIÓN ROJO DE CONGO

Condiciones generales

Morfológicamente los diferentes serotipos de leptospiras en el examen directo por la coloración rojo de Congo son indistinguibles, estas bacterias son helicoidales aproximadamente de 0,1 μm de diámetro, 6-20 μm de largo y usualmente en los extremos presentan la forma de un semigancho.⁶⁸

Materiales y equipos

- ❖ Set para coloración rojo de Congo
- ❖ Mechero Bunsen
- ❖ Propipeta o pipeteador automático
- ❖ Microscopio de campo oscuro
- ❖ Microscopio de campo claro
- ❖ Pipeta pasteur
- ❖ Láminas porta-objetos
- ❖ Laminillas cubre objetos
- ❖ Guantes de látex
- ❖ Contenedor de material contaminado

Procedimiento

En LCR

- ✎ Después de haber realizado el procedimiento del cultivo de LCR, extraer con una pipeta pasteur estéril aproximadamente 100 μL de LCR del frasco y traspasarlo a tres láminas porta-objetos, colocando una gota de LCR por lámina.
- ✎ Seguidamente, en la lámina al lado de la muestra poner una gota de una solución acuosa de rojo de Congo 2%.
- ✎ Mezclar con una platina la muestra con el colorante y realizar un extendido similar a un frotis para
- ✎ hemograma.
- ✎ Secar a temperatura ambiente por 30 minutos
- ✎ Cubrir la lámina con una solución alcohol y ácido clorhídrico a 10N hasta adquirir una coloración azul.
- ✎ Examinar con objetivo de inmersión.

En Orina

Después de haber realizado el procedimiento del cultivo de orina, extraer con una pipeta Pasteur estéril aproximadamente 100 μL de sedimento de orina y traspasarlo a tres láminas porta objetos (una gota de sedimento de orina por lámina).⁶⁸

En Órganos

Después de haber realizado el procedimiento del cultivo, extraer con una pipeta pasteur estéril aproximadamente 100 μL de sedimento de órgano y traspasarlo a tres láminas porta-objetos (una gota de sedimento de órgano por lámina).

Lectura

Realizar la lectura de cada lámina buscando leptospiras.

La evaluación consiste en observar un frotis de cada muestra en microscopio de campo claro con un objetivo de inmersión en la búsqueda de leptospiras y sus características morfológicas.

Interpretación

- ✓ Las espiroquetas aparecen inmóviles e incoloras en fondo azul.
- ✓ La presencia de leptospiras en cualquiera de las muestras indica la positividad del caso.
- ✓ Generalmente, la presencia de otras bacterias en la orina es normal, pero en LCR, y órganos indica que la muestra se contaminó durante el procedimiento de toma de muestra o transporte de la muestra.
- ✓ La observación de la muestra de sangre con esta coloración de rojo de Congo no es aplicable.
- ✓ La concentración de leptospiras en LCR en muchos casos, es mínima. No observar leptospiras no significa que las bacterias están ausentes.
- ✓ En el machacado de órganos como el riñón e hígado se pueden observar mayor número de leptospiras.
- ✓ El diagnóstico presuntivo por observación con coloración de Congo debe confirmarse y correlacionarse con los hallazgos en el cultivo y por los resultados serológicos.⁶⁸

TINCIÓN DE GIEMSA

En este método se reemplazan los colorantes policromáticos empíricos por distintos compuestos de azur (tionina y sus derivados metilados).

Generalmente este tipo de tinción se lleva a cabo para microorganismos intracelulares como por ejemplo: ***H. capsulatum***, algunas formas de ***Penicillium***, etc.

Técnica:

El frotis se seca al aire, se fija con metanol absoluto durante 5 min se cubre con la solución de Giemsa durante 15 a 20 minutos el portaobjetos se lava rápidamente con alcohol etílico 95% para quitar el exceso de colorante. Se examina para observar la presencia del típico cuerpo intracitoplasmático.

Interpretación:

Los cuerpos elementales se tiñen de color violeta, en tanto que los cuerpos iniciales son un poco basófilos y tienden a colorearse de azul.¹¹¹

TINCIÓN ARGENTINA

Ciertas bacterias, por ejemplo las espiroquetas y los pequeños microorganismos con forma de bacilos asociados con la enfermedad del arañazo de gato (*Bartonella henselae* y *Bartonella quintana*) no se tiñen con los métodos convencionales.²³

La tinción argéntica es el uso de plata (en latín, *Argentum*) para modificar selectivamente el color o la apariencia de un objeto. Es una técnica frecuente de tinción en histología donde se utiliza para revelar detalles extremadamente finos (Figura 59).

Técnica

- ✓ FIJACIÓN:
30 min en una solución de ácido acético al 5 % y metanol al 50%.
- ✓ LAVADO:
15 min en una solución de metanol al 50%.
15 min en agua milli-Q.
- ✓ SENSIBILIZACIÓN:
1 min en una solución de tiosulfato sódico al 0.01%.
- ✓ LAVADO:
2 lavados de 1 min con agua milli-Q.
- ✓ TINCIÓN: NITRATO DE PLATA al 0.1% durante 20 min a 4°C.
- ✓ LAVADO:
2 lavados de 1 min con agua milli-Q.
- ✓ REVELADO:
Solución de carbonato sódico al 2% en formalina (formol al 35%) al 0.04%.
- ✓ FIJACIÓN:
5 min en una solución de ácido acético al 5%.
- ✓ CONSERVACIÓN:
A 4°C en ácido acético al 1%.
* Todas las soluciones han de prepararse en el momento de uso con agua mQ.¹¹²

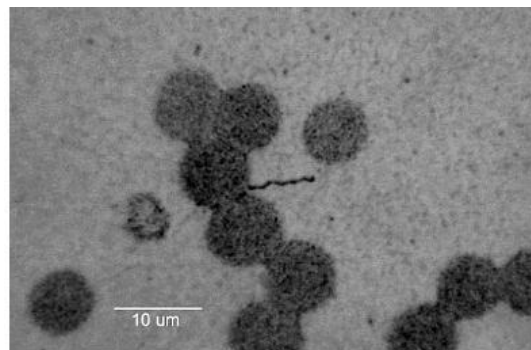


FIGURA 59: Leptospiras impregnadas con plata (Wathin Starry), en sangre del paciente con leptospirosis crónica.¹⁰¹

