

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

Aspectos biológicos de importancia clínica del género

***Leptospira* y pruebas de laboratorio tradicional y**

molecular

TESIS TEÓRICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta

Cynthia Isaura Cuevas Pacheco

CONTENIDO

Índice	Página
ADRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II .OBJETIVOS	3
III. ANTECEDENTES	4
IV. <i>Leptospira</i>	6
4.1 Clasificación	6
4.1.1 Serovariedades	8
4.1.2 Clasificación genotípica	8
4.2 Aspectos biológicos	9
4.3 Cepas de interés clínico	14
V. EPIDEMIOLOGÍA	16
5.1 <i>Leptospira</i> en México como problema de Salud Pública	21
VI. PATOGENIA	26
6.1 Síndrome de Weil	30
VII. PRESENTACIÓN CLÍNICA	31
7.1 Patogénesis	31
7.1.1 Producción de toxinas	32
7.1.2 Adherencia	33
VIII. INMUNOLOGÍA	34
IX. PREVENCIÓN E INTERVENCIÓN	36
X. NORMATIVAS QUE PROPONEN Y REGULAN LA DETECCIÓN DE <i>Leptospira</i>	39
10.1 NOM	39

10.2 OMS	42
10.3 CDC	43
XI. MÉTODOS DE DETECCIÓN	45
11.1 Técnicas bacteriológicas o directas	45
11.1.1 Microscopia de campo oscuro	46
11.1.2 Cultivo	50
11.2 Técnicas serológicas	51
11.2.1 Prueba de aglutinación microscópica (MAT)	51
11.2.2 ELISA indirecto IgM	59
11.3 Técnicas moleculares	64
11.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
XII. CONCLUSIÓN	72
XIII. REFERENCIAS	73
XIV. ANEXOS	92
Anexo A. Seguridad en el laboratorio	93
Anexo B. Algoritmos	96

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por permitirme terminar una meta más en mi vida y por todas las bendiciones que me ha dado.

A MIS PADRES Eugenia y Rodolfo, por darme su apoyo y amor incondicional.

A MI ABUELITA por estar pendiente de mí siempre, por sus enseñanzas y su amor.

A MI HIJA que con su amor ilumina mi vida.

A MI PAREJA por apoyarme y estar presente en mi vida.

A MI FAMILIA que me ha apoyado en todo momento.

A mis asesores:

Q.B Rafael de la Rosa López por sus enseñanzas, consejos y asesoría proveídos de manera desinteresada.

M. C Ramón Efraín Lugo Sepúlveda por su asesoría ofrecida para la elaboración de este trabajo, por sus consejos y su valiosa ayuda.

M. C María del Carmen García Moraga por los consejos y asesorías desinteresados.

INDICE DE FIGURAS

Figura		Paginas
1	Microscopía electrónica de barrido de <i>L. interrogans</i>	10
2	Modelo de arquitectura de membrana de <i>Leptospira</i>	13
3	Epidemiología de la leptospirosis	17
4	Incidencia de leptospirosis en México en el año 2008	23
5	Exantema pretibial	28
6	Inyección conjuntival	29
7	Tinción de Warthin Starry mostrando a <i>Leptospira</i> en las células tubulares del riñón	47
8	Reacciones de la prueba de Microaglutinación Microscópica	56
9	Esquema que representa el proceso de reacción en cadena de la polimerasa	67

INDICE DE TABLAS

Tabla		Paginas
1	Clasificación de <i>Leptospira</i>	7
2	Reservorios típicos y serovares de <i>Leptospira</i> encontrados	15
3	Casos por entidad federativa de Enfermedades Zoonóticas	25
4	Ventajas y desventajas de la microscopía de campo oscuro	49
5	Serovares de referencia usados como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica (MAT)	53
6	Sensibilidad y Especificidad de Bajani y cols.	58
7	Ventajas y desventajas de ELISA en comparación con la MAT	63
8	Ventajas y desventajas de PCR	71

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de distribución mundial que afecta a diferentes especies de animales salvajes y domésticos, el hombre se infecta ocasionalmente y sufre una enfermedad sistémica, febril y aguda causada por espiroquetas del género *Leptospira* especie *interrogans*, esta se adquiere al entrar en contacto con el suelo o agua contaminada con orina de animales infectados.

La epidemiología de esta zoonosis está determinada por factores ecológicos tales como el clima y la naturaleza de los reservorios, los estudios realizados en México se enfocan a la parte sur de este país debido a las condiciones climáticas, encontrándose una incidencia significativa.

Desde 1994 entró en vigencia la Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999 que establece las medidas preventivas, control y vigilancia epidemiológica de la leptospirosis en humano, a su vez también existen normas internacionales para el control de la misma.

Este trabajo incluye una revisión bibliográfica sobre los métodos utilizados para el diagnóstico de leptospirosis. Los métodos tradicionalmente utilizados para el diagnóstico de leptospirosis son: cultivo, microscopía de campo oscuro, prueba

de aglutinación microscópica, prueba de ELISA, así como el uso de técnicas moleculares como PCR.

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de distribución mundial que afecta a diversas especies de animales salvajes y domésticos,¹ ocasionalmente afecta al hombre en el que puede producir un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde un cuadro clínico inespecífico y banal, hasta graves procesos con fracaso multiorgánico,² esta zoonosis puede ser causada por cualquiera de los 250 serovares de las especies de *Leptospira*, diversos autores han catalogado a esta enfermedad como un problema de salud pública reemergente.

La infección en los seres humanos ocurre directamente a través del contacto de las mucosas con orina de animales infectados o indirectamente a través del contacto con agua o suelos contaminados.³

En el año de 1999 entra en vigor la Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en humano. También se cuenta con una guía proporcionada por la OMS para el diagnóstico, vigilancia y control de dicha enfermedad.

El diagnóstico de la leptospirosis comprende el diagnóstico clínico, bacteriológico, serológico y molecular.

Los estudios bacteriológicos identifican al organismo por métodos directos, mediante la observación en microscopio de campo oscuro, coloración argénticas, aislamiento del agente en cultivos especiales, inoculación en animales de laboratorio.⁴

Existen métodos de laboratorio que permiten el diagnóstico serológico de la enfermedad. La prueba de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la Microaglutinación microscópica (MAT), utilizando antígenos vivos, que se emplea para detectar anticuerpos anti-*Leptospira* en suero.⁵ La técnica de ELISA también es utilizada para la detección de anticuerpos.

En la actualidad se cuentan con técnicas moleculares novedosas como PCR la cual sirve para el diagnóstico de leptospirosis en la fase temprana de la misma,⁶ también es útil para identificar al agente en material contaminado o de difícil aislamiento.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Conocer los aspectos biológicos de interés del género *Leptospira* y las metodologías actuales para el diagnóstico del laboratorio.

Objetivos específicos:

- Conocer los métodos de laboratorio actualmente utilizados en nuestro país para el diagnóstico de leptospirosis.
- Proporcionar información epidemiológica de leptospirosis en México.
- Describir los puntos más relevantes de las normas nacionales e internacionales encargadas del control y vigilancia de Leptospirosis.

III. ANTECEDENTES

Los primeros en describir la leptospirosis aun sin conocer el agente fueron Louis Landouzy en 1883; tres años más tarde Adolf Weil observó en trabajadores agrícolas de Alemania, fiebre, ictericia, hemorragia, insuficiencia hepática y renal y posteriormente en 1888 se le llamó enfermedad de Weil en honor a tan destacado investigador, quien la caracterizó como una enfermedad grave de alta mortalidad.⁷

En 1915, Inada e Ido científicos japoneses identificaron que el agente etiológico pertenece al grupo de las espiroquetas. Dos años después Noguchi aisló el agente en su propio medio y propuso que se le considerara como un nuevo género, denominado *Leptospira*.⁸

Wood en 1947 señaló que en EUA se había encontrado el agente en las excretas del más del 10% de las ratas grises rurales y urbanas examinadas, menciona que el primer caso comprobado se reportó en los EUA en 1922 y que hasta 1946 se había registrado la enfermedad en 46 países.⁹

Márquez, Soler y Curbelo en 1945 realizaron la primera confirmación de leptospirosis en Cuba mediante el método serológico y microbiológico,¹⁰ mientras que en la República Mexicana los primeros trabajos sobre leptospirosis fueron realizados en Yucatán por Noguchi en 1920 cuando la

enfermedad era confundida con la fiebre amarilla.¹¹ Entre 1920 y 1925, Pérez Grovas y Le Blanc reportaron casos de leptospirosis en el puerto de Veracruz.¹²

Varela *et al* en 1958, continuó con los estudios, demostrando anticuerpos contra *Leptospira* en humanos y animales de la ciudad de México y nuevamente en 1961 Varela y Zavala estudiaron 9,931 sueros humanos y animales.¹³

En Yucatán en 1962, se reinicia el interés por esta enfermedad con el reporte de Varela y Zavala de 10,7% de seropositividad a leptospirosis, en su mayoría a la serovariedad *pomona*, en 56 pacientes con ictericia.¹⁴

Las primeras informaciones que se tienen de esta enfermedad en los animales procedían de la leptospirosis humana y datan de 1852 en que Hofer describió una enfermedad de los perros antes desconocida que llamó Tyfus Seu Febris Nervosa Canum. Posteriormente se realizó la primera descripción de las *Leptospiras* como agentes productores de enfermedad en los animales en 1933 cuando Klarenbeck y Shuffner demostraron que *Leptospira canicola* era el agente etiológico de dicha enfermedad.¹⁵

IV. *Leptospira*

4.1 Clasificación

Esta espiroqueta pertenece al orden de los *Spirochaetales* que incluye dos familias: *Spirochaetaceae* y *Leptospiraceae*. La familia *Leptospiraceae* posee un único género, *Leptospira*, el cual incluye dos especies *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa*.

Otra clasificación de *Leptospira* se basa en la serotipificación y tipificación basada en ADN o genotipificación. Actualmente se conocen más de 200 serovariedades de *Leptospira interrogans* (Ver tabla 1).¹⁶

Tabla 1. Clasificación de *Leptospira*

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa de referencia
<i>Leptospiras patógenas</i>			
	<i>Australis</i>	Australis	Ballico
	<i>Australis</i>	Bratislava	Jez Bratislava
	<i>Bataviae</i>	Bataviae	Van Tienen
	<i>Canicola</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni	M 20
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Lai	Lai
	<i>Pomona</i>	Pomona	Pomona
	<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes	Salinem
	<i>Sejroe</i>	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. alexanderi</i>	<i>Manhao</i>	Manhao3	L 60
<i>L. fainei</i>	<i>Hurstbridge</i>	Hurstbridge	BUT 6
<i>L. inadai</i>	<i>Lyme</i>	Lyme	10
	<i>Autumnalis</i>	Bim	1051
	<i>Cynopteri</i>	Cynopteri	3522 C
<i>L. kirschneri*</i>	<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa	Moskva V
	<i>Pomona</i>	Mozdok	5621
<i>L. meyeri</i>	<i>Semarang</i>	Semarang	Velrad Semarang 173
	<i>Ballum</i>	Ballum	Mus 127
	<i>Ballum</i>	Castellonis	Castellon 3
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Javanica</i>	Javanica	Veldrat Bat 46
	<i>Sejroe</i>	Sejroe	M 84
	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi	Perepicilin
<i>L. weillii</i>	<i>Celledoni</i>	Celledoni	Celledoni
<i>L. noguchii</i>	<i>Autumnalis</i>	Fortbragg	Fort Bragg
	<i>Panama</i>	Panama	CZ 214 K
<i>L. santarosai</i>	<i>Bataviae</i>	Brasiliensis	An 776
	<i>Mini</i>	Georgia	LT 117
<i>Genomospecies 1</i>	<i>Ranarum</i>	Pingchang	80- 412
<i>Genomospecies 4</i>	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Hualin	LT 11 -33
<i>Genomospecies 5</i>	<i>Semarang</i>	Saopaulo	Saopaulo
<i>Leptospiras saprófitas</i>			
<i>Genomospecies 3</i>	<i>Holland</i>	Holland	Waz Holland (P438)
<i>L. biflexa</i>	<i>Semarang</i>	Patoc	Patoc I
<i>L. wolbachii</i>	<i>Codice</i>	Codice	CDC

Fuente: **Céspedes Z. Manuel.** 2005. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública,

4.1.1 Serovariedades

Debido a la diversidad de leptospiras, hay dos grandes métodos de clasificación de ellos. Pequeñas variaciones en las cadenas polisacáridicas del lipopolisacárido de este microorganismo determina la existencia de más de 200 serovares patógenas agrupadas en 24 serogrupos, o bien lo que significa que, debido a su estructura antigénica se pueden dividir en serotipos y especies, esta primera se determina mediante la prueba de absorción de aglutinación cruzada (CAAT) que define las similitudes y diferencias antigénicas.¹⁷

4.1.2 Clasificación genotípica

La clasificación fenotípica de *leptospiras* se ha remplazado por un genotipo, en el que un número de genomoespecies incluye todos los serovares de ambos, *L. interrogans* y *L. biflexa*. Está basado en la homología del ADN y está dividido en 17 especies; definido en 70% de homología y 5% de divergencia en el ADN, el avance en la biología molecular ha permitido también secuenciar su genoma que consiste de dos cromosomas circulares.^{18,19}

4.2 Aspectos biológicos

Las leptospiras son espiroquetas delgadas y enroscadas, flexibles de 6 a 20 μ m por 0.1 μ m de diámetro. Presenta en uno o ambos extremos una curvatura en forma de gancho, tiene una gran movilidad que le viene dada por un axostilo, el cual está formado por dos filamentos axiales insertados en un disco o protuberancia al final del cuerpo citoplasmático y cuyo extremo libre está unido a la región media de la bacteria, estas características se observan en microscopio electrónico (Figura1).²⁰

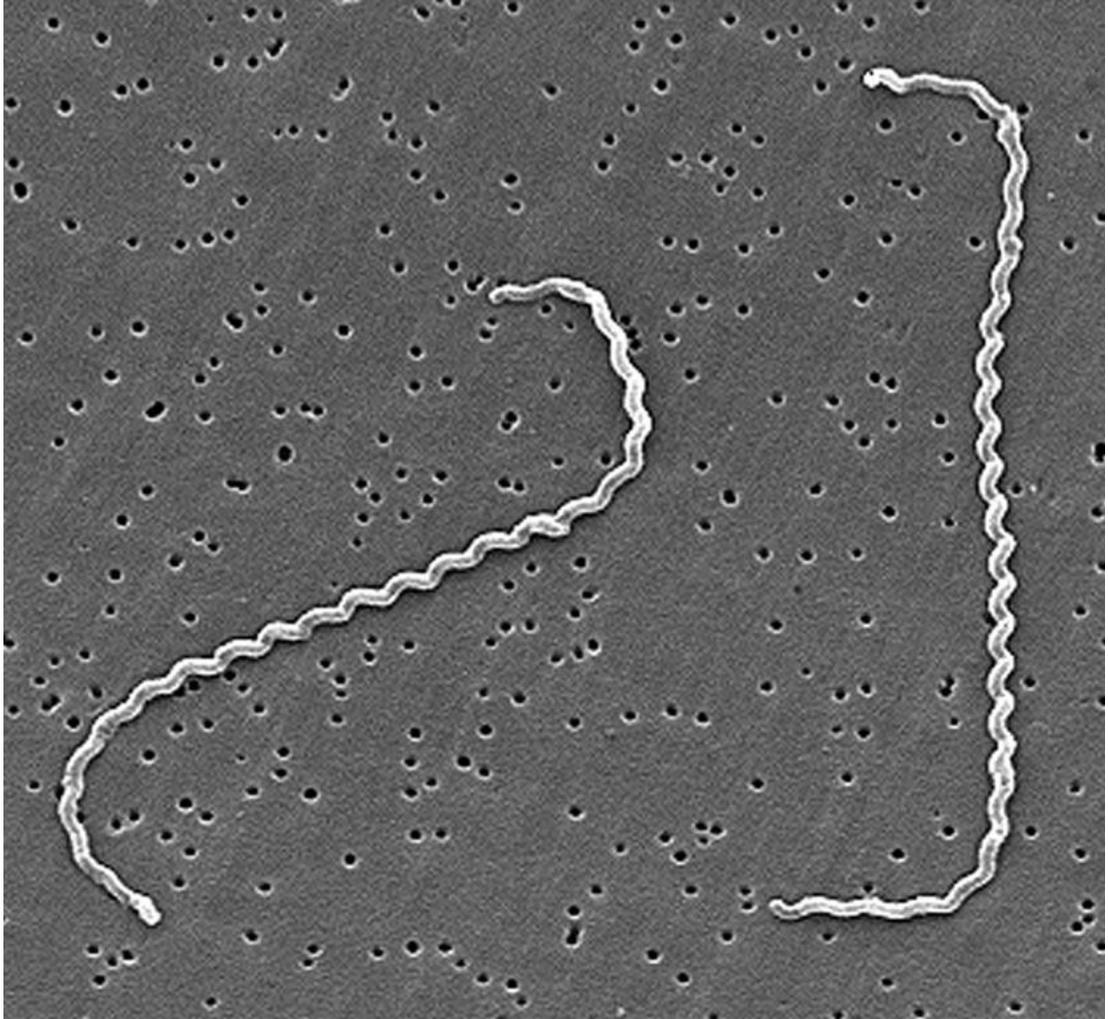


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae ,

FUENTE: Levett PN.2001. Clin Microbiol Rev , Vol.14, No. 2.