Laboratorios Nacionales de Referencia en México
MÉXICO Y AMÉRICA CENTRAL
MÉXICO
HUMANOS

Instituto Nacional de Diagnostico Referencia Epidemiológica
Prolongación Carpio 470 Col. Sto. Tomas C.P. 11340 México DF
Tel: + 52 (55) 5342 7574; 5342 7578; 5341 1101; Fax: + 52 (55) 5341 3264

DISCUSIÓN

Como parte de los resultados se elaboró el presente “Manual para el diagnóstico microbiológico de *Leptospira interrogans*”. La elaboración del manual tiene como propósito apoyar al Laboratorio Clínico y a través del cual, se pretende proporcionar una herramienta que sirva como material de consulta y apoyo práctico, para contribuir en la formación de los alumnos de la Carrera de QFB del módulo de Microbiología Médica del área de Bioquímica Clínica de la FES Zaragoza.

La utilidad que tiene para alumnos, los QFB y otras profesiones del área de la salud, es el de contener información de forma integral de la bacteria *Leptospira interrogans*, con estudios y datos recientes que aportan conocimientos sobre este microorganismo.

El manual es una recopilación de información bibliográfica y de artículos electrónicos con información específica, concisa y estructurada de tal forma que sea de gran ayuda para el microbiólogo, en el cual se describen las principales características de la leptospirosis humana causada por la espiroqueta *Leptospira interrogans*. A fin de contribuir a una correcta identificación de este microorganismo en el laboratorio clínico, el cual resulta una herramienta rápida y accesible para todo tipo de laboratorio.

En el manual contempla la importancia que se debe prestar a la leptospirosis ya que es un padecimiento al cual no se le ha otorgado la debida importancia epidemiológica, principalmente en situaciones de desastre natural, a pesar de que se ha visto un incremento en los años recientes como consecuencia de las fuertes inundaciones originadas por desbordamientos de ríos, huracanes y precipitaciones pluviales que afectaron gran parte del Pacífico Sur y Golfo de México.

El propósito de este manual es de dar a conocer a la espiroqueta *Leptospira interrogans*; al ser bacilos Gramnegativo, espiroqueta enrollada muy fina y larga de 6 a 20 μm de largo y 0,1 a 0,2 μm de ancho, flexible, helicoidal, extraordinariamente móvil, aerobio estricto, que se cultiva con facilidad en medios artificiales requiriendo para su crecimiento tiamina y vitamina B12, con una temperatura óptima de crecimiento entre 25-30°C, son sensibles a la luz solar, a la desecación, al calor y frío excesivo así como a las variaciones del pH.

También se da a conocer la marcha microbiológica la cual consta de 3 fases del control de calidad; la fase pre analítica es la recolección de la muestra, la fase analítica que muestra el procesamiento de la muestra el cual consta de la observación en microscopio en campo oscuro de muestras de orina, sangre y líquido cefalorraquídeo, la elección de los medios de cultivo útiles para su aislamiento como ejemplo son: el crecimiento a diferentes temperaturas en medio de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con suplemento de

albúmina, ácidos grasos y la 8-azaguanina para poder diferenciar entre las leptospirosas patógenas y no patógenas, desde el punto de vista fisiológico.

Las leptospirosas patógenas se caracterizan por no crecer en presencia de 8-azaguanina y a temperatura de 13°C, los saprofitos tienen la capacidad de crecer a temperatura de 10°C e inferiores o al menos 5 °C por debajo de la temperatura de crecimiento de las leptospirosas patógenas, las tinciones que se pueden utilizar para su observación, las pruebas serológicas para su diagnóstico, en el que destaca el test de aglutinación microscópica (MAT), técnica de referencia internacional para la confirmación serológica de los casos; y la fase Posanalítica donde se muestra la realización del informe para reportar los resultados.

La leptospirosis puede, potencialmente, constituir una enfermedad grave aunque susceptible de ser tratada oportunamente; sus síntomas pueden ser similares a los de otras infecciones no relacionadas, tales como influenza, meningitis, hepatitis, dengue o fiebres virales hemorrágicas. Algunas de estas infecciones, en particular el dengue, pueden dar lugar a grandes epidemias y los casos de leptospirosis que ocurran durante esas epidemias, pueden pasar desapercibidos. Por lo que es importante distinguir la leptospirosis del dengue y otras fiebres hemorrágicas en pacientes provenientes de países donde estas enfermedades son endémicas; aunque actualmente esto es aún difícil, nuevos desarrollos pueden reducir los problemas técnicos en un futuro cercano. Es necesario incrementar la conciencia y el conocimiento de la leptospirosis como un problema de salud pública y el objetivo de este manual es incidir en ese proceso.

La mayoría de las complicaciones de la enfermedad están asociadas con la localización de las leptospirosas en los diferentes tejidos en esta fase y esto ocurre a partir de la segunda semana de evolución. La leptospirosis puede presentarse con una diversidad de manifestaciones clínicas que pueden variar desde una enfermedad pseudo gripal leve hasta una enfermedad seria que puede llegar a ser fatal.

El diagnóstico de la leptospirosis debe ser considerado en cualquier paciente que presente fiebre súbita, escalofríos, inyección conjuntival, dolor de cabeza, mialgia e ictericia.

Por otra parte el diagnóstico es más difícil cuando los pacientes presentan síntomas tales como tos, disnea, náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, artralgias y erupción en la piel. La inyección de la conjuntiva y el dolor muscular, más notable en las áreas lumbares y pantorrillas, son los hallazgos clínicos más distintivos. La sospecha se incrementará si hay historia de exposición ocupacional o recreacional a animales infectados o a un ambiente potencialmente contaminado con orina animal. Una vez que se haya considerado la posibilidad de la leptospirosis se deben aplicar pruebas apropiadas de diagnóstico y manejo clínico.

El aporte del laboratorio es esencial para la confirmación de los casos, y un diagnóstico confiable y precoz es imprescindible para comenzar inmediatamente

una antibioticoterapia efectiva que prevenga la evolución hacia formas graves de la enfermedad.

Existen varios documentos que hablan sobre la leptospirosis que fueron realizadas por diferentes naciones tales como Cuba, Argentina entre otros, esto se debe a que en estas naciones el incremento de esta enfermedad está creciendo debido a que son zonas donde las inundaciones están al día. A diferencia de todos estos manuales realizados por varias naciones, este manual tiene información actualizada con una recopilación de artículos científicos realizados hoy en día que comentan de estudios de la bacteria *Leptospira interrogans*, lo que hace a este manual único en su tipo.

CONCLUSIONES

- ❖ Se elaboró un manual diagnóstico microbiológico para la identificación de *Leptospira interrogans*, presentado en 10 capítulos que van desde etiología hasta tratamiento, prevención y anexos.
- ❖ Con la elaboración del presente manual, se proporcionó un documento que apoya a la docencia en el Módulo de Microbiología Médica de la carrera Químico Farmacéutico Biológica.
- ❖ Contiene información integral de la bacteria *Leptospira interrogans*, con estudios y datos recientes que aportan conocimientos sobre este microorganismo, siendo de ayuda para que el personal del Laboratorio Clínico, en el cual se describen las principales características de la leptospirosis humana. A fin de contribuir a una correcta identificación de este microorganismo en el laboratorio clínico,
- ❖ Es una herramienta rápida y accesible para todo tipo de laboratorio.
- ❖ Se brindó una guía sobre el manejo adecuado de las muestras en el laboratorio para el diagnóstico de la leptospirosis humana.

REFERENCIAS

1. Coordinación de Programas Integrados de Salud, Unidad de Salud Pública, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, DF. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. (Publicación periódica en línea).Salud Pública México (citada 2006; Vol. 48(3):220-228).Se consigue en: <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000220>
2. Simposio Internacional de Microbiología Médica. 5ª Reunión anual del Departamento de Microbiología. Leptospirosis humana en México. (Publicación periódica en línea). 09 de Diciembre de 2011. Se consigue en: http://todos.cicese.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=265:simposio-internacional-de-microbiologia-medica-5o-reunion-anual-del-departamento-de-microbiologia&catid=9:breviario
3. Imparten pláticas al personal del rastro municipal para que cumplan con las normas y el manejo higiénico de la carne. (Publicación periódica en línea). Martes 18 dic 2012. La Coordinación de Salud Municipal. Se consigue en: http://www.opb.gob.mx/opb2011/index.php?option=com_content&view=article&id=1740&catid=46:sala-de-prensa&Itemid=181
4. Vado Solís I, Marrufo Cárdenas M, Jiménez Delgadillo B, Alzina López A, Laviada Molina H. Clinical epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. Rev. Inst Med Trop Sao Paulo 2002; 44(6):335-340.
5. Adelina Braselli. LEPTOSPIROSIS.(Publicación periódica en línea).Se consigue en: <http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm>
6. Salud Uninorte. Barranquilla Leptospirosis icterica: Síndrome de Weil's (Publicación periódica en línea) 2004.(citada 19: 31-40, 2004)Se consigue en:<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=81719004>
7. Leptospirosis. Oficina General de Epidemiología .Instituto Nacional de Salud. (Publicación periódica en línea). Documentos Monográficos N°2. Se consigue en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%C3%B3dulo%20t%C3%A9cnico%20leptospirosis.pdf>
8. Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud. LEPTOSPIROSIS. (Publicación periódica en línea). 3 de Abril de 2013. Se consigue en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/leptospirosis.htm>

9. Restrepo A.M. Fundamentos de medicina. Enfermedades infecciosas. 6ª. Ed Corporación para investigaciones biológicas .Colombia Bogotá 2004. Pág. 247-250.
10. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Caracterización fenotípica, serológica y molecular de *Leptospira* spp en fuentes de agua de consumo humano en Masagua, Escuintla.(Publicación periódica en línea) 2007(citado 26 de junio de 2008 Departamento de Microbiología) Se consigue en: http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=aislamiento%20e%20identificaci%C3%B3n%20de%20leptospira%20%20interrogans%20en%20fuentes%20de%20agua%20de%20la%20aldea%20el%20milagro%2C%20masagua&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fbiblioteca.usac.edu.gt%2Ftesis%2F06%2F06_2974.pdf&ei=GLotUafmI42A2AWMvYG4BA&usg=AFQjCNFleVIXc4W99MmtxGfnOA660KEl1A&bvm=bv.42965579,d.b2U
11. Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-199. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano. (Publicación periódica en línea). 18 de octubre de 2000. Se consigue en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/029ssa29.html>
12. Leptospirosis Epidemiología y Situación Mundial. (Publicación periódica en línea) Miércoles, 06 de enero de 2013. AMSE Asociación de médicos de Sanidad exterior. Se consigue en: http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=184:leptospirosis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50
13. Secretaria de Salud. Secretaria de Prevención y promoción de la Salud. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis. (Publicación periódica en línea) Septiembre ,2012. Se consigue en: http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/VIG_EPID_MANUALES/14_2012_Manual_Leptospirosis_vFinal_21nov12.pdf.
14. Rodríguez G.M. Ph.D. Estado actual de la leptospirosis. (Publicación periódica en línea) ICA - CEISA, Bogotá DC2000. Colombia(citada MVZ-CORDOBA 2000; 5:(1), 61-63) Se consigue en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/MVZ-51/61.pdf>
15. Alfaro, C., Y. Aranguren y A. Clavijo. Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control.)Publicación periódica en línea) septiembre-diciembre 2004. (citado Número 6) Revista Digital CENIAP HOY, Maracay, Aragua, Venezuela. Se consigue en: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaro_c/arti/alfaro_c.htm