Leptospiras presentan dos formas distintas de movimiento, transicional y no transicional. Son microorganismos aerobios obligados, catalasa y oxidasa positiva, con un crecimiento óptimo a temperaturas de 28 a 30°C, para su cultivo necesitan medios con un pH de 7,2 a 7,4 con suero de conejo o albúmina bovina como el Stuart, EMJH (*Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris medium*) Korthoff, los cuales pueden estar enriquecidos con vitaminas B₁₂, B₂, ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio, se tiñen débilmente con colorantes de anilina.

Leptospira se caracteriza por su habilidad de β -oxidación de cadenas largas de ácidos grasos como mayor fuente de energía (ATP), aunque también tiene sus excepciones son incapaces de sintetizar ácidos grasos de novo,²¹ además de ser incapaz de utilizar azúcares como fuente de carbono pese a que ha sido demostrada la presencia de todos los genes de todos los sistemas enzimáticos necesarios para la vía glicolítica.²²

A su vez se ha reconocido que esta espiroqueta es capaz de sintetizar todos los aminoácidos esenciales a partir de una fuente inorgánica de nitrógeno como las sales de amonio,²³ esto es posible ya que cuenta con todos los genes de todos los sistemas enzimáticos implicados en la biosíntesis de los aminoácidos.²⁴

Leptospira posee una gran variedad de transportadores de membrana específicos para el transporte de aminoácidos libre, dipéptidos, y péptidos de bajo peso molecular.²⁵

Leptospira tiene una doble membrana, estructura en común con otras espiroquetas, en el que la membrana citoplasmática y el peptidoglicano están estrechamente relacionados y están cubiertos por una membrana exterior,²⁶ posee un lipopolisacárido similar al de otras bacterias Gram-negativas pero es de menos actividad endotóxica (Figura 2).²⁷ Además la actividad citotóxica de fosfolipasa, lipasa y hemolisinas juegan un papel importante en la patogenicidad bacteriana.²⁸

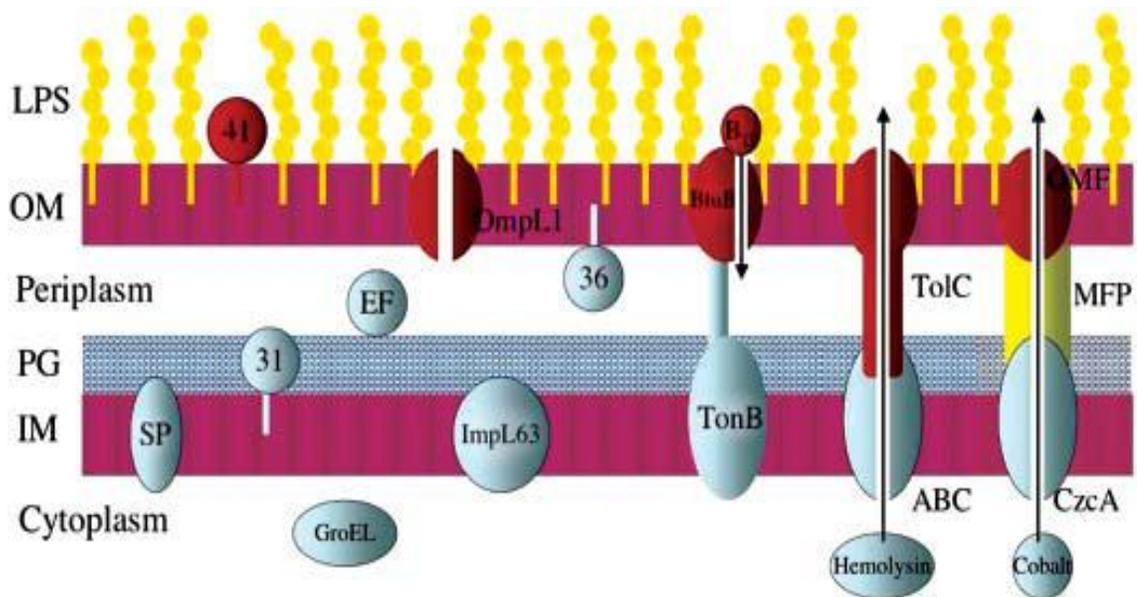


Figura 2. Modelo arquitectura de membrana de *Leptospira*. *Leptospira* tiene dos membranas una externa (OM) y una membrana citoplasmática o interna (IM). Al igual que en bacterias Gram-positivas el peptidoglicano (PG) de la pared celular está estrechamente relacionado con la IM. La superficie de *Leptospira* está dominada por lipopolisacáridos (LPS), cadenas de carbohidratos. Solo unas pocas proteínas de *Leptospira* se han caracterizado en detalle incluyendo una porina OmpL1, y dos lipoproteínas LipL36 y LipL41.

FUENTE: Nascimento A.L.T.O, Verjovski-Almeida S, et al. 2004. Brazilian Journal of Medical and Biological Reserch. Vol.37.

4.3 Cepas de interés Clínico

Como se ha mencionado anteriormente *L. interrogans* y sus serovares son patógenas para el ser humano y animales, siendo *L. biflexa* de vida libre o saprófita, los serotipos más comunes encontrados en la infección humana son: *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*, *pyogenes*, *autumnales*, *ballum*, *bataviae*, *grippotyphosa*, *australis*, *hyos*, *minigeorgia*, *hebdomadis*, y *hardjo*, esta última principalmente en personas que están en contacto con ganado infectado, el serovar asociado al síndrome de Weil es *icterohaemorrhagiae*.^{29,30}

En la Tabla 2 se muestran los reservorios típicos y serovares de *Leptospira*.

Tabla 2: Reservorios típicos y serovares de *Leptospira* encontrados.

Reservorio	Serovar(s)
Cerdo	Pomona, Tarassovi
Vacuno	Hardjo, Pomona, Grippotyphosa
Caballo	Bratislava
Perro	Canicola
Oveja	Hardjo
Rata	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Raton	Ballum, Arborea, Bim
Marsupiales	Grippotyphosa
Murcielago	Cynopteri, Wolffi

Fuente: **Céspedes Z. Manuel.** 2005. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.

V. EPIDEMIOLOGÍA

La leptospirosis es una zoonosis de distribución global, que afecta tanto a animales como al hombre, este último de manera accidental, se conoce que el reservorio más importante son los roedores, cabe destacar que las condiciones ambientales y las prácticas de manejo de los animales influyen de una manera muy marcada en la dinámica de la infección (Ver figura 3). La infección no solo representa un problema con implicaciones epidemiológicas sino también económicas y sociales. Es más frecuente en regiones tropicales, donde la transmisión está favorecida, tanto por las características climáticas, como por las malas condiciones higiénicas, ciertos grupos ocupacionales se encuentran en riesgo de adquirir esta enfermedad, principalmente, agricultores, trabajadores de alcantarillas y veterinarios entre otros.^{31,32,33,34}

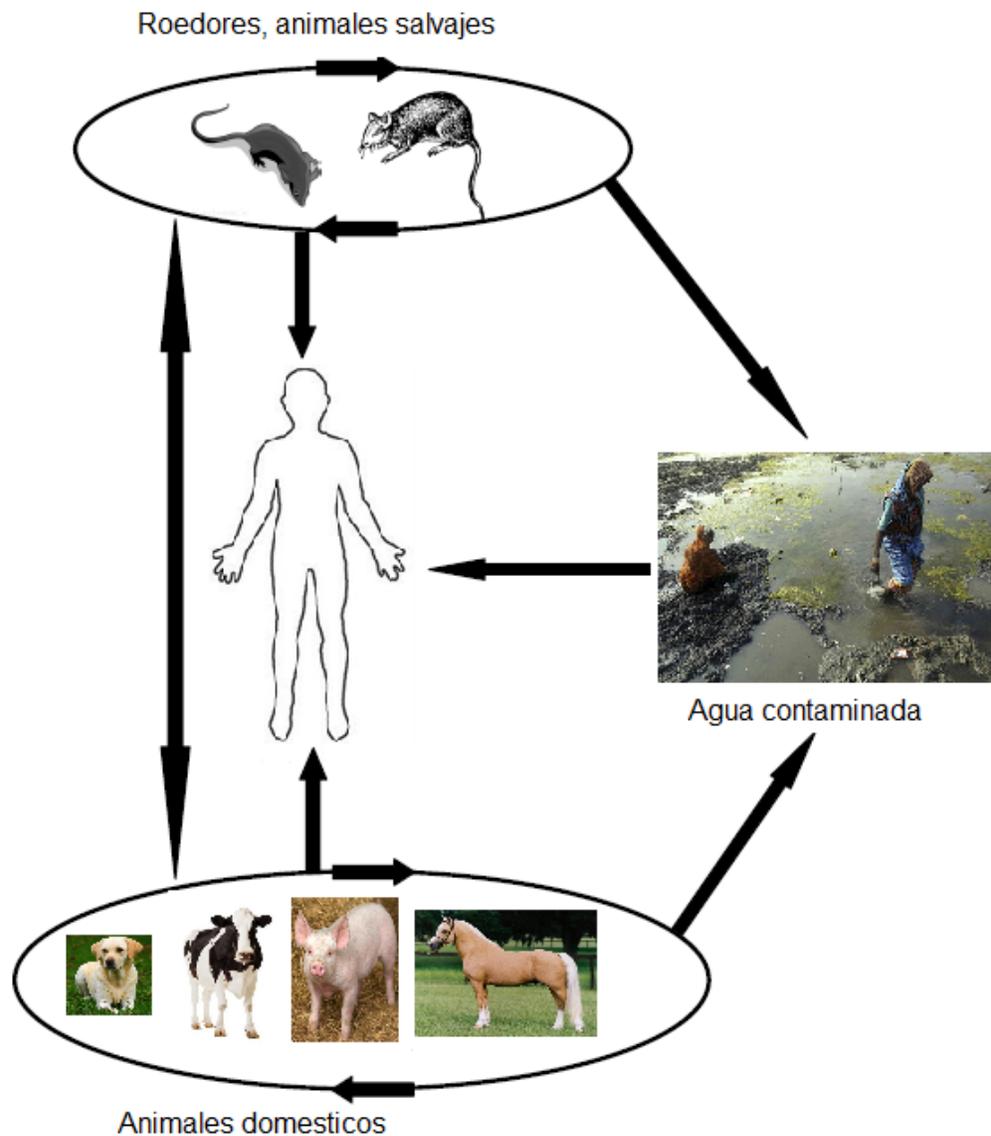


Figura 3. Epidemiología de la leptospirosis. Animales portadores, animales domésticos forman parte del ciclo de leptospiras en la población. Las leptospiras pueden luego ser transmitidas a los humanos por contacto directo con la orina infectada o indirectamente a través de suelo o agua contaminados, especialmente en los tiempos de inundación.

FUENTE: Vijayachari P, Sugunan A P and Shiram A . 2008 .Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal Biosci. Vol. 33.

Actualmente el número de casos humanos que ocurren en todo el mundo no es conocido con precisión. Según la OMS con los reportes disponibles, la incidencia anual varía dentro de un rango desde aproximadamente 0.1-1 por 100.000 casos por habitantes 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 100.000.³⁵

En la actualidad los datos disponibles sugieren que la leptospirosis es el problema de salud pública más frecuente a nivel mundial. Aunque la enfermedad es endémica en las zonas rurales de todo el mundo, la transmisión continúa en los países desarrollados por ejemplo en Estados Unidos, especialmente en Hawaii, pero también en Irlanda, Alemania entre otros.³⁶ Alemania presenta ≈50 casos anualmente en su mayoría relacionados con exposición recreativa y residencial.³⁷

Europa, pese a ser un continente con gran desarrollo económico, no ha escapado a la presencia de leptospirosis. Los estudios de prevalencia de leptospirosis en Europa oscilan en 8% en poblaciones asintomáticas no expuestas y 18% en las expuestas.³⁸

Países del continente asiático también se ven afectados siendo India, Filipinas, Malasia, Japón y China los más afectados. Un estudio multicéntrico en la India

puso de manifiesto que el 12.7% de los casos graves de leptospirosis en etapa febril es atendido en hospitales, a su vez Filipinas se encuentra en serios problemas por causa de esta infección ya que el saneamiento deficiente y los constantes tifones en esta área hace que sea más susceptible, en el periodo de 1998 al 2001 se realizó un estudio serológico donde el 70% de los pacientes sospechosos de leptospirosis resultaron positivos. En Japón la situación no es tan inquietante como en Filipinas ya que solo se registra 20 casos anualmente.^{39, 40} En Taiwán los datos notificados de leptospirosis, han sido investigados por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) desde el 2001, durante el 2001-2006 se reportó una incidencia de 0.022-0.028 casos/100, 000 habitantes.⁴¹

En Continente Americano el país con más casos de leptospirosis es Brasil dado a las condiciones climáticas del mismo siendo la sexta causa de muerte entre las enfermedades infecciosas notificadas con una fatalidad que va desde 11-18% en el periodo de 2004-2006.⁴² En un estudio realizado por Johnson *et al* en el 2004 para determinar la prevalencia de anticuerpos en habitantes de la ciudad de Belén en Perú arrojó que el 28% tenía un nivel elevado de anticuerpos.⁴³

En Colombia en el 2008 se presentó un mayor número de casos que en años anteriores por lo que se le consideró a leptospirosis como una epidemia.⁴⁴

En muchos de estos países en la actualidad y debido al aumento de número de casos se ha puesto en marcha normas para el control y vigilancia de la misma pero por desgracia en otros tantos ni siquiera se notifica y por lo tanto no hay un control de la misma.

5.1 *Leptospira* en México como problema de salud pública

Los casos de leptospirosis en México, se notificaron por primera vez en el estado de Yucatán en 1920 por Noguchi y Klieger, seguido por el descubrimiento de casos humanos en el estado de Veracruz por Bustamante en 1937,⁴⁵ a partir de esa fecha se presentaron reportes aislados, en su mayoría de corte seroepidemiológico⁴⁶ como el que reporta Colín Ortiz *et al* en 10 estudios serológicos realizados en Yucatán, Valle de México y el D.F donde encontró un promedio de 14.4% de positividad en 9,875 sueros estudiados de 1961 a 1995.