16. Diagnósticos de Leptospirosis. Standars diagnostics, Inc. (Publicación periódica en línea). Rev. SC 1004. LEF 16SP. Se consigue en: http://www.ctr.com.mx/img_prod/leptospira_f.pdf
17. Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. (Publicación periódica en línea). Octubre - Diciembre, 2005. (citada Rev. Méx Patol Clin, Vol. 52, Núm. 4, pp 246-256). Se consigue en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2005/pt054f.pdf>
18. Bayle Scott .Diagnóstico Microbiológico 12^a ed. Editorial Medica Panamericana: Buenos Aires Argentina. 2009.
19. MacFaddin Jean F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3^a ed. Buenos Aires, Bogotá: Editorial Medica Panamericana. 2004 pág. 73,81.
20. Ministerio de Salud Pública. Guía de control y manejo de Leptospirosis. (Publicación periódica en línea) .Se consigue en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/leptos.pdf>
21. Fernández R. Leptospirosis, una revisión actualizada. (publicación periódica en línea) 25 de febrero de 2013(citada 2012 Veterinaria Argentina, 29(291)). Se consigue en: URL: http://produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/zoonosis/22-leptospirosis.pdf
22. Romero Cabello R. Microbiología y Parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3^a ed. México: Médica Panamericana; 2007.p.1031-1036.
23. García Portela R. Leptospirosis humana. (publicación periódica en línea) 3 de Abril 2013 (citada Hospital Abel Santamaría, Pinar del Río). Se consigue en: URL: <http://files.sld.cu/boletincnscs/files/2010/11/respub2010-dr-garcia-portela.pdf>
24. Enna ZM y Pizarro R. Leptospirosis: Puesta al día (publicación periódica en línea) 3 de Abril de 2013 (citada Hospital Dr. Lucio Córdova Santiago Chile. rev chil infect 2007; 24 (3): 220-226, versión impresa issn 0716-1018). Se consigue en: URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-10182007000300008&script=sci_arttext
25. Perez Garcia R. Leptospirosis y enfermedad de Weil (publicación periódica en línea) 3 de Abril de 2013(citada lunes, 12 de noviembre de 2012: revisado y actualizado el 15-2-2013).Se consigue en: URL: <http://drrafaelperezemergency.blogspot.mx/2012/11/leptospirosis-y-enfermedad-de-weil.html>

26. Dammert N. Leptospirosis: una revisión bibliográfica. Facultad de Medicina Veterinaria. (publicación periódica en línea) 4 de Abril de 2013(citada 2005 Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Se consigue en : URL: http://www.sapuvetnet.org/antigo/pdf%20files/monografia_leptospira.pdf
27. Botella S. Seguridad y Salud en el trabajo, Fichas Prácticas: Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 4 de Abril de 2013(citada diciembre 2009, Nº 55 • Profesoras del máster de Prevención de riesgos laborales de la universidad Politécnica de Valencia). Se consigue en: URL: http://www.insht.es/inshtweb/contenidos/documentacion/textosonline/rev_in_sht/2009/55/60_fichas_practicas.pdf
28. Secretaria de Salud del Estado de Tabasco: Salud en Tabasco. Leptospirosis: pleomorfismo Clínico en el Síndrome Febril (citada Diciembre, 2002/ vol .8, número 003, México, p.128-132). Se consigue en: URL: core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/5368704
29. Sociedad Argentina de Infectología. Leptospirosis: publicación de la Comisión de emergentes y enfermedades endémicas. (publicación periódica en línea) 5 de Abril de 2013. (citada 2 abril 2012, número 1). Se consigue en: URL: http://www.sadi.org.ar/files/numero%20dos_abril%202012.pdf
30. Gallegos Mesén A. Medicina tropical: Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 6 de Abril de 2013(citada revista Médica de Costa Rica y Centroamérica lxvii (592) 115-121 2010). Se consigue en: URL: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/592/art2.pdf>
31. Velasco Castrejón O. Leptospira ¿simulador o causante de leucemia? (publicación periódica en línea) 7 de Abril de 2013 (citada Rev Cubana med trop v.57 n.1 ciudad de la Habana ene.-abr. 2005). Se consigue en: URL: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0375-07602005000100003&script=sci_arttext
32. Marcano RJ. Medicina Preventiva: Santa Fe. Cuidado con la leptospirosis! (publicación periódica en línea) 3 de Julio 2013(citada junio 30, 2013; Caracas Venezuela). Se consigue en: URL: <http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/leptospirosis.htm>
33. Brooks G. Microbiología Médica. 25ª ed. México: McGraw –Hill; 2011. p. 301, 308-310
34. Caino H. Leptospirosis. Facultad de Ciencias Médicas. (publicación periódica en línea) 16 de Abril de 2013(citada 2006 octubre; 1(3): 30).Se consigue en: URL: <http://revista.med.unlp.edu.ar/archivos/200610/4%20curcio%20-%20leptospirosis.pdf>

35. Red de revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Primer reporte en Cuba de *Leptospira interrogans* serovar *tarassovi* y caracterización clínica epizootológica en focos de leptospirosis porcina. (publicación periódica en línea) 2 de Mayo de 2013. (citada Sistema de información Científica. Issn. 1695-7504. vol. vi, nº 4, abril 2005) Se consigue en: URL: <http://www.redalyc.org/pdf/636/63612647002.pdf>
36. Instituto de Higiene. Del Monte A. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 18 de Abril de 2013. (citada Departamento de bacteriología y virología). Se consigue en: URL: <http://www.higiene.edu.uy/leptos.htm>
37. Fotos dibujos imágenes. Dibujos de los pulmones: Biología Química. (publicación periódica en línea) 20 de Mayo de 2013 (citada jueves 11 de octubre de 2012). Se consigue en: URL: <http://biologiafotosdibujosimagenes.blogspot.mx/2012/10/dibujos-de-los-pulmones-pulmon.html>
38. Céspedes ZM. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. (publicación periódica en línea) 2 de Mayo de 2013 (citada rev. perú. med. exp. Salud pública. oct. /dic 2005, vol.22, no.4 p.290-307). Se consigue en: URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1726-46342005000400008&lng=es&nrm=iso. issn 1726-4634
39. Carneiro M. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: estudio clínico y epidemiológico. (publicación periódica en línea) 16 de Abril de 2013 (citada rev chil infect 2004; 21 (4): 339-344). Se consigue en: URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-10182004000400008&script=sci_arttext
40. García González R. Leptospirosis; un problema de Salud Pública, departamento de Microbiología y Parasitología; Facultad de medicina .UNAM (citada rev latinoamer patol clin, vol. 60, núm. 1, pp 57-70 • enero - marzo, 2013). Se consigue en: URL <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2013/pt131g.pdf>
41. Ruíz Solís A. Leptospirosis. (tesis doctoral) Universidad Popular del Estado de Puebla; junio de 1997.
42. Koneman Elemer W. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas color. 5ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.; 2004. p. 945-947
43. Instituto Nacional de Salud Leptospirosis: Oficina General de Epidemiología. (publicación periódica en línea). 5 de Mayo de 2013 (citada documentos monográficos nº2). Se consigue en: URL: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%c3%b3dulo%20t%c3%a9cnico%20%20leptospirosis.pdf>

44. Ministerio de Salud. Norma Técnica para la Atención Integral de la Leptospirosis humana. (publicación periódica en línea) 30 de junio (citada 24 de julio de 2006). Se consigue en: URL: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/leptopirosis/normat%c3%89cnicaparala%20atenci%c3%93nintegraldelaleptospirosishumana.pdf>
45. Medina Duque AE. Universidad de San Carlos de Guatemala. Determinación de la presencia de Anticuerpos contra *Leptospira interrogans* en cerdas de cinco granjas tecnificadas de Guatemala, utilizando la prueba de microaglutinación (MAT). (citada Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Guatemala, febrero de 2008). Se consigue en: URL: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1080.pdf
46. Norma Técnica de Salud para la atención integral de la persona afectada con Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 26 de Abril de 2013(citada n° 049-minsa/dgsp-v.01 r.m. 675-2006/minsa. 24 de julio del 2006).Se consigue en : URL: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/archivo/2011/leptospirosis.pdf
47. Organización Panamericana de la Salud. Leptospirosis humana: guía para el Diagnóstico, vigilancia y Control (publicación periódica en línea) 29 de junio de 2013(citada vp/ops/oms, 2008). Se consigue en: URL: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>
48. Ministerio de Salud El Salvador .Lineamientos Técnicos para la atención y control de Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 25 de mayo de 2013 (citada el 3 Noviembre de 2012). Se consigue en: URL: http://www.fosalud.gob.sv/phocadownload/lineamientos_leptospirosis_18_nov.pdf
49. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de medicina interna. Hospital General de Castellón. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 2 de junio de 2013 (citada rev med univ navarra/vol 50, n° 2, 2006, 3-6 leptospirosis). Se consigue en: URL: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:i6u9hyx6faqj:www.unav.es/revistamedicina/50_2/articulo%25201-%2520leptospirosis.pdf+rev+med+univ+navarra/vol+50,+n%c2%ba+2,+2006,+3-6+leptospirosis&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx
50. Flores Castro R. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. (publicación periódica en línea) 19 de Mayo de 2013(citad Gaceta Médica de México. 2010;146:423-29).Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2010/gm106j.pdf>
51. Coordinación de Salud Municipal. Imparten pláticas al personal del rastro municipal para que cumplan con las Normas y el Manejo higiénico de la carne. (publicación periódica en línea) 2 de Junio 2013 (citada martes 18

- dic 2012). Se consigue en: URL: http://www.opb.gob.mx/opb2011/index.php?option=com_content&view=article&id=1740&catid=46:sala-de-prensa&itemid=181
52. Hernández Rodríguez P. Leptospirosis: una zoonosis que afecta a la salud pública y la Producción pecuaria. (publicación periódica en línea) 25 de Mayo de 2013(citada rev. cienc. anim. Bogotá – Colombia nº 4 pp. 15-23 | 2011 | issn 2011-513x. aprobado: 11 de mayo del 2011). Se consigue en: URL: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/ca/article/view/313>
53. Swapan K. Microbiología. Basadas en la resolución de problemas. 1ª ed. España: Elsevier; 2007. p. 345-346.
54. Murray PR. Microbiología Médica .6ª ed. España: Elsevier; 2009. p.416-419.
55. Vásquez HA. Género *Treponema* y *Leptospira*. (publicación periódica en línea) 5 de Junio de 2013 .Se consigue en: URL: [http://webzoom.freewebs.com/investigacionvasquez/generotreponema%20y%20leptospira%20micro%202013%20\[modo%20de%20compatibili.pdf](http://webzoom.freewebs.com/investigacionvasquez/generotreponema%20y%20leptospira%20micro%202013%20[modo%20de%20compatibili.pdf).
56. Verdasquera Corcho D. Enfrentamiento a brotes epidémicos de Leptospirosis humana. (publicación periódica en línea) 20 de Junio de 2013(citada rev panam infectol 2011; 13(1):28-35). Se consigue en: URL: http://www.revista-api.com/2011/pdf/01/api_01_11_e.pdf
57. Science daily. Key protein in leptospirosis bacterium identified. (publicación periódica en línea) 28 de Junio de 2013(citada nov. 1, 20079. Se consigue en: URL: <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/10/071027174533.htm>
58. Cabezas A. Dinámica de ac antileptospirales en pacientes enfermos de leptospirosis con hemocultivos positivos. (publicación periódica en línea) 2 de julio de 2013. (citada Facultad de ciencias médicas de guinea Ecuatorial. **dirección provincial de salud pública de pinar de río. Cuba).
59. Federación Mexicana de patología Clínica. Leptospirosis humana. historia natural, diagnóstico y tratamiento. (publicación periódica en línea). 21 de Junio de 2013 (citada rev. méx patol clín, octubre - diciembre, 2005. vol. 52, núm. 4, pp 246-256). Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2005/pt054f.pdf>
60. Solano chinchilla A. Leptospirosis en humanos. (publicación periódica en línea) 15 de julio de 2013(citada rev cost. de ciencias médicas. vol 17/n 2, junio de 1996). Se consigue en: URL: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v17n2/art4.pdf>