Se reinicia el interés por esta enfermedad en el año de 1962 en Yucatán, con el reporte de Varela y Zavala de seis casos positivos a leptospirosis en 56 pacientes con ictericia.⁴⁷ Posteriormente en el año de 1984 Zavala *et al* realizaron otra investigación seroepidemiológica en el mismo estado en 705 sueros obtenidos en el Municipio de Mérida; la prevalencia global fue del 14%, sin embargo en el medio rural era del 19% contra el 8% en la zona urbana, también se estudiaron 1,123 sueros de bovinos dando una positividad de 8.8% y 334 porcinos con positividad de 6.4% predominando los serotipos *pomona icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *gryppotiphosa*.⁴⁸

En 1994 Zavala *et al* aprovechando un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán demostraron la posibilidad de confusión entre

leptospirosis y dengue dando como resultado el 14% de los sueros observados positivo a *Leptospira*.⁹ En el periodo de 1998 al 2000 Vado-Solis *et al* analizaron 439 sueros de pacientes procedentes de 44 municipios del estado de Yucatán los cuales presentaban una sintomatología presuntiva a leptospirosis, se obtuvo una positividad del 13.9%.¹³

Colín *et al* en el 2004 estudió la seroprevalencia a *Leptospira* en trabajadores de un rastro y trabajadores de alcantarillado en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, en trabajadores de agua potable y alcantarillado reportó una seroprevalencia de 36.1% y en trabajadores del rastro fue de 24.7%.⁴⁹

En el 2006 Benavides *et al* realizó un estudio para detectar los niveles de anticuerpos anti *Leptospira* en personas aparentemente sanas de la ciudad de México, resultando que el 16.9% de las personas tuvieron seropositividad anti *Leptospira*.⁵⁰ Ese mismo año en el municipio de Jáltipan, Veracruz, Navarrete *et al* efectuó un estudio de prevalencia de anticuerpos contra dengue y *Leptospira* simultáneamente el cual reportó que había una seroprevalencia del 4%.⁵¹ La figura 4 presenta la incidencia de leptospirosis en México en el año 2008.

En la República Mexicana la leptospirosis animal es de notificación obligatoria y la principal medida de control y prevención es la vacunación.⁵²



Figura 4. Incidencia de leptospirosis en México en el año 2008.

FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.

En México la leptospirosis constituye un problema de salud pública sin embargo las investigaciones al respecto son muy pocas. Debido a que ciertos estados de la República se consideran zonas endémicas de esta infección hay un departamento en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) dedicado al diagnóstico de leptospirosis, mismo que semana a semana lleva un control respecto a los casos presentados por entidad federativa (Tabla 3).

Tabla 3. Casos por entidad federativa de Enfermedades Zoonóticas hasta la semana epidemiológica 39 del 2009

ENTIDAD FEDERATIVA	LEPTOSPIROSIS CIE-10ª REV. A27			
	2009			2008
	SEMANA	ACUMULADO		ACUMULADO
		M	F	
Aguascalientes	-	-	-	-
Baja California	-	-	-	-
Baja California Sur	-	-	-	-
Campeche	-	-	-	-
Coahuila	-	1	-	-
Colima	-	-	1	-
Chiapas	-	31	20	18
Chihuahua	-	-	-	1
Distrito Federal	-	-	-	2
Durango	-	-	-	-
Guanajuato	-	-	-	-
Guerrero	-	12	9	8
Hidalgo	-	1	1	4
Jalisco	1	2	-	-
México	-	1	-	3
Michoacán	-	-	-	-
Morelos	-	2	1	-
Nayarit	-	-	-	-
Nuevo León	-	-	-	-
Oaxaca	-	-	4	3
Puebla	-	1	1	3
Querétaro	-	-	-	-
Quintana Roo	-	3	-	2
San Luis Potosí	-	-	-	-
Sinaloa	1	11	4	14
Sonora	3	7	15	1
Tabasco	-	3	4	7
Tamaulipas	-	-	-	1
Tlaxcala	-	-	-	2
Veracruz	-	9	6	13
Yucatán	-	-	2	-
Zacatecas	-	-	-	-
Total	5	84	68	82

FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. *Información preliminar*. Procesó: DGE.

VI. PATOGENIA

Los roedores constituyen la fuente más frecuente de infección y la misma se produce en el humano de forma accidental por contacto con animales infectados, aguas estancadas o terrenos húmedos contaminados por la orina del reservorio.⁵³ Su supervivencia depende de algunos factores como el pH de la orina del hospedero, el pH del suelo o el agua donde son eliminadas y de la temperatura ambiente.⁵⁴ Las leptospiras pueden penetrar a través de erosiones en la piel y las membranas mucosas intactas como la conjuntiva o el epitelio nasofaríngeo y genital.⁵⁵

La infección humana puede adquirirse a través de actividades profesionales, recreativas o exposiciones involuntarias.⁵⁶ Para entender mejor la transmisión de la leptospirosis Faine *et al* propone tres modelos epidemiológico; 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 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. El tercer modelo se da cuando la infección en los roedores es llevada al ambiente urbano.⁵⁷

Después de la penetración por la piel la *Leptospira* patógena invade la corriente sanguínea y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el Sistema Nervioso

Central, pero sobretodo al pulmón e hígado,⁵⁸ el periodo de incubación generalmente es de 3 a 14 días.⁵⁹ Una vez que el organismo tuvo acceso a pulmón, este migra al intersticio, túbulos renales y lumen tubular causando nefritis intersticial y necrosis tubular.⁶⁰ Cuando la insuficiencia renal se desarrolla, normalmente debido al daño tubular, por hipovolemia secundaria por la deshidratación y a la permeabilidad capilar alterada que también puede contribuir a la insuficiencia renal. El hígado se ve comprometido con el desarrollo de necrosis centrolobulillar con proliferación de las células Kupffer, la ictericia puede ocurrir como resultado de un trastorno hepatocelular.⁶¹

Las descripciones clásicas de la leptospirosis incluyen dos fases: una fase septicémica o leptospirémica donde el organismo se puede aislar de hemocultivos, LCR y otros tejidos, dura aproximadamente una semana, por lo general se caracteriza por fiebre con inicio súbito, escalofríos, mialgia severa, anorexia, exantema (Figura 5), inyección conjuntival (Figura 6), náuseas, vómitos y postración. Después de 3-4 días de relativa mejora la enfermedad puede aparecer en la denominada fase inmune, cuando las leptospiras no pueden ser aisladas en sangre y el antibiótico ya no parece ser útil. Muchos casos de leptospirosis no se ajustan a esta descripción clásica.^{62, 63,64} De hecho la enfermedad severa, puede presentarse como una enfermedad monofásica aguda grave con fiebre que progresa a la ictericia, oliguria renal, hemorragia pulmonar, shock refractario y la muerte en cuestión de días.⁶⁵



Figura 5. Exantema pretibial. Caso de leptospirosis febrilanictérica causado por *L. pomona*

FUENTE: Carrada-Bravo Teodoro. 2005. Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. Rev Mex Patol Clin, Vol. 52, Núm. 4, pp 246-256.

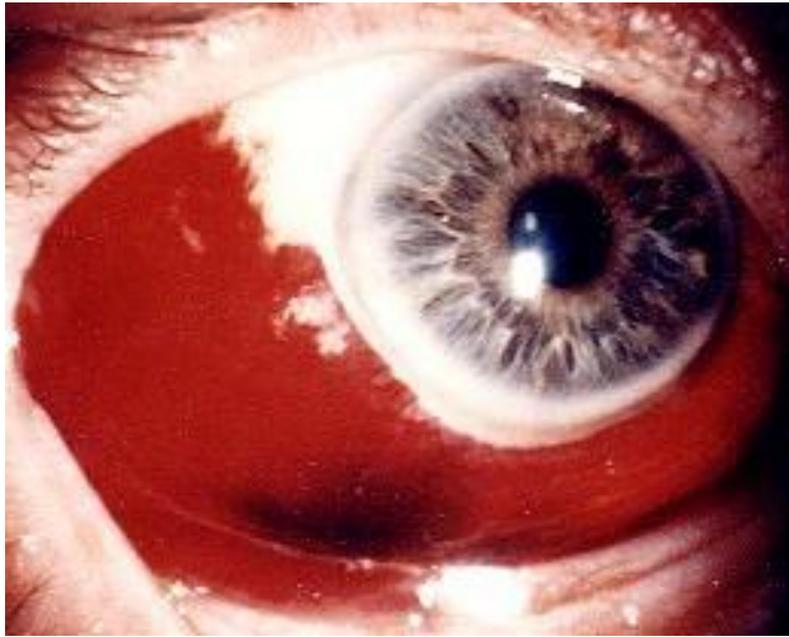


Figura 6. Inyección conjuntival clásica de este cuadro clínico.

FUENTE: http://www.medicinapreventiva.com.ve/articulos/imagenes/hemor_subconj.jpg

6.1 Síndrome de Weil

El síndrome de Weil o forma icterohemorrágica, producida por la variedad de *Leptospira icterohemorrhagie*, se caracteriza por su gravedad y alta letalidad,⁵⁸ los síntomas son paralelos con la fase leptospirémica y se autolimita 7 a 10 días más tarde con el inicio de la fase inmune. Un 10% de los pacientes viran a un curso agresivo con la aparición de hemorragia por piel y mucosas.⁶⁶

La leptospirosis se caracteriza por el desarrollo de vasculitis, daño endotelial, infiltrados inflamatorios con células plasmáticas, histiocitos y neutrófilos. En los exámenes las hemorragias petequiales son frecuentes y pueden ser extensas y los órganos son a menudo descoloridos, debido al grado de ictericia. La histopatología es más marcada en el hígado, riñones, corazón y pulmones.⁶⁷

VII. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Se ha observado un amplio espectro de manifestaciones, desde una forma inaparente, a compromiso grave de múltiples órganos, potencialmente letal. Probablemente la presentación asintomática sea la más frecuente.⁶⁸

Típicamente la enfermedad presenta cuatro categorías clínicas amplias:

- i. Una enfermedad leve de tipo pseudo gripal.
- ii. Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias.
- iii. Meningitis/meningo encefalitis
- iv. Hemorragia pulmonar con falla respiratoria.

El diagnóstico clínico es difícil por esta presentación variada y no específica; su confusión con otras enfermedades (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.⁶⁹

7.1 Patogénesis

No se conoce el mecanismo preciso de su acción patógena, pero se ha demostrado, en los cultivos la producción de algunas sustancias tóxicas en algunas especies patógenas (hemolisinas y fibrolisinas) y una acción citopática en los cultivos celulares⁷⁰.

7.1.1 Producción de Toxinas

Los primeros reportes respecto a la producción de toxinas fueron inferidos por Arean, se demostró en diversos ensayos biológicos en preparados de LPS de *Leptospira* actividad endotóxica. Sin embargo serovar Pomona es notable por la producción hemolítica en ganado, mientras que serovar ballum produce síntomas similares en hamsters y has sido caracterizadas hemolisinas de varios serotipos.⁷¹

Algunas leptospiras *interrogans* exhiben componentes antilinfocíticos y actividad citotóxica por la porción lipídica de la glicoproteína bacteriana (GLP) resultando en lesiones de la membrana celular que lleva a goteo y muerte de la célula. La GLP también puede inhibir la bomba de sodio-potasio -ATPasa en el túbulo renal de las células epiteliales en una forma dosis-dependiente aumentando su afinidad por el sodio pero no por el potasio.⁷² Otras sustancias bacterianas con actividad citotóxica como las fosfolipasas, lipasas y hemolisinas, juegan un papel contribuyente en la patogénesis de leptospirosis.

Otras evidencias de la participación de factores tóxicos en la patogénesis de la leptospirosis derivan de la reacción de Jarisch-Herxheimer observada en los pacientes tratados con penicilina. Las citocinas participan como mediadores de la respuesta inflamatoria sistémica evidenciado por una asociación directa entre la cantidad de TNF-alfa circulante y severidad clínica o la letalidad.⁷³

7.1.2 Adherencia

L. interrogans muestra *in vitro* la capacidad de adherirse a la membrana y de penetrar al citoplasma de células eucarióticas, lo que puede ser inhibido por proteasas y por el calor, lo que demuestra la capacidad invasora de las leptospiras patógenas. *L. biflexa* no muestra capacidad invasora *in vitro*.⁷⁴ LPS de *Leptospira* estimula la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales y de plaquetas provocando la agregación y sugiriendo un papel en el desarrollo de la trombocitopenia.⁷⁵

VIII. INMUNOLOGÍA

Después de la entrada del organismo en el huésped tanto células B y T dependientes son estimuladas. La eliminación inicial es por fagocitosis. La mayoría de las leptospiras son digeridas en las vacuolas de los macrófagos, la inhibición de la actividad de los macrófagos aumenta la sensibilidad a la infección.⁷⁶ La actividad fagocítica de las células polimorfonucleares se ve reforzada por anticuerpos opsonizantes.⁷⁷

Se sabe que el curso de la enfermedad se divide en dos fases: aguda (septicemia) e inmunológica. En la primera la inmunogénesis es de gran parte humoral.⁷⁸ El complemento e IgG participan en el fomento de la actividad bactericida de los macrófagos.⁷⁹ La producción de anticuerpos generalmente comienza dentro de 5-7 después de la infección, sin embargo, la producción de anticuerpos puede tomar 10 días o más tiempo en especial en individuos inmunodeprimidos. Los anticuerpos IgM suelen aparecer antes que los anticuerpos IgG. Estos IgM pueden persistir en niveles bajos durante meses y posiblemente años después de la infección. En contraste los títulos de IgG pueden permanecer solo en forma transitoria o persisten durante años.¹⁷

Al mismo tiempo IgA empieza a aparecer aproximadamente en el quinto día de la infección y puede persistir has 9 meses. Por último la inmunidad mediada por células ayuda a prevenir la colonización de leptospiras en túbulos renales.

La estructura antigénica de *Leptospira* es compleja. La membrana externa está compuesta de lipopolisacarido y es altamente inmunogénica. La membrana externa es serovar-especifica y es el blanco principal de inmunidad humoral y células intermediarias.

En contraste con el antígeno de membrana externa, al antígeno somático es genero-especifico y el antígeno flagelar es tanto genero y serovar-especifico. Además alguno serotipos (*L. icterohemorrhagie*) tiene un antígeno asociado con la virulencia denominado Vi.⁸⁰

IX. PREVENCIÓN E INTERVENCIÓN

Leptospirosis es una enfermedad prevenible. Las medidas de control deberán disponer de comunicaciones de riesgo, la mejora en el saneamiento y las condiciones de vida, el control de roedores e intervenciones veterinarias.⁸¹

La prevención y control deben dirigirse a: (a) la fuente de infección; (b) la ruta de transmisión entre la fuente de infección y el huésped humano; o (c) la infección o la enfermedad en el huésped humano.

Las medidas preventivas deben estar basadas en el conocimiento de los grupos particularmente vulnerables a la infección y los factores epidemiológicos locales.⁶⁸

Es importante establecer qué especies animales constituyen la fuente de infección en un área en particular pues las medidas de control pueden entonces ser orientadas o dirigidas a las especies de animales reservorios locales.

Tales medidas incluyen:

- la reducción de una determinada población animal reservorio, p.ej. ratas;
- la separación de los animales reservorios de las viviendas humanas a través de cercas y mallas;
- la inmunización de perros y ganado;

- eliminación de la basura y mantenimiento de la limpieza en las áreas alrededor de las viviendas humanas
- motivación de la personas a no dejar alimentos a su alrededor, especialmente en áreas recreativas, en donde las ratas pueden estar presentes.⁸²

Es importante conocer los factores de riesgo para la infección humana y, si es posible, la fuente de infección. El riesgo de infección es minimizado, evitando el contacto con orina animal, animales infectados o un ambiente contaminado. Donde sea apropiado, debe usarse ropa protectora y cubrir las heridas con ropa impermeable para reducir la probabilidad de infección, especialmente cuando existe la posibilidad de exposición.⁸³

Pequeñas áreas, tales como pisos, pueden ser limpiadas y desinfectadas, pero la desinfección de grandes áreas naturales tales como lagos y ríos no es posible. Las leptospiras mueren rápidamente con desinfectantes y con la desecación; sin embargo, las leptospiras eliminadas en la orina animal pueden sobrevivir en el ambiente desde semanas a meses bajo condiciones apropiadas, como suelos húmedos o aguas superficiales con un pH neutro o levemente alcalino.⁸⁴

Comprender las características epidemiológicas de leptospirosis es un paso crítico para el diseño de las intervenciones para disminuir el riesgo de la transmisión de la enfermedad. En la actualidad hay pocas medidas eficaces de prevención para la leptospirosis, además de no existir una vacuna disponible contra la leptospirosis humana, la leptospirosis humana puede ser controlada

por la reducción de su prevalencia de animales salvajes y domésticos, aunque poco se puede hacer en animales silvestres, la leptospirosis en animales domésticos puede ser controlada a través de la vacunación con células enteras inactivadas o una preparación de la membrana externa.⁸⁵

X. NORMATIVAS QUE PROPONEN Y REGULAN LA DETECCIÓN DE *Leptospira*

10.1 NOM

México fue uno de los primeros países en realizar estudios sobre leptospirosis en humanos a partir de 1920 con la llegada de Dr. Noguchi , posteriormente en los años subsecuentes se siguió generando información sobre esta zoonosis aunque poco constante.