61. Kumate J. Manual de Infectología clínica. 16^a ed. México: Méndez editores; 2001. p. 535-537.
62. Norma técnica de salud para la atención integral de la persona afectada con Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 26 de Mayo de 2013 (citada n° 049-minsa/dgsp-v.01 r.m. 675-2006/minsa. Dirección general de salud de las personas. 1^a edición- 2006) Se consigue en: URL: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/archivo/2011/leptospirosis.pdf
63. Khaldoon's. Medical pictures. Medical website. Leptospira. (publicación periódica en línea) 5 de Julio (citada sep 2009). Se consigue en: URL: <http://www.drkhaldoon.com/apps/photos/photo?photoid=52574254>
64. García Martos P. Microbiología clínica Aplicada. 3^a ed. España: ediciones Díaz de Santos; 1997. p. 12.
65. Ministerio de Salud Pública. Ministerio de Ganadería, Agricultura y pesca guía de Control y Manejo de Leptospirosis. (publicación periódica en línea). 19 de Mayo de 2013 (citada OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.01/02). Se consigue en: URL: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/leptos.pdf>
66. Hugo Álvarez V. Protocolo de vigilancia de Leptospirosis: Vigilancia y control en salud pública. (publicación periódica en línea) 3 de Mayo de 2013 (citada 25 de septiembre 2009) http://www.idesac.gov.co/files/archivos_pdf/leptospirosis%20protocolo.pdf
67. Subdirección de vigilancia y control. Protocolo leptospirosis. Evento de vigilancia: Leptospirosis (publicación periódica en línea) 10 de Abril de 2013 (citada semestre de 200ins-página 1 de 16). Se consigue en: URL: <http://www.minsalud.gov.co/documentos%20y%20publicaciones/protocolo%20de%20leptospirosis.pdf>
68. Bello Pieruccini S. Manual de Leptospira .Instituto Nacional de Salud. (publicación periódica en línea) 26 de Junio de 2013 (citada código: mnl-r01.001.5030-008, 13 julio de 2011). Se consigue en: URL: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/examenes-de-inter%c3%a9s-en-salud-publica/microbiologa/mnlr011%20003%205030-008%20manual%20de%20leptospira%20v%2000%20ok.pdf>
69. Ministerio de Salud. Lineamientos para la Vigilancia y Control de la Leptospirosis en el Salvador. (publicación periódica en línea) 10 de Mayo de 2013 (citada 28 el octubre de 2010). Se consigue en: URL: http://www.who.int/medical_devices/survey_resources/medical_devices_for_emergency_leptospirosis_el_salvador.pdf.
70. Samartino Ernesto L. CONBRAVET Gramado, Rio Grande do Sul Brasil. Epidemiología de la Leptospirosis humana y animal. (publicación periódica

- en línea). 15 de Junio de 2013. (citada octubre 2008). Se consigue en:
URL:
http://www.sovergs.com.br/palestras/dr_luis_samartino_%20epidemiologia_de_la_leptospirosis_humana_y_animal.pdf
- 71.Elizalde Campos A. Identificación de *Leptospira* en la patogénesis de la uveítis crónica en la Ciudad de México. (publicación periódica en línea) 28 de Mayo de 2013 (citada rev mex oftalmol; julio-agosto 2004; 78(4):165-170). Se consigue en: URL:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexoft/rmo-2004/rmo044b.pdf>
- 72.Boza. Ricardo Sobre la patogénesis de la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 10 de Julio de 2013 (citada rev. costarric. cienc. méd vol.20 no.1-2 san josé jun. 1999). Se consigue en: URL:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=s0253-29481999000100011&script=sci_arttext
- 73.Gamarra R. Leptospirosis. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. (publicación periódica en línea) 10 de Junio de 2013. (citada revisión bibliográfica - 2009). Se consigue en: URL: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/gamarra_leptospira.pdf
74. Fernandez. J. Bacteriología. (publicación periódica en línea) 25 de Julio de 2013(citada octubre 2012). Se consigue en: URL: <http://bacteriologiaenenfermeria.blogspot.mx/>
- 75.Harvey Richard A. Microbiología .2ª ed. España: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.p. 168-169.
- 76.Bernard D. Tratado de Microbiología con inclusión Inmunológico y Genética molecular. 3ª ed. España: Salvat editores; 1985. p. 619-621.
- 77.Carrión A D. Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. (publicación periódica en línea) 15 de Abril de 2013(citada revista peruana de medicina experimental y salud publica. rev. Perú. med. exp. salud publica v.22 n.4 lima oct. /dic 2005). Se consigue en: URL:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s1726-46342005000400007&script=sci_arttext
- 78.Mori Álvarez L. *Leptospira sp.* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (publicación periódica en línea) 22 de Junio de 2013 (citada facultad de medicina veterinaria. 2009). Se consigue en: URL:
<http://www.docstoc.com/docs/155266561/diapositiva-1---universidad-nacional-mayor-de-san-marcos>