A partir de esto la Secretaria de Salud le toma importancia a esta enfermedad debido al aumento de casos positivos, por lo que en el año de 1999 entra en vigor la norma oficial mexicana NOM-029-SSA2-1999, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano.

Dicha norma es obligatoria en todo el territorio nacional para todo el personal de salud en los establecimientos de atención médica público, social y privado del Sistema Nacional de Salud, además tiene como objeto establecer las medidas preventivas, de control y de vigilancia epidemiológica de la leptospirosis en el humano.

En general se hablará de las medidas de control tomadas al presentarse esta zoonosis las cuales se llevan a cabo en la población general y comprenden el diagnóstico y tratamiento oportuno de los enfermos, esto se realiza por medio estudios y procedimientos para la confirmación de casos sospechosos, esto es

mediante signos y síntomas que la persona presente sugestivos a la leptospirosis.

La confirmación del caso sospechoso y probable se realiza mediante estudios de laboratorio, que comprenden la titulación de anticuerpos y de ser posible realizar el aislamiento del agente, así como la observación directa de *Leptospira* con microscopio de campo oscuro.

Los estudios de laboratorio y muestras deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Ser practicados por aquellos laboratorios públicos o privados del país, que realicen el diagnóstico de leptospirosis y que formen parte de la red de laboratorios de la Secretaria de Salud coordinados por el INDRE.
- Las muestras de elección necesarias para realizar los estudios respectivos comprenden sangre, suero, orina, L.C.R., exudados, biopsia de hígado tomados a los 8 días posteriores de iniciada la sintomatología clínica y deben reunir las siguientes características: Muestra de sangre (con anticoagulante), 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 5mL 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, ésta 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.

- Muestra de suero, consiste de 5 a 7mL 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, debe enviarse 30mL 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.
- Muestra de LCR corresponde a 3mL, depositada en tubo estéril, conservada a temperatura de refrigeración; no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio.
- Exudados y biopsia de hígado, 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.

Las técnicas y pruebas que se utilizan para efectuar el diagnóstico en orden de importancia corresponden:

- Titulación de anticuerpos anti *Leptospira* en suero, mediante la técnica de microaglutinación, como lo refiere el manual de técnicas de diagnóstico del INDRE. Esta prueba determina anticuerpos totales, el resultado positivo indica infección pasada o presente.
- Títulos a partir de 1:80 son considerados como sospechosos de leptospirosis. Para su confirmación se requiere de una segunda muestra (no antes de dos semanas posteriores) en la cual el título debe aumentar cuatro veces más que el inicial, de ser posible se realiza la observación de la *Leptospira* en sangre, suero, orina, LCR, exudados y biopsia mediante microscopía de campo oscuro.⁸⁶

10.2 OMS

La Organización Mundial de la Salud en su Guía para el diagnóstico, vigilancia y control de la leptospirosis humana menciona que el apoyo del laboratorio es necesario ya que cumple con las siguientes funciones: Confirmar el diagnóstico mediante métodos que ayuden a confirmar la leptospirosis en donde se sospecha la enfermedad en base a los aspectos clínicos; la siguiente función es por razones epidemiológicas de salud pública, esto es, determinando el serovar causante de la enfermedad, la probable fuente de infección, el reservorio

potencial y su ubicación, todo lo que contribuye a definir las estrategias de control.

Los métodos para el diagnóstico recomendados por la OMS son: detección de anticuerpos (MAT, ELISA), cultivo de la bacteria en muestras de sangre orina o tejidos, o por la demostración de leptospiras en tejidos utilizando anticuerpos conjugados con marcadores de fluorescencia, si se disponen de otros métodos como PCR y la inmunotinción contribuirán en el diagnóstico.⁶⁸

10.3 CDC

El Centro de Control y Enfermedades sugiere que el diagnóstico se basa generalmente en la serología. Los anticuerpos pueden ser detectados de 5-7 días de inicio de los síntomas. Menciona que la observación del organismo en microscopia de campo oscuro es relativamente insensible.

La confirmación de leptospirosis requiere seroconversión entre la fase aguda y de convalecencia en muestras de suero, como lo demuestra la prueba de aglutinación microscópica (MAT), el cultivo en muestras clínicas, o la observación de leptospiras en una muestra clínica por inmunofluorescencia.

También se recomienda el diagnóstico utilizando el método de ELISA IgM debido a su alta especificidad y sensibilidad.

Menciona que el objetivo de la investigación es identificar los casos, para identificar la fuente de infección y de instituir las medidas de control cuando sea posible para minimizar la transmisión de la enfermedad.

Si se sospecha de un brote:

- Ponerse en contacto con el médico u hospital para confirmar el diagnóstico
- Obtener muestras de laboratorio adecuadas
- Buscar la fuente de infección, eliminar la contaminación o prohibir su uso.⁸⁷

XI. MÉTODOS DE DETECCIÓN

Un diagnóstico oportuno y preciso de leptospirosis aguda daría lugar a la administración de los antibióticos, que son potencialmente eficaces en la mitigación de las consecuencias negativas de la infección por leptospiras.⁶⁵

El diagnóstico de la leptospirosis comprende el diagnóstico clínico, bacteriológico, serológico y molecular.

Un número de métodos serológicos se han descrito para el diagnóstico de laboratorio para leptospirosis, incluida la prueba de aglutinación microscópica (MAT), hemaglutinación indirecta y ELISA, prueba de inmunofluorescencia indirecta.^{88,89}

11.1 Técnicas bacteriológicas o directas

Los estudios bacteriológicos identifican al microorganismo por métodos directos, mediante la observación en microscopio de campo oscuro, coloraciones argénticas, aislamiento del agente en cultivos especiales, inoculación en animales de laboratorio, inmunofluorescencia directa e inmunohistoquímica.⁴

11.1.1 Microscopia de campo oscuro

Este es un examen donde se pueden visualizar las leptospiras en el material clínico ya sea en LCR, sangre, orina, después de una tinción adecuada (Ver figura 7). Aproximadamente debe de haber una concentración 104 leptospiras/mL para ser detectadas en microscopia de campo oscuro,⁹⁰ proteínas séricas, hebras de fibrina y otros residuos celulares pueden parecerse a las leptospiras siendo que, además, la concentración de organismos en la orina de humanos y animales es frecuentemente muy baja como para ser detectables por este método.

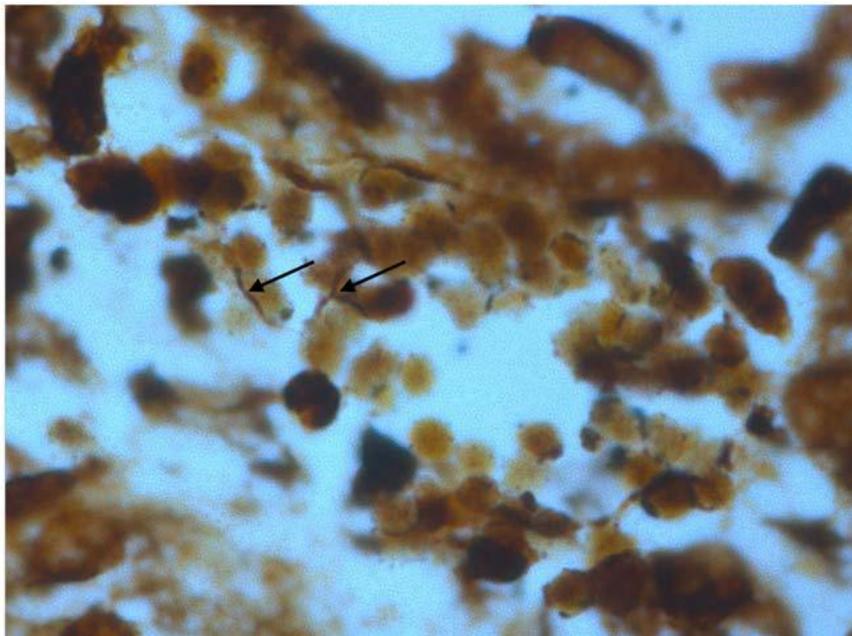
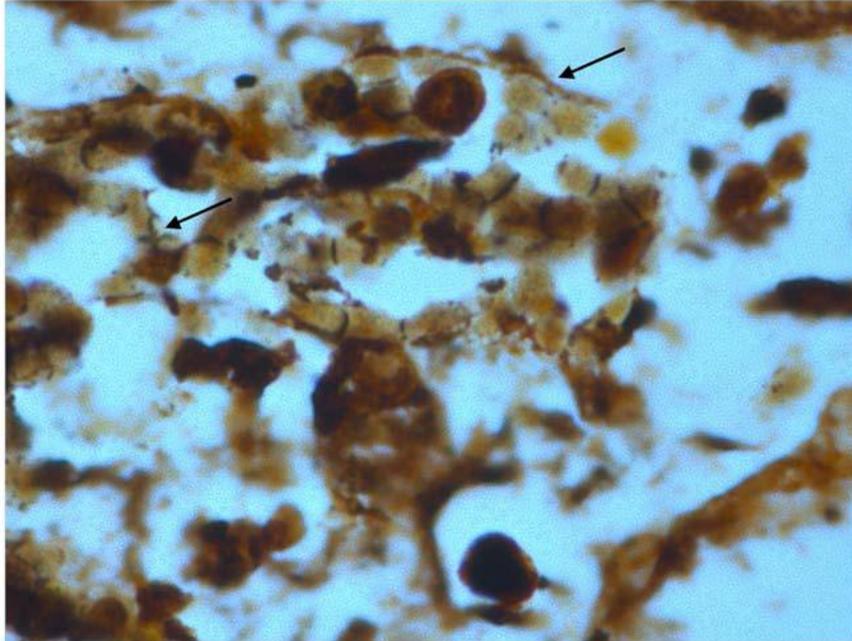


Figura 7. Tinción de Warthin Starry mostrando a *Leptospira* en las células tubulares del riñón.

FUENTE: Sethi S, Sharma N, Kakkar N, Taneja J, Chatterjee SS, Surinder Singh, Meera Sharma . 2010. PLoS Negl Trop Dis 4(1).

Las leptospiras pueden concentrarse por centrifugación diferencial, pero el porcentaje de observaciones positivas igual se mantiene bajo.

No se recomienda la microscopía directa de la sangre como procedimiento de rutina, además de presentar otras desventajas (ver tabla 4).

Las leptospiras también se pueden visualizar por microscopía electrónica.

Los métodos de coloración son: coloración de plata, coloración por inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales de conejo marcados con fluoresceína o ratón, coloración con inmunoperoxidasa, hibridación *in situ* usando sondas de ADN.⁹¹

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la microscopia de campo oscuro.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
La microscopía de campo oscuro es particularmente útil para observar las leptospiras en cultivo, sobre todo cuando están presentes en gran número y para observar la aglutinación en la MAT.	<p>La microscopía de campo oscuro es técnicamente exigente; reconocer las leptospiras es difícil, en particular cuando están presentes en poca cantidad. Artefactos, tales como trazos de fibrina en sangre, son fácilmente confundidos con leptospiras</p> <p>Diagnósticos falsos positivos ocurren con frecuencia. En consecuencia, la microscopía de campo oscuro es útil solamente para quienes tienen considerable experiencia observando leptospiras</p> <p>Diagnósticos, tanto 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.</p>

FUENTE: World Health Organization, Geneva; 2003.

11.1.2 Cultivo

El aislamiento del agente causal es la mejor manera de establecer un diagnóstico definitivo de leptospirosis, pero el tiempo requerido para su detección lo hacen poco práctico como método de rutina en la práctica clínica, sin embargo es de indudable importancia epidemiológica.⁹²

Las leptospiras se pueden cultivar en medios especiales como Fletcher, EMJH o Tween-80 con albumina. Crecen lentamente (tiempo de generación de 6 a 16 horas), requieren una incubación de 28 a 30°C durante un periodo que puede ser hasta de 4 meses, sin embargo, la mayor parte de los cultivos arrojan resultados positivos a las 2 semanas. Puesto que la concentración de microorganismos en sangre, LCR y la orina puede disminuir después de la primer semana de la infección, se deben recoger varias muestras del sujeto con sospechas de leptospirosis. Además, los inhibidores presentes en la sangre y en la orina pueden retrasar o evitar el aislamiento de las leptospiras. A diferencia de la mayoría de los hemocultivos, tan solo se inoculan una o dos gotas de sangre en el medio de cultivo. De igual modo, la orina se trata con el fin de neutralizar el pH y se concentra por centrifugación. A continuación se inoculan algunas gotas del sedimento en el medio de cultivo.¹⁶

11.2 Técnicas serológicas

11.2.1 Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

El estándar de oro para el diagnóstico serológico de la leptospirosis en los animales y humanos es la MAT. La MAT es actualmente la prueba más eficaz para determinar el serotipo y el serogrupo de las leptospiras.⁹³

El método es simple y consiste en mezclar el suero a estudiar con leptospiras cultivadas y para luego evaluar el grado de aglutinación usando un microscopio de campo oscuro. De acuerdo con el Subcomité de Taxonomía en *Leptospira*, el punto de corte se define como la dilución del suero que muestre el 50% de aglutinación, dejado 50% de células libres, cuando se lo compara con un control que consiste de cultivo diluido 1:2 en tampón fosfato salino.⁶⁸

La MAT se realiza como se describe a continuación.

Las cepas se subcultivan en medio EMJH cada semana. Se debe usar el cultivo entre el cuarto y décimo día de crecimiento a 30°C. Para restringir el crecimiento bacteriano, se aconseja guardar los cultivos a temperatura ambiente en la oscuridad una vez el cultivo haya crecido a una densidad de 2-4 x 10⁸ leptospiras/mL. Después de 10 días, es mejor guardar el cultivo a 15°C. La viabilidad celular (densidad y movilidad) y la ausencia de contaminación se verifican usando el microscopio de campo oscuro.

Antes de usar las cepas, se diluyen generalmente 1:2 con solución fisiológica tamponada para obtener una densidad de $1-2 \times 10^8$ leptospiras/mL. La densidad celular de cada cepa debe verificarse individualmente.

Existen opiniones diferentes respecto de si es preferible usar antígeno vivo o muerto en la MAT. Se ha reportado que el antígeno muerto (concentración final de 2% formaldehído) es más sensible pero menos específico que las preparaciones con antígeno vivo. Los antígenos muertos tienen la ventaja de ser más seguros de manipular y puede ser guardado por unas pocas semanas antes de que ocurra una pérdida significativa de la actividad. La tabla 5 nos muestra los serovares de referencia usados como antígenos para la MAT.

Tabla 5. Serovares de referencia usados como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica (MAT).

Nº	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
2	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
3	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
4	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
5	<i>L. borgepetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 125
6	<i>L. borgepetersenii</i>	Ballum	Ballum	S 102
7	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
8	<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
9	<i>L. interrogans</i>	Canícola	Canícola	Hond Utrecht IV
10	<i>L. interrogans</i>	Canícola	Canícola	Ruebush
11	<i>L. kischneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
12	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
13	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
14	<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis	Borincana	HS 622
15	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
16	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Mankars o	Mankars o
18	<i>L. borgepetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
19	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
20	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
21	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
22	<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	Alexi	HS 616
23	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
24	<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
25	<i>L. borgepeterseni</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin

FUENTE: World Health Organization, Geneva; 2003.