79. Adventur Elisa. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 1 de Julio de 2013 (citada dec 20, 2009 in articles, medical. Se consigue en: URL: <http://www.ar.co.za/2009/12/leptospirosis/>
80. Manual de Procedimientos Bacteriológico y Serológico para el Diagnóstico de la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 22 de junio de 2013 . Se consigue en: URL: http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1049_ins-nt34.pdf.
81. Programa de zoonosis del CENAVECE. ¿Qué lo orienta a pensar que es Leptospirosis? Secretaría de Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y control de enfermedades. (publicación periódica en línea) 06 de Marzo de 2013. (citada segunda edición. agosto, 2008. secretaria de salud). Se consigue en: URL: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/leptospirosis.pdf>
82. Álvarez Álvarez G. Mortalidad por Leptospirosis desde 1999 hasta 2006. (publicación periódica en línea) 20 de Marzo de 2013(citada Hospital Universitario Arnaldo Milián Castro. Villa Clara. Cuba 3/09/2007,enfermedades infecciosas , Medicina Tropical) .Se consigue en: URL: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/653/2/>
83. Hemstree George. Sistemas renal y urinario. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo.Publicacion periódica en línea) 21 de Marzo de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.insht.es/inshtweb/contenidos/documentacion/textosonline/enciclopediaoit/tomo1/8.pdf>
84. Shubhangi Kene. foto de archivo - 3d anatomía del riñón. (publicación periódica en línea) 19 de Marzo de 2013. Se consigue en: URL: http://es.123rf.com/photo_14631033_3d-anatomia-del-rinon.html
85. Franciscus A. Introducción sobre el hígado. (publicación periódica en línea) 25 de Junio de 2013 (citada hcsp • versión 4 (sp) • noviembre de 2012. hoja informativa hcsp). Se consigue en: URL: http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/sp_factsheets/el%20h%edgado.pdf
86. De Campbell y Reece. Biología. (publicación periódica en línea) 5 de Junio de 2013 (citada 03 mayo 2008). Se consigue en: URL: <http://www.vi.cl/foro/topic/8200-sistema-digestivo-apuntes/page-2>
87. Tortosa I Moreno A. Sistema Cardiovascular: Anatomía. (publicación periódica en línea) 5 de Mayo de 2013 (citada en Colegio Oficial Infermeri de Barcelona). Se consigue en: URL:

<http://www.infermeravirtual.com/files/media/file/100/sistema%20cardiovascular.pdf?1358605522>

- 88.El corazón humano. Características principales, aspectos y datos generales importantes. (publicación periódica en línea) 5 de mayo de 2013 (citada anatomía - fisiología – propiedades). Se consigue en: URL: <http://quemundo.info/index.php/l-anatomia-humana/85-el-corazon>
- 89.Santos Milanés H. Anatomía, fisiología y patología Respiratoria. (publicación periódica en línea) 6 de Mayo de 2013. Se consigue en : URL: <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion5/capitulo67/capitulo67.htm>
- 90.Dr. Greenlee J. Archivo de imágenes: Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 6 de Mayo de 2013 (citada crédito: iowa state university, college of veterinary medicine, department of veterinary pathology 2004-2013). Se consigue en: URL: <http://www.cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/disease-images.php?name=leptospirosis&lang=es>
- 91.Depto. de Anatomía. “Curso de Neuroanatomía”. Meninges, sistema ventricular e irrigación encefálica. (publicación periódica en línea) 7 de Mayo de 2013 (citada Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile). Se consigue en: URL: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/departamentos/anatomia/cursoenlinea/download/irriga.pdf>
- 92.Meninges y Líquido Cerebroespinal. (publicación periódica en línea) 8 de Mayo de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo1/neuro3morfo.html>
- 93.Resúmenes basados en: Harrison's Principles of Internal Medicines. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 5 de Agosto de 2013(citada 17th ed. Mc-Graw Hill Medical. enero 16 de 2010). Se consigue en: URL: <http://tomatetumedicina.wordpress.com/tag/litos/>.
- 94.Organización Panamericana de la Salud .Area de Vigilancia de la Salud y Prevención y Control de Enfermedades Reglamento Sanitario Internacional/alerta y respuesta y enfermedades epidémicas. Leptospirosis - Notas descriptivas. (publicación periódica en línea) 21 de Junio de 2013 (citada 12 de marzo de 2012).Se consigue en: URL: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7821&Itemid=39696&lang=es
- 95.Marcos Anglada. 21-05-2008 Apropol noticias. santa fe: internan a dos policías con posible contagio de leptospirosis. http://www.apropol.org.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=1298&Itemid=36

96. Huston J . Global Health, Local Knowledge. Leptospirosis outbreak follows flooding in Philippines. (publicación periódica en línea) 28 de Julio de 2013 (citada jan 4, 2012). Se consigue en: URL: <http://diseasedaily.com/leptospirosis-outbreak-follows-flooding-philippines>
97. Cárdenas R. Iquitos en emergencia: inundaciones provocan brote de Leptospirosis, que cobró su tercera víctima mortal. (publicación periódica en línea) 2 de Agosto de 2013 (citada 26 de Abril de 2012). Se consigue en: URL: <http://www.larepublica.pe/26-04-2012/iquitos-en-emergencia-inundaciones-provocan-brote-de-leptospirosis-que-cobro-su-tercera-victima-mort>
98. Céspedes Manuel. Evaluación de la Protección Inmunológica a partir de los Extractos antigénicos de *Leptospira licerasae* serovar *varillal*. (publicación periódica en línea) 22 de Mayo de 2013 (citada Laboratorio Nacional de zoonosis bacteriana, dirección ejecutiva de enfermedades transmisibles Centro Nacional de Salud Pública). Se consigue en: URL: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/zop/zona_evento_01/presetaci%c3%b3n%20leptospira.pdf
99. Rodríguez Bedoya. Proceso Vigilancia y Control en Salud Publica, Informe del evento Leptospirosis, hasta el séptimo periodo Epidemiológico del año 2013. (publicación periódica en línea) 6 de Agosto de 2013 (citada 2012 – sep – 05). Se consigue en: URL: http://ins.gov.co/lineas-de-accion/subdireccion-vigilancia/informe%20de%20evento%20epidemiologico/leptospirosis%20periodo%20vii%202013.pdf?mobile=1&source=%2flineas-de-accion%2fsubdireccion-vigilancia%2f_layouts%2fmobile%2fview%2easpx%3flist%3db631879e%252dd2b3%252d4cb8%252d835e%252d4377789a6121%26view%3d9e454483%252d4ace%252d4231%252da535%252dcba37147e923%26currentpage%3d1
100. Zúñiga Carrasco I. Panorama Epidemiológico de la Leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos 2000-2010. (publicación periódica en línea) 21 de Julio de 2013 (citada enf inf microbiol 2013 33 (2): 71-76). Se consigue en: URL: http://www.amimc.org.mx/revista/2013/33_2/panorama.pdf
101. SINAVE/DGE/salud 2013. Información preliminar: Incluye sólo casos confirmados. Vigilancia Epidemiológica semana 26, 2013. Casos por entidad federativa de enfermedades zoonóticas hasta la semana epidemiológica 25; rabia y fiebre del oeste del Nilo hasta la 26 del 2013. (publicación periódica en línea) 10 de Agosto de 2013. Se consigue en: URL: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem26/pdf/cua8.pdf>