Método e interpretación

Consiste en dos pasos sucesivos, llamados (1) tamizado; para determinar el(los) serogrupo(s) responsable(s); y (2) la MAT cuantitativa para determinar el título del suero para cada antígeno probado.

No se debe usar un suero “lechoso” que contenga gotas de grasa.

Tamizado

El procedimiento es como sigue:

- Inactivar el complemento calentando el suero a 56°C por 30 minutos.
- Diluir el suero 1:25 en solución salina
- Descargar 50µL de solución fisiológicamente tamponada en la primera fila de pocillos de una placa de microtitulación. El número de pocillos es el mismo que el número de antígenos. Esta fila corresponde al “antígeno control”.
- Cada una de las demás filas corresponden a un suero en particular. Dispensar 50 µL de suero diluido, previamente tratado para remover el complemento en cada pocillo. Como antes, el número de pocillos será el mismo como el número de antígenos. Repetir para cada uno de los sueros.
- Cada columna corresponde a un antígeno. Descargar 50µL de antígeno diluido en los correspondientes pocillos, incluyendo el “antígeno control”.

Repetir para cada uno de los antígenos probados. La dilución final del suero es entonces 1/50.

- Cubrir la placa de microtitulación e incubarla a temperatura ambiente en la oscuridad por 2 horas o toda la noche a 4°C
- Usando un gotero, transferir una alícuota de cada uno de los pocillos a un portaobjetos, columna por columna. La lectura de cada una se determina en relación a la aglutinación del antígeno control correspondiente (Figura 8).
- Cada suero que da una aglutinación de al menos 50% de las leptospiras (comparadas con el antígeno control) es considerado positivo.⁹⁴

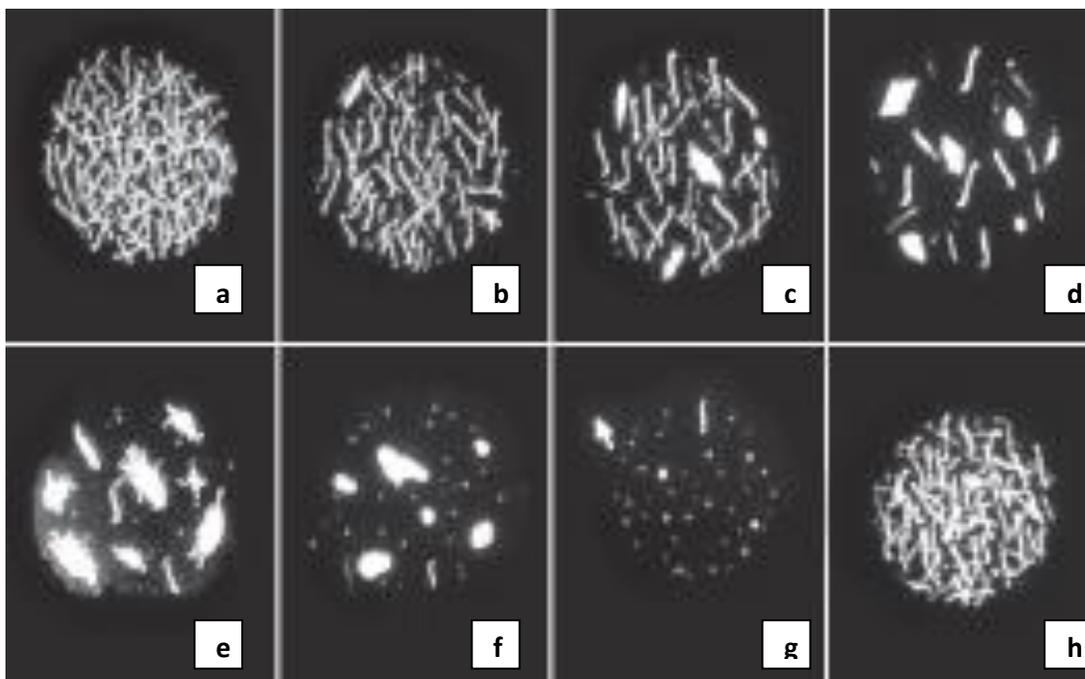


Figura 8. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) **a:** lámina control **b:** lámina con 25% de aglutinación (zonas como copos de algodón); **c:** lámina con 50% de aglutinación; **d:** lámina con 75% de aglutinación; **e:** lámina con 100% de aglutinación; **f:** lámina con 100% de aglutinación y lisis; **g:** lámina con 100% de lisis; **h:** lámina negativa.

FUENTE: **Céspedes, Manuel.** 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica y reemergente: Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, vol. 22 no. 4.

La MAT es una prueba compleja y de difícil realización e interpretación, por lo que requiere de personal con experiencia; cultivos vivos de todos los serovares requeridos para su uso como antígeno, los cuales deben ser mantenidos semanalmente, además es peligrosa para el personal de laboratorio por la continua manipulación de bacterias vivas.

Otras desventajas incluyen el riesgo continuo de contaminación cruzada de las cepas, haciendo necesario la verificación periódica de cada serovar con sus antisueros homólogos. Los antígenos usados deben incluir un representante de cada serogrupo y también se debe tener serovares aislados localmente, e incluir dentro de la batería a uno de los serovares de *L. biflexa*.⁹⁵

La tabla 6 muestra un estudio realizado por Bajani y cols sobre la sensibilidad y especificidad que muestra la MAT en comparación con otras pruebas serológicas.⁹⁶

Tabla 6. Sensibilidad y Especificidad de Bajani y col.

	% Sensibilidad	% Especificidad
ELISA	90.7	97.4
IHA	81.5	95.9
LDS	94.8	89.4
DST	96.4	98.2
MAT	98.2	96.4

FUENTE: Bajani Mary D, Ashford David A , Bragg Sandra L, *et al.*2003. Journal of clinical Microbiology, Vol.41, No.2.

11.2.2 ELISA Indirecto IgM

El método de ELISA es usado como una prueba adicional o como una alternativa a la prueba de MAT. Es el método más usado para detectar leptospirosis precoz. Los anticuerpos de tipo IgM son los que se presentan en una reciente infección y estas se pueden detectar específicamente por ELISA. Se han desarrollado una gran variedad de ELISAs y comparándolos con la prueba MAT mostraron una concordancia muy alta. Usando un solo antígeno o pool de antígenos en la prueba de ELISA se pueden determinar anticuerpos IgM frente a varios serovares antigénicamente relacionados. Los sueros positivos deben ser confirmados por MAT.⁹⁷

La prueba se realiza de la siguiente forma:

Preparación del antígeno

- Usar un cultivo de *L. biflexa* serovar Patoc a una densidad de 10⁸-10⁹ leptospiras por mL determinada por microscopio de campo oscuro. Agregar formaldehído a una concentración final de 0,2% y dejar en la mesa de laboratorio por 3 a 4 horas.
- Colocar en baño maría a 100°C por 30 minutos.
- Guardar el sobrenadante, que constituirá la fuente de antígeno.

Cubrimiento de placas

- Dispensar 150 μ L de antígeno en cada pocillo
- Guardar a 37°C de 3 a 5 días hasta que se evapore totalmente
- Estas placas deben guardarse en la oscuridad, a temperatura ambiente y en una caja seca herméticamente cerrada o un recipiente plástico sellado. El antígeno se mantiene estable por aproximadamente un año bajo estas condiciones.

Saturando sitios no específicos

- Lavar las placas tres veces con PBS-leche inmediatamente antes de ser usadas
- Dejar los pocillos en contacto con PBS-leche, ya sea toda la noche a 4°C o por 1 hora a 37°C.
- Desocupar los pocillos por inversión y secar las placas golpeándolas contra papel de filtro
- Distribuyendo los sueros a estudiar
- Cada suero de paciente es analizado por duplicado a una dilución de 1/400 en PBS-leche. Para cada serie de las muestras del paciente a estudiar se reservan:
- 8 pozos para el rango de dilución de la mezcla positiva, de 1/400 a 1/51200.
- 2 pozos para el umbral del suero control.

- 1 pozo para el control del antígeno.
- 1 pozo para el control del conjugado.
- Incubar las placas a 37°C por 1 hora.

Agregado del conjugado

- Vaciar los pozos y lavar tres veces con PBS 1x
- Preparar el sustrato antes de ser usado:
 - 1mL de solución madre “stock” de solución ABTS.
 - 20mL del tampón de sustrato.
 - 200µL de la solución diluida de H₂O₂
 - Dispensar 150µL de conjugado diluido en cada pocillo.
 - Agitar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos (revisar visualmente por cambio de color). La reacción se detiene por el agregado de 50µL de 10% de sodio duodecil sulfato (SDS) en cada pozo.

Análisis

Medir la densidad óptica (DO) a 405nm con un espectrofotómetro equipado con una plataforma para la placa de microtitulación. Un color verde en los pocillos indica que los anticuerpos están presentes en la muestra de suero.

Deducir los títulos de anticuerpos para cada paciente, a partir de una curva obtenida con los valores de DO de un rango de diluciones de una mezcla (pool)

de sueros positivos. Para determinar el umbral positivo se usa un suero umbral diluido en 1/400 y se marca la correspondiente DO en la curva.⁶⁸

La tabla 7 presenta las ventajas y desventajas de ELISA sobre la MAT.

Tabla 7. Ventajas y desventajas de ELISA en comparación con la MAT.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Detecta anticuerpo IgM en la fase temprana de la infección.	Algunas pruebas de ELISA son menos específicas que la MAT y reacciones cruzadas débiles, debido a la presencia de otras enfermedades, pueden ser observadas.
Solo utiliza un antígeno, llamado antígeno género específico, el cuál es compartido por leptospiras patógenas y saprofitas.	Como se basa en un antígeno género específico, la prueba de ELISA no da indicación del serovar infectante.
ELISA puede ser estandarizada	
No requiere del cultivo de leptospiras en el laboratorio local, para proveer de antígeno desde que un kit comercial esté disponible.	

FUENTE: World Health Organization, Geneva; 2003.

11.3 TÉCNICAS MOLECULARES

11.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospiras en muestras clínicas. Los métodos basados en el ADN tales como la hibridación “Dot blot” o “Southern blot” que emplean secuencias específicas como sondas o la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) han permitido la identificación de especies de leptospiras patógenas y no patógenas, así como el diagnóstico de infecciones agudas.⁵

La reacción en cadena de la polimerasa provee una base novedosa para la tipificación de las leptospiras.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para detectar el ADN de *Leptospira* en muestras clínicas. Iniciadores (secuencias cortas de ADN que son específicas para leptospiras), en combinación con una polimerasa del ADN estable al calor, en presencia de nucleótidos y sometidos a ciclos de temperatura, amplifican una sección del ADN de *Leptospira*. La PCR puede ser empleada con sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejido (ante o *post-mortem*).

El ADN amplificado puede ser relativamente fácil de detectar en geles. Además, hibridaciones subsecuentes o concomitantes con sondas marcadas hacen posible el uso de varios métodos de detección altamente específicos (fluorografía, cromatografía, autorradiografía en soluciones o en “blots”) durante o después de la PCR.

La PCR debe combinarse, de preferencia, con un lance de hibridación o realizarse con un set de iniciadores anidados para asegurar una alta especificidad. Con la actual disponibilidad de termocicladores avanzados y rápidos y kits de extracción de ácidos nucleicos “listos para usar”, la PCR es un método rápido posible de diagnóstico temprano de la leptospirosis.⁶⁸

A continuación se describirá a grandes rasgos la técnica de PCR la cual consiste básicamente en tres etapas:

I.- En la primera etapa el ADN molde es incubado a alta temperatura (92-98°C, de 30-90 segundos), para separar las cadenas complementarias, desnaturalización de ADN y así hacerlas accesibles al apareamiento con el iniciador específico.

II) La etapa de alineamiento en la cual la reacción es enfriada para permitir que los oligonucleótidos iniciadores se alineen o hibriden las secuencias complementarias del ADN blanco.

III) La reacción de extensión, generalmente llevada a cabo a una temperatura intermedia, en el cual el ADN polimerasa copia el ADN entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos iniciadores.

Estas tres etapas de la reacción constituyen un ciclo térmico. Un protocolo típico de PCR incluye de 30 a 50 ciclos. Cuando cada ciclo térmico se completa, los fragmentos recientemente sintetizados sirven como ADN blanco, y en unos pocos ciclos más, el producto predominante será una única clase de fragmento de ADN cuya longitud corresponde a la distancia de los oligonucleótidos iniciadores (figura 9).⁹⁸

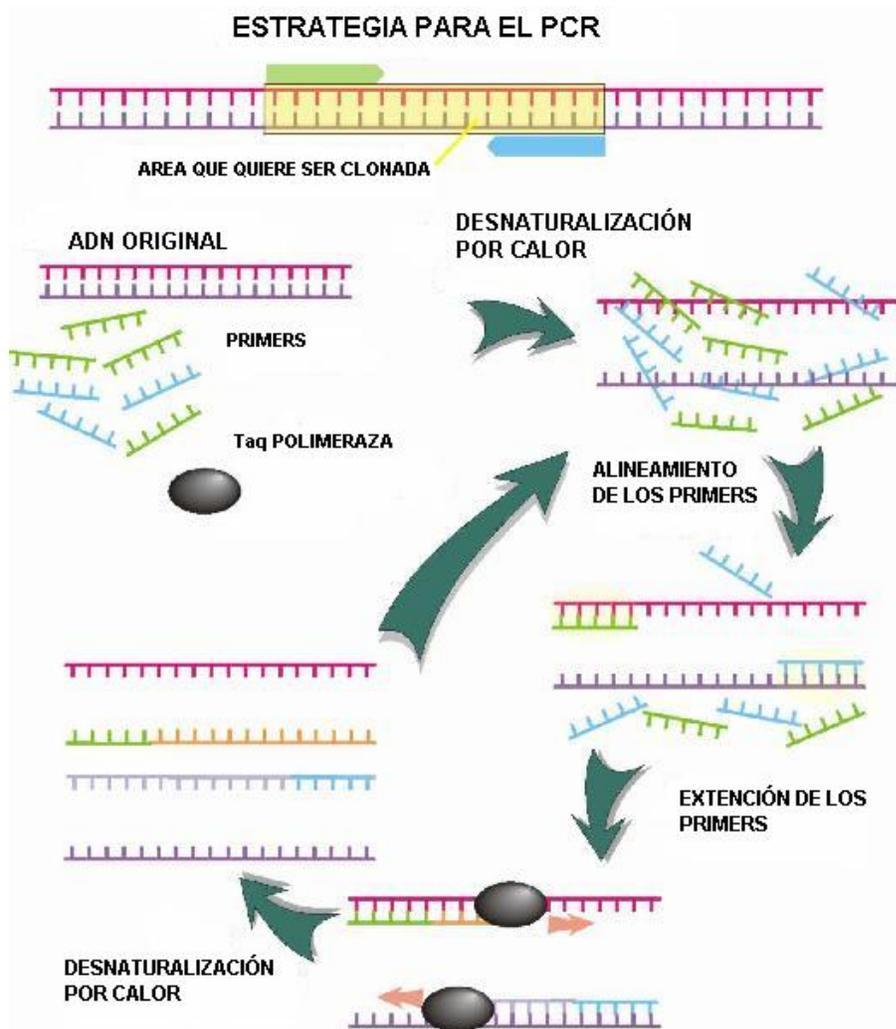


Figura 9. Esquema que representa el proceso de reacción en cadena de la polimerasa

FUENTE: http://www.medvet.una.ac.cr/carrera/mva505_Practica9.pdf

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100µL), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable. También se utilizan los siguientes reactivos:

- Solución amortiguadora: La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada diez veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl₂.
- Magnesio: Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5mM. La concentración de MgCl₂ debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de Mg⁺² dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas.
- Desoxirribonucleosidos trifosfatados (dNTPs): Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCT y d GTP distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. La

variación en su concentración afecta la especificidad y la fidelidad de la reacción.

- Cebadores o iniciadores: Estos son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre los 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G+C entre los 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está en el intervalo de 0.1-0.5µM. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN.⁹⁹ Uno de los primers más usados fue el descrito por Merien *et al* que amplifica el fragmento 331-bp del gene de los rrs (rRNA 16S) de *Leptospira* patógena y no patógena,¹⁰⁰ mientras que las *primers* G1 y G2 descritas por Gravekamp *et al* amplifican serovares patógenos excepto *Leptospira kirschneri*.¹⁰¹
- Enzima: Sólo pueden utilizarse polimerasas que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. En la actualidad la mayoría de las polimerasas que se suministran comercialmente son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética. Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* y la *Vent* de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por encima de 92°C.¹⁰²

- ADN: La concentración de ADN molde depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren 300 nanogramos a 1 microgramo de ADN genómico.¹⁰³ El molde puede ser también ARN que sea previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa. En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar, lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa, sobre todo en las muestras clínicas. Si el material son suspensiones celulares, puede ser suficiente con romper las células por calor, pero para la mayoría de las muestras clínicas es necesario realizar un procedimiento de extracción con fenol-cloroformo y posteriormente precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol o etanol.¹⁰¹
- Agua: El agua que se utiliza en una reacción de PCR debe tener muy pocas sales (bidestilada) y si hay variaciones en la cantidad de iones entre una reacción y otra podría haber problemas. Si se cuenta con un buen desionizador en el laboratorio será suficiente con solo esterilizarla.¹⁰⁴

Para diferenciar entre genomoespecies después del PCR se usa geles de poliacrilamida, seguido de la tinción con plata.¹⁸ La tabla 8 presenta las ventajas y desventajas de la PCR.

Tabla 8. Ventajas y desventajas de PCR

VENTAJAS	DESVENTAJAS
La PCR puede confirmar rápidamente el diagnóstico en la fase temprana de la enfermedad, cuando la bacteria puede estar presente y antes que los títulos de los anticuerpos alcancen niveles detectables.	La PCR requiere de equipos especiales y la dedicación de un espacio de laboratorio, al igual que personal altamente calificado. Puede dar resultados falsos positivos por la presencia de mínimas cantidades de ADN extraño que puede contaminar el área de trabajo. Puede dar resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores en los materiales clínicos que están siendo examinados

FUENTE: World Health Organization, Geneva; 2003.

XII. CONCLUSIÓN

En cuanto a lo investigado anteriormente se llegó a las siguientes conclusiones:

- La leptospirosis al presentar un amplio espectro de síntomas es subdiagnosticada y por lo tanto son numerosos los casos de esta enfermedad que no son notificados.
- Gracias a que México cuenta con un programa de vigilancia epidemiológica y ser reconocida la leptospirosis como una de las zoonosis más importantes por la Secretaria de Salud se tienen datos relevantes sobre la situación de leptospirosis, sin embargo aun falta interés del clínico para estudiar detenidamente este padecimiento.
- Algunas técnicas para el diagnóstico de leptospirosis presentan ciertos inconvenientes, tal es el caso de la técnica de microaglutinación que pese a ser el método de referencia utilizado por el INDRE y presentar mayor especificidad y sensibilidad que otras pruebas serológicas, presenta inconvenientes debido a que se requiere de personal capacitado y una constante mantenimiento de los serotipos representantes o serogrupos.

XIII. REFERENCIAS

1. Carrada-Bravo, Teodoro. 2005. Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. Revista Mexicana de Patología Clínica, Vol. 52, No. 4, pp. 246-256.
2. Roca, B. 2006. Leptospirosis. Revista Médica de Universidad de Navarra. Vol. 50, No. 2, pp. 3-6
3. Ferro, Beatriz Eugenia.; Rodríguez, Lucia Ana.; Pérez, Mauricio.; Travi, Bruno Luis. 2006. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. Biomédica, Revista del Instituto Nacional de Salud. Vol. 26 No. 2 pp. 250-257
4. Brihuega, B. 2008. Leptospirosis: Toma de muestra y diagnóstico. Revista de enfermedades infecciosas reemergentes. Vol.3, pp. 24-26.
5. Cardona, Marta Noelia.; Moros, Rosalba María.; López, Eneida Aurora.; Pérez, José Luis.; Hernández, Roberto Carlos. 2008. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Vol.28, No.1, pp.24-30.
6. Céspedes, Manuel.; Tapia, Rafael.; Balda, Lourdes.; González, Dana.; Peralta, Carlos, Condori, Patricia. 2007. Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de la Leptospirosis

- humana. Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Vol.24, No.1, pp. 20-26
7. Rodríguez Alonso, Beatriz.; Gómez de Haz, Héctor José.; Cruz de la Paz, Raúl. 2000. Leptospirosis humana ¿Un problema de salud pública? Revista Cubana Salud Pública.Vol.26, No.1,pp 27 -34
 8. Carrada Figueroa, Georgina.; Calderón Valencia, Elsa.; Martínez Hernández, Clara. 2002 .Leptospirosis: pleomorfismo clínico en el síndrome febril. Salud en Tabasco Vol.8, No.3, pp. 128-132.
 9. Erosa-Barbachano, Arturo. 2001. Leptospirosis. Revista Biomédica 2001; 12:282-287.
 10. Santos Pérez, Luis Alberto.; Bilbao González, Katia.; Segredo Molina, Yamilé.; Cartaya Irastorza, José Manuel. 2008. Leptospirosis grave asociada con hemorragia pulmonar. Presentación de 3 pacientes pediátricos UCIP. Hospital Universitario “José Luis Miranda”. Revista Panamericana de Infectología. Vol.10, No.4, pp.36-42
 11. De Igartúa López, Everest; Coutiño Rodríguez, Ma. Del Rocío.; Velasco Catrejón, Oscar. 2005. Revisión Breve de Leptospirosis en México. Altepepaktli, Revista del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana. Vol.1, No. 1 y 2, pp.52-58
 12. A.D, Alexander.1960 the Distribution of Leptospirosis in Latin American. Bull.Wld.Hlth.Org.Vol.23. pp113-125

13. Vado-Solís, Ignacio.; Cárdenas-Marrufo, María F.; Laviada-Molina, Hugo.; Vargas-Puerto, Francisco.; Jiménez-Delgadillo, Bertha.; Zavala Velázquez, Jorge. 2002. Estudio de casos clínicos e incidencia de leptospirosis humana en el estado de Yucatán, México durante el período 1998 a 2000. *Revista Biomédica*, Vol. 13, pp. 157-164.
14. Pérez Serna, José Cruz.; Colín Ortiz, Jesús Roberto.; Caballero Servín, Ángel.; Cuellar Espinosa, Adriana Josefina. 2005. Seropositividad a leptospiras en sueros de pacientes sospechosos de hepatitis viral negativos a marcadores serológicos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, Vol.57, No.1, pp. 57-58
15. Sandow, W. Ramirez. 2005. Leptospirosis. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, Vol.6, No.6
16. Murray P, Michael A Pfaller. 2006. *Microbiología Médica*. Ed. Elsevier Mosby 5ta Edición. Madrid, España. Pp.976.
17. Izurieta, Ricardo.; Galwankar, Sagar.; Clem, Angela. 2008. Leptospirosis: The “mysterious” mimic. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* , Vol.1 No. 1, pp.21-33
18. Céspedes, Manuel. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica y reemergente: *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, Vol. 22 No. 4, pp.291-307
19. Ganoza, A.C.; Matthias, M.A.; Collins-Richards, D.; Brouwer, C.;

- Cunningham, C.B.; Segura, Eddy R.; Gilman, Robert H.; Gotuzo, Eduardo.; Vinetz, Joseph M. 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. Public Library of Science Medicine, Vol.3, No.8, pp. 1329-1340
20. Pumarola, A. 1995. Microbiología y parasitología medica. MASSON S.A. Barcelona. Pp.916.
21. Ren, S.X.; Fu, G.; Jiang, X.G.; Zeng, R.; Miao, Y.G.; Xu, H.; Zeng, Rong.; Miao, You-Gang.; Xu, Hai; Yi-Xuan, Zhang.; Hui, Xiong.; Gang, Lu.; Ling-Feng, Lu.; Hong-Quan, Jiang.; Jia, Jia.; Yue-Feng, Tu.; Ju-Xing, Jiang.; Wen-Yi, Gu.; Yue-Qing, Zhang.; Zhen, Cai.; Hai-Hui, Sheng.; Hai-Feng, Yin.; Yi, Zhang.; Gen-Feng, Zhu.; Ma, Wank.; Hong-Lei, Huangk.; Zhen, Qian.; Sheng-Yue, Wang.; Wei, Ma.; Zhi-Jian, Yao.; Yan, Shen.; Bo-Qin, Qiang.; Qi-Chang, Xia.; Xiao-Kui, Guo.; Danching, Antoine.; Saint Girons, Isabelle.; Somerville, Ronald L.; Yu-Mei, Wen.; Man-Hua, Shik.; Zhu, Chen. 2008. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature, Vol. 422, pp. 888-893
22. Nascimento, A.; Ko, A. I.; Martins, E.A.L.; Monteiro-Vitorello, C.B.; Ho, P. L.; Haake, D. A.; Verjovski-Almeida, S.; Hartskeerl, R. A.; Marques, M. V.; Oliveira, M. C.; Menck, C. F. M.; Leite, L.C.C.; Carrer, H.; Coutinho, L.L.;

- Degrave, W. M.; Dellagostin, O. A.; El-Dorry, H.; Ferro, E. S.; Ferro, M. I. T.; Furlan, L. R.; Gamberini, M.; Giglioti, E.A.; Go´es-Neto, A.; Goldman, G. A.; Goldman, M. H. S.; Harakava, R.; Jeronimo, S. M. B.; Junqueira-de-Azevedo, I. L. M.; Kimura, E. T.; Kuramae, E. E.; Lemos, E. G. M.; Lemos, M. V. F.; Marino, C.L.; Nunes, L. R.; de Oliveira, R. C.; Pereira, G. G.; Reis, M. S.; Schriefer, A.; Siqueira, W. J.; Sommer, P.; Tsai, S. M.; Simpson, A. J. G.; Ferro, J. A.; Camargo L. E. A.; Kitajima, J. P.; Setubal, J.; and Van Sluys, M. A. 2004. Comparative genomics of *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, pp. 2164-2172
23. Charon N, Jonhson R.; Peterson, D.1974. Amino acid bio-synthesis in the spirochete *Leptospira*: evidence for a novel pathway of isoleucine biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, Vol. 117, pp. 203-211.
24. González, A.; Borrero, R.; Ruiz, J.; Batista, N.; Fernández, Y.; Valdez Y.; González, M. 2006. Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Revista Argentina de Microbiología*, Vol.38, No.2, pp. 61-68
25. Nascimento, A.L.T.O.; Verjovski-Almeida, S.; Van Sluys, M. A.; Monteiro-Vitorello, Camargo L.E.A.; Digiampietri, L. A.; Harstkeerl, R.A.; Ho. P. L.; Marques, M. V.; Oliveira, M. C.; Setubal, J. C.; Haake, D. A.; and Martins, E.A.L. 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar

- Copenhageni. Brazilian Journal of Medical and Biological Reserch. Vol.37, pp. 459-478
26. Haake, David A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology, Vol. 146 No.7 pp.1491–1504
 27. Vinh, T. U.; Adler, B.; and S. Faine. 1986. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. Journal of General Microbiology, Vol. 132, pp.103–109
 28. Quintanila, Juvel, Richmond, Juan.; Gourzong, Charles. 2004. Leptospirosis y síndrome de Weil. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica, Vol. 51, pp. 3-9.
 29. Caino, Héctor.; Scaglia, Julio.; Curcio, Fernando.; SQUIROFF, Gisella. 2006. Leptospirosis. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, Vol. 1, No. 3, pp. 30-36
 30. Gamarra, Roberto. 2008. Leptospirosis. Tesis de Maestría Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria.
 31. Rodríguez Martínez, Germán. 2000. Estado actual de la leptospirosis. Revista MVZ Córdoba, Vol. 5, No.1, pp. 61-63.
 32. García. E.; Suárez, M.; García, R.; Pedroso, S. 2001. Factores de riesgo de la leptospirosis humana en el municipio de Ciego de Ávila. Revista Cubana Higiene Epidemiológica, Vol. 39, pp. 207-213.

33. Nájera, Saholeth.; Alvis, Nelson.; Babilonia, David.; Álvarez, Ligia.; Máttar, Salim. 2005. Leptospirosis ocupacional en una región del Caribe colombiano. *Salud pública de México*, Vol. 47, No.3.
34. Haake, D.A. 2006. Molecular epidemiology of leptospirosis in the Amazon. *Public Library of Science Medicine*, Vol. 3, No. 8, pp. 1214-1215.
35. Massarani, Luisa. 2004. Brazilian genomics breakthrough offers hope for leptospirosis control. *Bulletin of World Health Organization*. Vol. 82, No. 6, pp. 471- 472.
36. Cachay, E. R.; and Vinetz, J M. 2005. A Global Research Agenda for Leptospirosis. *Journal Postgraduate Medicine*. Vol. 51. No.3 pp. 174–178.
37. Jansen, Andreas.; Luge, Enno.; Guerra, Beatriz.; Wittschen, Petra.; Gruber, Achim D.; Loddenkemper, Christoph.; Schneider, Thomas.; Lierz, Michael.; Ehlert, Derk.; Appel. Bernd.; Stark, Klaus.; and Nöckler, Karsten. 2007. Leptospirosis in Urban Wild Boars, Berlin, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 5, and pp.739-742.
38. Céspedes, Manuel.; Fernandez, Rosa.; Rimarachin, Rocío.; Taipe, Haydee.; Cenepo, T. Juan.; Mori y González, María.; Torres, Isela.; Castillo, Celso.; Balda, Lourdes.; Tapia, Rafael.; González, Dana.; Glenny, A. Martha. 2004. Leptospirosis: una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincia de Coronel Portillo, Ucayali, Perú. *Revista*

Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Vol.21, No.2,
pp. 62-70.

39. Infectious Agents Surveillance Reports. Disponible en:
<http://idsc.nih.gov/iasr/29/335/tpc335.html>. Accesado el 1 de diciembre 2009
40. Victoriano, Ann Florence.; Smythe Lee, D.; Gloriani-Barzaga, Nina.; Cavinta, Lolita L.; Kasai, Takeshi.; Limpakarnjanarat, Khanchit.; Ong Bee, Lee.; Gongal, Gyanendra.; Hall, Julie.; Coulombe, Caroline Anne.; Yanagihara, Yasutake.; Yoshida, Shin-ichi.; Adler, Ben. 2009. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infectious Diseases Vol. 9, No.147.
41. Chou, Yu-Ling.; Chen, Chang-Shun.; and Liu, Cheng-Chung. 2008. Leptospirosis in Taiwan, 2001–2006. Emerging Infectious Diseases, Vol. 14, No. 5.
42. Spichler, Anne.; Athanazio, Daniel.; Buzzar, Marcia.; Castro, Bronislawa.; Chapolla, Erica.; Seguro, Antonio.; and Vinetz, Joseph M. 2007. Using Death Certificate Reports to Find Severe Leptospirosis Cases, Brazil. Emerging Infectious Disease, Vol.13, No.10.
43. Johnson Michael, A.S.; Smith, Hannah.; Priya, Joseph.; Gilman, Robert H.; Bautista, Christian T.; Campos, Kalina.; Céspedes, Michelle.; Klatsky, Peter.; Vida, Carlos.; Terry, Hilja.; Calderon, Maritza.; Coral, Carlos.;

- Cabrera, Lilia.; Parmar, Paminder.; and Vinetz, Joseph M. 2004. Environmental Exposure and Leptospirosis, Perú. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 10, No. 6, pp. 1016-1022.
44. Informe Epidemiológico del departamento del Atlántico. Situación de la leptospirosis en el departamento Atlántico. 2008. Volumen 1, Número 2, Barranquilla. Disponible en:
http://www.salud.atlantico.gov.co/archivos_va/4209_1.pdf Accesado el 5 de Noviembre 2009.
45. Vado-Solís, Ignacio.; Cárdenas Marrufo, María.; Jiménez Delgadillo, Bertha.; Alzina López, Alejandro.; Laviada Molina, Hugo.; Suarez Solís, Victor.; Zavala Velázquez, Jorge E. 2002. Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, Vol. 44, No.6, pp 335-340.
46. Zavala-Velázquez, Jorge.; Vado-Solís, Ignacio.; Rodríguez-Félix, María.; Rodríguez-Angulo, Elsa.; Barrera-Pérez, Mario.; Guzmán-Marín, Eugenia del S. 1998. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. *Revista Biomédica*, Vol. 9, pp. 78-83.
47. Velásquez Velásquez, Reina Teresa. 2004. Seroprevalencia y Factores asociados a la transmisión de leptospirosis en trabajadores de la procesadora municipal de carnes (PROMUCA) de San Pedro Sula,

Honduras. Tesis de Maestría en Epidemiología. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud.