102. Aguirre L. Dirección de Epidemiología y Análisis estratégico. Leptospirosis en la Salud Pública. (publicación periódica en línea) 10 de Mayo de 2013(citada 16 junio de 2005). Se consigue en: URL: http://redesastre.inia.gob.ve/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=113&itemid=28.
103. López E. Leptospirosis se extiende. (publicación periódica en línea) 30 de Julio de 2013 (citada grupo editorial la Prensa. Managua, 15 de octubre, 2010) Se consigue en: URL: <http://www.laprensa.com.ni/2010/10/15/nacionales/40761-leptospirosis-se-extiende>
104. Instituto de Patobiología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (publicación periódica en línea) 20 de Mayo de 2013 (citada 2002. cnia inta. (c.p.1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina) Se consigue en: URL: <http://cnia.inta.gov.ar/patobiologia/images/lepto2.htm>
105. Agudelo Flórez P. Imágenes en Biomedicina. Diagnóstico de Leptospirosis de Muestras de sangre y cultivo por observación en Microscopio de campo oscuro. (publicación periódica en línea) 28 de Junio de 2013(citada Biomédica 2008; 28:7-9, Universidad CES, Sabaneta, Antioquia). Se consigue en: URL: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/103/488>
106. Brihuela. Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 13 de Julio de 2013 Mv.laboratorio de Leptospirosis. Instituto de Patobiología. INTA Castela. Se consigue en: URL: http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/lepto/leptovb.htm
107. Velasco C.O. Leptospirosis crónica en México: diagnóstico microscópico y evidencias que respaldan su existencia e importancia. (publicación periódica en línea) 17 de Mayo de 2013 (citada rev mex patol clin, vol. 56, núm. 3, pp 157-167 • julio - septiembre, 2009). Se consigue en: URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2009/pt093a.pdf>
108. Velasco C.O. Daño miocárdico grave por Leptospirosis: informe de un caso fatal en México. (publicación periódica en línea) 22 de Julio de 2013(citada marzo de 2009. arch cardiol mex 2009; 79(4):268-273). Se consigue en: URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1405-99402009000400008&script=sci_arttext
109. Cárdenas Marrufo M. Manual de técnicas de Diagnosticas especializadas. Universidad autónoma de Yucatán. (publicación periódica en línea) 01 de Junio de 2013 (citada m-fmed-leip-03, 30 de marzo de 2010). Se consigue en: URL:

<http://www.medicina.uady.mx/principal/sgc2011/pdf/formatos/leip/proc3/m-fmed-leip-03.pdf>.

110. Club de informática Médica y telemedicina (universidad de panamá): Prueba de catalasa: distinguir staphylococcus de streptococcus. (publicada en línea) 2 de Mayo de 2013 (citada telmeds.org 21 de aug de 2013). Se consigue en: URL: <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/cocos-gram-positivos-piogenos-de-importancia-medica/prueba-de-catalasa-distinguir-staphylococcus-de-streptococcus/>
111. Rapidtest.com .Diagnostic test kits images : ELISA-picture parasitology antibody kits leptospira-IgM kit. Se consigue en: URL: <http://www.rapidtest.com/picture/elisa-picture/parasitology%20antibody%20kits/leptospira-igm+kit.jpg.php>
112. *Leptospira bovina hardjo*. (publicación periódica en línea) 5 de Agosto de 2013 (citada ELISA. 1999-2013 alibaba.com, inc. o afiliados. Reino Unido). Se consigue en: URL: <http://spanish.alibaba.com/product-free/bovine-leptospira-hardjo-elisa-133286433.html>
113. Prueba rápida de Leptorapide para la leptospirosis humana. Tipo: equipos patológicos del análisis.(publicación periódica en línea) 6 de Agosto de 2013 (citada Reino Unido. 2013).Se consigue en: URL: <http://spanish.alibaba.com/product-free/leptorapide-rapid-test-for-human-leptospirosis-108128169.html>
114. Tamargo B. Protección inducida por nanococleatos derivados de Proteoliposomas de *Leptospira interrogans serovar canicola*. (publicación periódica en línea) 10 de Julio de 2013 (citada vaccimonitor 2012; 21(1):3-9). Se consigue en: URL: http://www.researchgate.net/publication/230554276_proteccin_inducida_por_nanococleatos_derivados_de_proteoliposomas_de_leptospira_interrogans_servar_cancola
115. Menéndez J. Vax-spiral: vacuna cubana contra la Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 28 de Julio de 2013 (citada Red Latinoamericana de información científico técnico en vacunas, 08/2013. (Se consigue en: URL: <http://www.bvv.sld.cu/search/?pg=gv&id=579&t=coolnews>
116. Valverde Jiménez M. Centro nacional de referencia de Leptospirosis. (publicación periódica en línea) 5 de Agosto de 2013 (citada INCIENSA. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en nutrición y Salud.03/10/2012). Se consigue en: URL: http://www.inciensa.sa.cr/inciensa/centros_referencia/leptospirosis.aspx

117. García del valle A. y QFB. Zamudio Duran M. Manual de biología Médica: 9 semestre. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1998. p. 118 y 150.
118. Cajal R. Centro de Genómica y Proteómica: Unidad de Proteómica. (publicación periódica en línea) 2 de Agosto de 2013 (citada Facultad de farmacia – UCM, Madrid) Se consigue en: URL: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/gyp/proteomica/formularios/platatinacion.pdf>