48. Orrego Uribe, A.; Giraldo De León, G.; Ríos Arango, B.; Valencia Prada, P.A. 2003. Leptospirosis en personas de riesgo de quince explotaciones porcinas y de la central de sacrificio de Manizales, Colombia. Archivos de medicina veterinaria, Vol. 35, No.2, pp. 205-213.
49. Colín Ortiz, Roberto.; Pérez Serna, J. Cruz.; Caballero Servín, Ángel.; García Romero, Jorge.; Ibarra López, L. Elena.; Cuéllar Espinoza, J. Adriana.; Bernal Vélez, Carlos. 2004. Seroprevalencia a leptospiras en grupos de riesgo de Guadalajara, Jalisco. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Volumen 24, Número 2. Disponible en:
http://www.amimc.org.mx/revista/2004/vol_24-2/seroprevalencia.htm
Accesado el 5 de Noviembre 2009.
50. Benavides, Lilia.; López, Edith.; Torres, Jorge. 2006. Niveles de anticuerpos anti*Leptospira* en la población humana aparentemente sana de la Ciudad de México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 37 No.2.
51. Navarrete-Espinosa, J.; Acevedo-Vales, J.A.; Huerta-Hernández, E.; Torres-Barranca, J.; Gavaldón-Rosas, D.G. 2006. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y *Leptospira* en la población de Jáltipan,

- Veracruz. Salud Pública de México, Vol.48, pp. 220-228.
52. 14^a Reunión Interamericana a nivel ministerial en salud y agricultura. 2005. Disponible en <http://www.paho.org/Spanish/ad/dpc/vp/rimsa-14.pdf> Accesado el 5 de Marzo de 2010.
 53. Vijayachari, P.; Sugunan, A. P.; and Shriram, A. 2008 .Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal Bioscience. Vol. 33, pp. 557–569
 54. Issazadeh, Kh.; Amirmozaffari, N.; Mehrabian, S.; and Oryan, H. 2009. Assessment of Distribution *Leptospira* Spp. In Surface Waters of Guilan Province. World Journal of Zoology, Vol.4, No. 2, pp. 79-84,
 55. Dolhnikoff, Marisa.; Mauad, Thais.; Bethlem, Eduardo P.; Carvalho, Carlos.; Ribeiro, Roberto. 2007. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. Brazilian Journal of Infectious Disease, Vol.11, No.1, pp. 142-148.
 56. Zavitsanou, Assimina.; Babatsikou, Fotoula. 2008. Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. Health Science Journal Vol. 2, No. 1.
 57. Narita, Masashi.; Fujitani, Shigeki.; Haake, David.; Paterson, David. 2005. Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama Islands, Japan. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene , Vol.73 No. 4, pp 652–656.

58. Green-McKenzie, J. 2005. Leptospirosis in humans. Disponible en: http://www.emedicine.com/emerg/INFECTIOUS_DISEASES.htm.
Accesado el día 5-Diciembre-2009.
59. Ricaldi, Jessica.; and Vinetz, Joseph M. 2006. Leptospirosis in the Tropics and in Travelers. Current Infectious Disease Reports. Vol.8, No.1, pp. 51–58
60. Wei, C.; Szu, M.; Jeng, M.; Hong, Jenn-Jye.; Yu, Chun-Chen.; Vandewalle, Alain.; And Huang, Chiu-Ching. 2000. *Leptospira* Outer Membrane Protein Activates NF-kappaB and Downstream Genes Expressed in Medullary Thick Ascending Limb Cells. Journal of the American Society of Nephrology Vol.11. pp. 2017-2026.
61. Leptospirosis. Oficina General de Epidemiología / Instituto Nacional de Salud, Lima. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/M%C3%B3dulo%20%C3%A9nico%20%20leptospirosis.PDF>. Accesado el 19 de Octubre 2009.
62. Segura, E.; Ganoza, C.; Campos, K.; Ricaldi, Jessica.; Torres, Sonia.; Silva, Herman.; Céspedes, Manuel.; Mattias, Michael.; Swancutt, Mark.; López Liñán, Renzo.; Gotuzzo, Eduardo.; Guerra, Humberto.; Gilman, Robert.; Vinetz, Joseph M. 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in an endemic region, with quantification of

- Leptospiral* burden. *Clinical Infectious Disease* , Vol.40, pp. 343–351
63. Vinetz, J.; Glass, G.; Flexner, C.; Mueller, Paul.; Kaslow, David.1996. Sporadic urban leptospirosis. *Annals of Internal Medicine*. Vol.125, pp. 794–798.
 64. Spichler, A.; Moock, M.; Chapola, E.; Vinetz, M. 2005. Weil's Disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, Vol. 9, pp. 336–340.
 65. Gunawardhana.; and Sellahewa, K. 2008. Clinical features of leptospirosis: a prospective descriptive study at the National Hospital of Sri Lanka (NHSL) in 2007. *Ceylon Medical Journal*, Vol. 53, No 4.
 66. Aroca, Gustavo.; Accini, José.; Pérez, Roberto.; Rodelo, Eduardo.; Dau, Hernando. 2004. Leptospirrosis icterica: Síndrome de Weil's. *Salud Uninorte*, Vol. 19, pp.31-40
 67. Levett, PN. 2001. Leptospirrosis. *Clinical Microbiology Review*, Vol.14, No. 2, pp. 296-326.
 68. Zunino, Enna.; Pizarro, P. Rolando. 2007. Leptospirrosis. Puesta al día. *Revista Chilena de Infectología*, Vol. 24, No. 3, pp. 220-226
 69. World Health Organization: Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, Geneva; 2003.
 70. Elizalde Campos, Tenorio.; Guajardo, Guadalupe.; Velasco Castrejón, Oscar. 2004. Identificación de *Leptospira* en la patogénesis de la uveítis

crónica en la ciudad de México Revista Mexicana de Oftalmología, Vol. 78, No.4 ,pp.165-170

71. Cinco, Marina.; Perticarari, Sandra.; Presanni, Gianni.; Dobrina, Aldo.; Liut, Franco. 1993. Biological activity of a peptidoglycan extracted from *Leptospira interrogans*: *in vitro* studies. Journal of General Microbiology, Vol.139, pp. 2959-2964.
72. Andrade, Lucia.; Rodrigues, Adilson.; Sanches, Talita R.; Souza, Rodrigo.; Seguro, Antonio Carlos. 2007. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. American Journal of physiology Renal Physiology, Vol.292, pp. 586-592.
73. Cornejo, Rodrigo.; Cortés, Claudia.; Luppi, Mario. 2001. Revista Hospital Clínico Universidad de Chile, Vol. 12, No. 3, 217-228.
74. Boza, Ricardo. 1999. Sobre la patogénesis de la leptospirosis. Revista Costarricense de Ciencias Médicas, Vol.20, No.1-2, pp.115-120.
75. Dobrina, A.; Nardon, E.; Vecile, E.; Cinco, M.; Patriarca, P.1995. *Leptospira icterohemorrhagiae* and Leptospire Peptidolgycans Induce Endothelial Cell Adhesiveness for Polymorphonuclear Leukocytes. Infection And Immunity, Vol.63, No. 8, pp. 2995-2999.
76. Cinco, M.; Banfi, E.; Soranzo, M. 1981. Studies on the interaction between macrophages and leptospire. Journal of General Microbiology, Vol. 124, pp.409–413.

77. Alves, Selmo.; LeFebvre, Rance.; Probert William. 2000. Memorias de Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.95, No.4, pp. 503-504
78. Adler, B.; Faine, S. 1977. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to *Leptospiral* infections. Infection and Immunity, Vol. 17, pp. 67–72.
79. Galya, Gancheva.; Atanasova, M.; Lukanov, Tz.; Ilieva, P. 2008. Flowcytometry in leptospirosis. Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers), libro 1.
80. Rao, R.; Gupta, N.; Bhalla, P.; Agarwal, K. 2003. Leptospirosis in India and the rest of the world. Brazilian Journal Infectious Disease, Vol.7, pp.178-93
81. Berdasquera Corcho, Denis.; Fernández Molina, Carmen.; Obregón, Ana Margarita.; Galindo Santana, Belkys. 2007. Leptospirosis humana en la atención primaria de salud: pautas para su prevención y control. Revista Cubana de Medicina General Integral, Vol. 23, No. 3. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol23_3_07/mgi09307.htm
Accesado el 5 Marzo de 2010.
82. Guide to Surveillance, Reporting and Control, Leptospirosis. Massachusetts Department of Public Health, Bureau of Communicable Disease Control. Disponible en : http://www.mass.gov/Eeohhs2/docs/dph/disease_reporting/guide/leptospir

[osis.pdf](#) Accesado el 25 de Febrero 2010.

83. Farace, M.I. 2008. Vigilancia epidemiológica de la leptospirosis. Situación en Argentina estudio y control de foco. Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes, Vol. 3, pp. 22-23.
84. Evans, Alfred.; Brachman, Philip S. 1998. Bacterial Infection of humans: epidemiology and control. Editorial Springer, New York, 3ra. Edición, pp. 888
85. Bharadwaj, Renu. 2004. Leptospirosis a reemerging disease?. Indian Journal of Medicine Research, Vol,120, No.3 pp. 136-138
86. Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano.
87. Centro de Control de Enfermedades. Disponible en :
<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-5/leptospirosis.aspx> Accesado el 6 de febrero de 2010
88. Galayanee, Doungchawee.; Uraiwan, Kositanont.; Anuchai, Niwetpathomwat.; Inwisai, Tasanee.; Sagarasaeranee, Plyyonk.; Haake, David A. 2008. Early Diagnosis of Leptospirosis by Immunoglobulin M Immunoblot Testing. Clinical and Vaccine Immunology, pp. 492–498
89. Saengjaruk, Patcharin.; Chaicumpa, Wanpen.; Watt, George.; Bunyaraksyotin, Gaysorn.; Wuthiekanun, Vanaporn.; Tapchaisri, Pramuan.; Sittinont, Chuanpit.; Panaphut, Thanachai.; Tomanakan,

- Kanchana.; Sakolvaree Yuwaporn Chongsa-Nguan, Manas.; Mahakunkijcharoen, Yuvadee.; Kalambaheti, Thareerat.; Naigowit, Pimjai.; Wambangco, Michael Angelo.; Kurazono, Hisao.; Hayashi, Hideo. 2002. Diagnosis of Human Leptospirosis by Monoclonal Antibody-Based Antigen Detection in Urine. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 480–489.
90. Ahmad, S.; Shah, S.; Ahmad, F. 2005. Laboratory diagnosis for leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, Vol.51, No.3, pp. 195-200.
91. Clinical Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/clinical-laboratory-diagnosis-of-leptospirosis.pdf> Accesado el 5 de Marzo 2010.
92. Solano Chinchilla, Antonio.; Boza Cordero, Ricardo.; Saenz Bolaños, Elizabeth. 1996. Leptospirosis en humanos. *Revista Costarricense de Ciencias Medicas*, Vol. 17, No. 2.
93. Vaishali, Dohe.; Sae, Pol.; Alka, Karmarkar.; Renu, Bharadwaj. 2009. Two Test Strategy for the Diagnosis of Leptospirosis. *Bombay Hospital Journal*, Vol. 51, No. 1, página 21.
94. Céspedes Zambrano, Manuel. 2002. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

95. Bajani, Mary.; Ashford, David.; Bragg, Sandra.; Woods, Christopher.; Aye, Tin.; Spiegel, Richard.; Plikaytis, Brian.; Perkins, Bradley.; Phelan, Maureen.; Levett, Paul.; Weyant, Robbin S. 2003. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *Journal of clinical Microbiology*, Vol.41, No.2, pp.803-809.
96. Collins, Richard. 2006. *The Biomedical Scientist*, pp.116-120.
97. Vigilancia basada en el laboratorio. Disponible en:
<http://www.ins.gob.pe/vigilancia/leptospirosis.asp?flgLP0=1> Accesado el 6 de Marzo de 2010.
98. Torres Tejeda, Alfredo.; Baca, Beatriz Eugenia.1995. Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, editado en la Universidad de Puebla. No. 23: 16-21
99. Christopher, Mathew G. 1991. *Protocols in human molecular genetics*. Humana press Inc. New Jersey, pp461
- 100 Merien, F.; Amouriaux, P.; Perolat, P.; Baranton, G.; Saint Girons, I. 1992. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.30, No.9, pp. 2219-2224.
- 101 Gravekamph, C.; Van de Kemp, H.; Franzen, M.; Carrington, D.; Schoone, G.; Van Eys, G.; Everard, C.; Hartskeer, R.; Terpstra, W. 1993. *Journal of general microbiology*, Vol.139, pp. 1691-1700.
- 102 Rodríguez Sánchez, Iram Pablo.; Barrera Saldaña, Hugo A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención.

Ciencia UANL, Vol. 7, No.3.

- 103 Pestana, Erika.; Belak, Sandor.; Diallo, Adama,.;Crowther, Jonh.; Viljoen, Gerrit J. 2010. Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real Time PCR Applications. Springer .New York .pp. 310
- 104 Espinosa Asuar, Laura. Guía Práctica sobre la PCR. Disponible en: www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf Accesado el 24 de Febrero de 2010.

XIV. ANEXOS

Anexo A

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Estos son los procedimientos recomendados por la OMS en su guía para el control y vigilancia de leptospirosis humana:

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

- 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.
- 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.

- Si ocurre un accidente, por el cual un miembro del personal se infecta o cree estar en riesgo de infección con leptospiras 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 calentar las muestras de suero (30 minutos a 56°C) eliminará muchos agentes infecciosos, pero no todos.
- 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.

El Centro de Control y Enfermedades en su publicación bioseguridad en los laboratorios de microbiología y biomedicina menciona que los riesgos en el laboratorio pueden darse y esto se debe a que el agente está presente en la orina, sangre y en tejidos de animales y humanos infectados. La ingestión, la inoculación parenteral accidental y el contacto directo e indirecto de la piel o de las membranas mucosas con cultivos o tejidos infectados o con fluidos corporales, especialmente con la orina son los principales riesgos en el laboratorio.

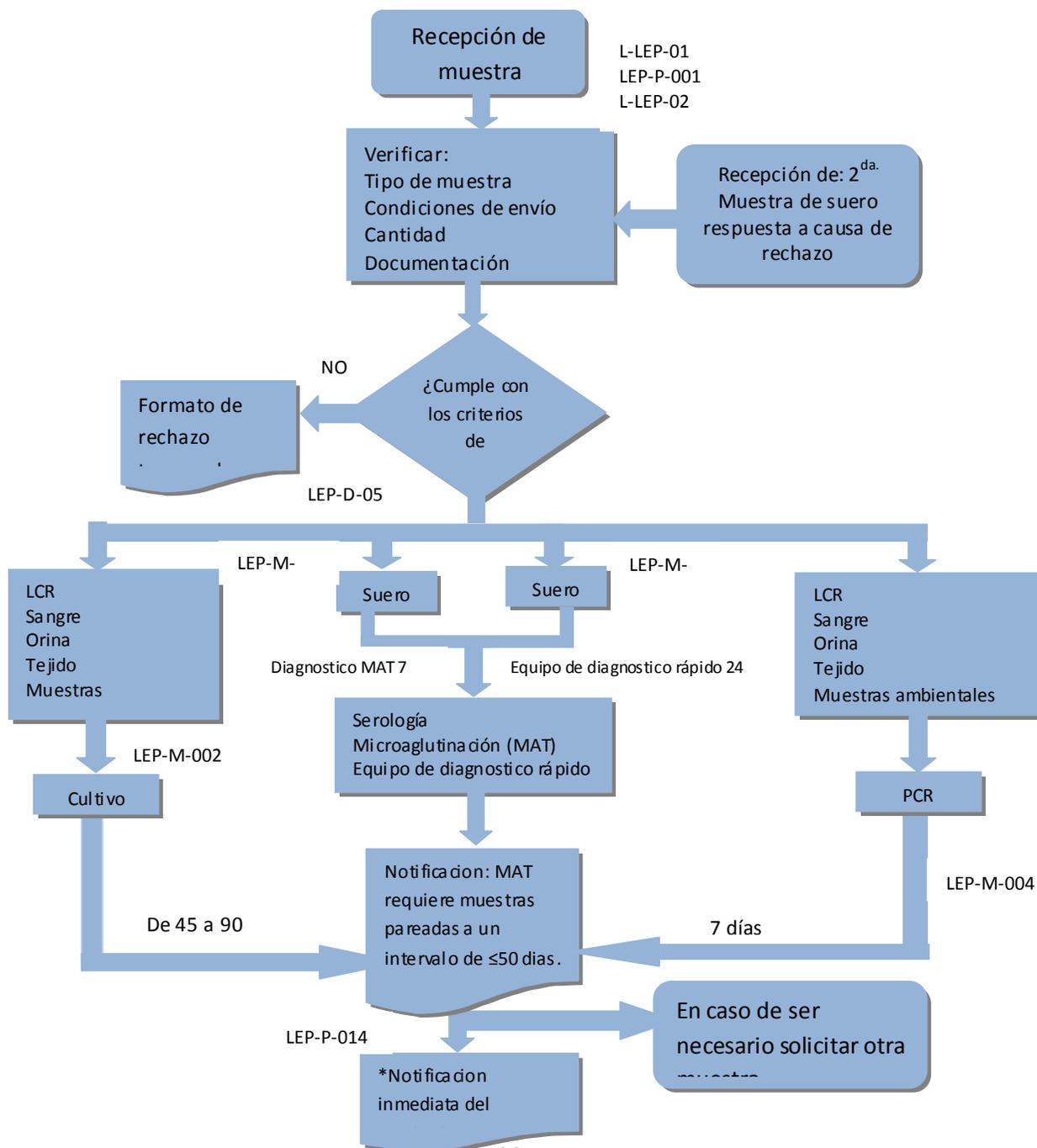
Debido a lo expuesto anteriormente se recomiendan las siguientes precauciones:

- Para todas las actividades que implican el uso o manipulación de tejidos, fluidos corporales o cultivos infectados o potencialmente infectados y para el alojamiento de animales infectados, se recomiendan las practicas, el equipo de contención y las instalaciones de Nivel de Bioseguridad 2.
- Se recomienda el uso de guantes para la manipulación y necropsia de animales infectados y cuando exista la posibilidad de contacto directo de la piel con materiales infecciosos.

Actualmente, no hay vacunas disponibles para su uso en humanos.

Anexo B

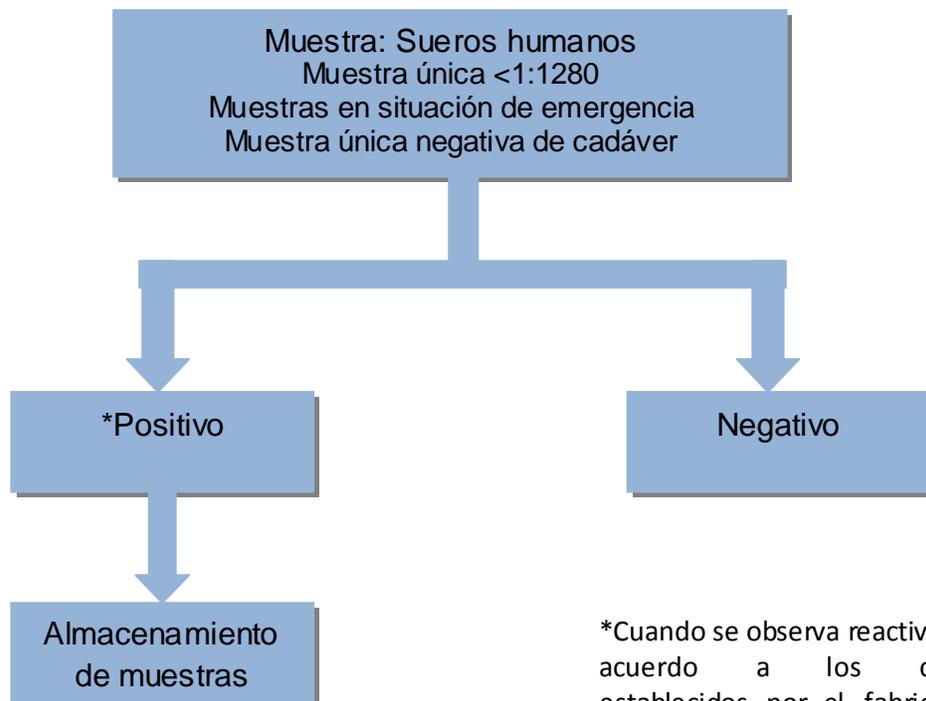
ALGORITMOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS RECEPCION DE MUESTRAS INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS



ALGORITMOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS POR
DETERMINACION DE IgM anti-*Leptospira*

INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS

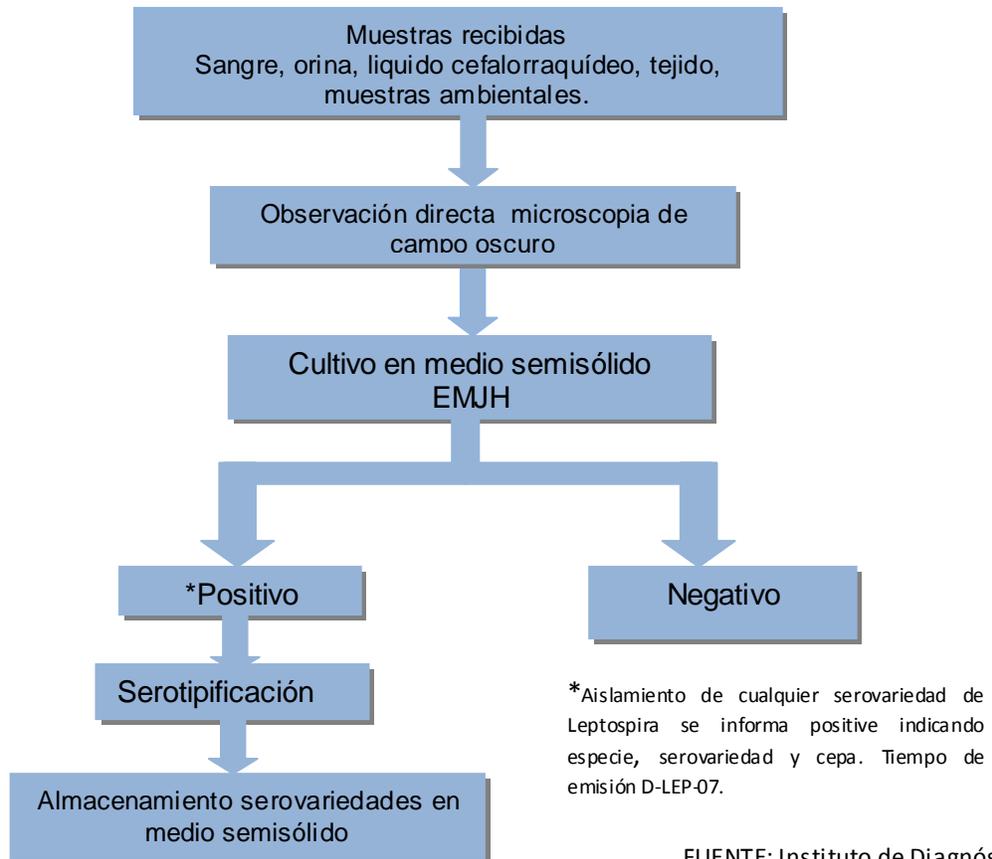
DETERMINACION DE LEPTOSPIROSIS POR
DETERMINACION DE IgM



FUENTE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE)

ALGORITMOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS POR AISLAMIENTO DE *Leptospira*

INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS

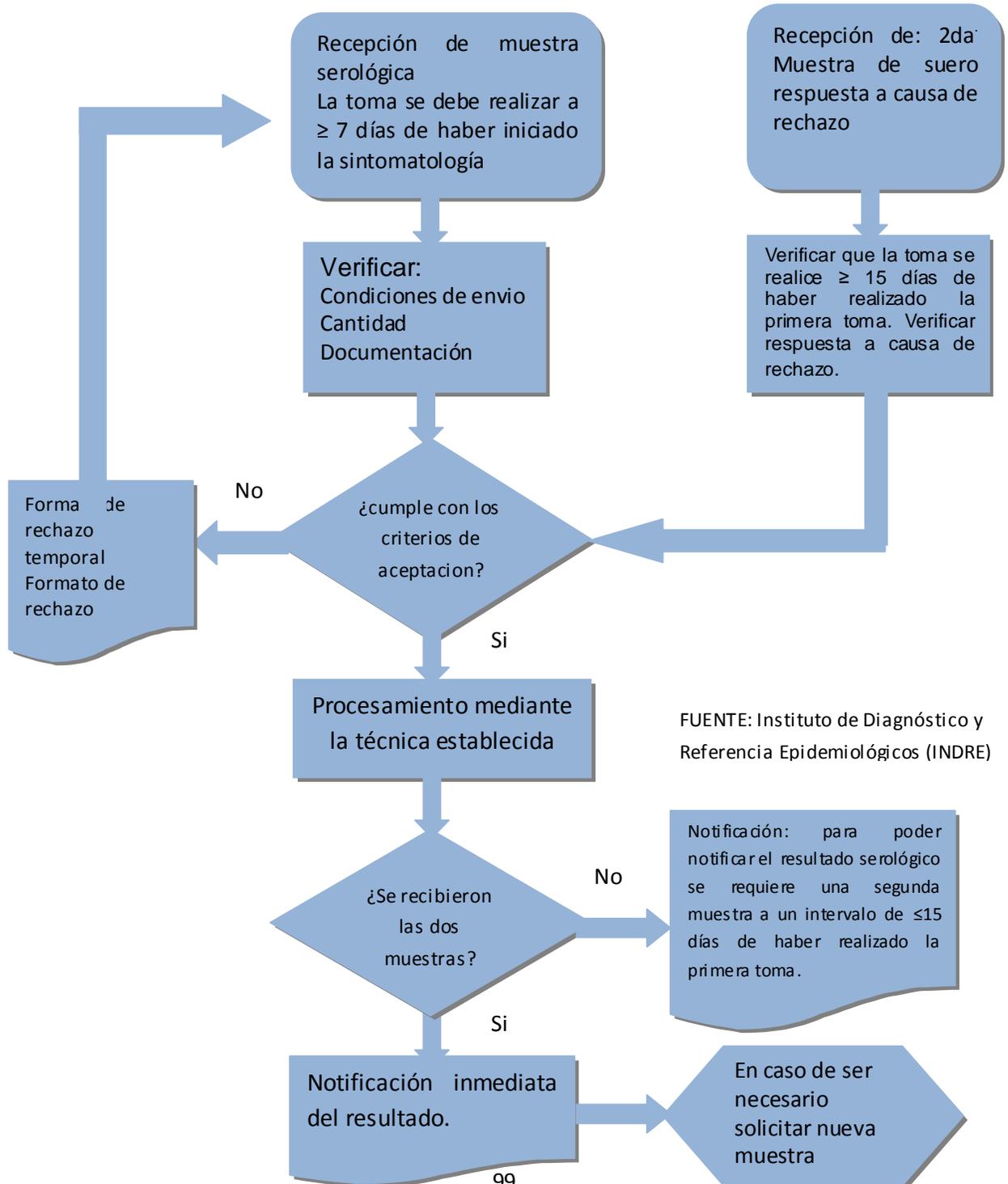


FUENTE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE)

Tipo de muestra	Cantidad	Observaciones
Sangre	3 a 5mL	Se requiere muestra estéril no lipémica. De preferencia sin anticoagulante, en el caso de requerirlo utilizar heparina. Transportar en refrigeración.
LCR	1mL	Se requiere estéril. Transportar a temperatura ambiente.
Tejido	1mm ³	Transportar en refrigeración, colocar la muestra de preferencia en solución reguladora de fosfatos estéril.
Orina	20 a 30mL	Realizar la toma del chorro medio, de la primera micción del día. Transportar a temperatura ambiente no más de 4 horas.
Aguas, lodos, etc.	250 a 500mL	Realizar la toma del área apacible.

ALGORITMOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS POR MICROAGLUTINACION

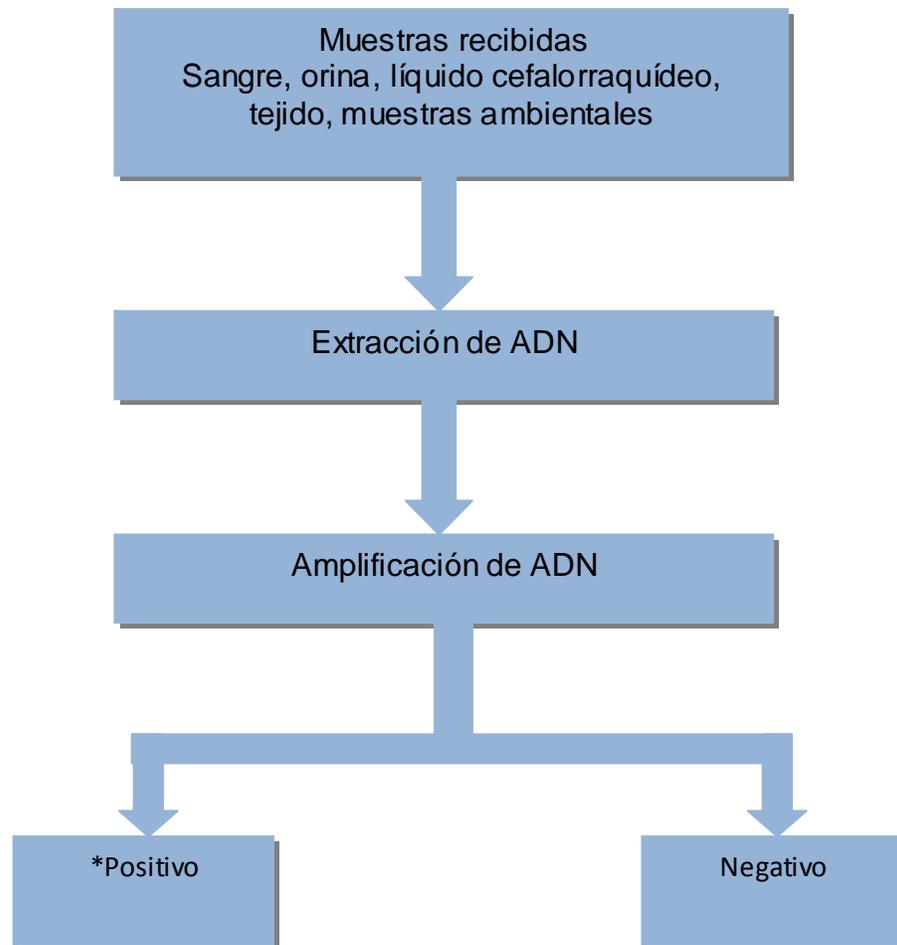
INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS



FUENTE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE)

**ALGORITMOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS POR
PCR**

INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS



FUENTE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE)

*Detección de ADN leptospiral el resultado solo se emite positivo al género *Leptospira*