

LEPTOSPIROSIS HUMANA:

GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO, VIGILANCIA Y CONTROL



Este documento no es una publicación formal de la Organización Panamericana de la Salud. El documento puede citarse, resumirse, reproducirse, en parte o en todo, siempre que se mencione la fuente y no para la venta ni con fines comerciales. Las opiniones cuyos autores se mencionan son de exclusiva responsabilidad de dichos autores. La mención de compañías comerciales específicas no significa que la Organización Panamericana de la Salud las endose o recomiende como de preferencia frente a otras compañías similares que no se mencionan.

Organización Mundial de la Salud

Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control / Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 2008.

127p.: il. (Serie de Manuales Técnicos, 12)

Traducción de: Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.

Bibliografía.

ISSN 0101-6970

1. Leptospirosis-diagnóstico. 2. Leptospirosis–prevención y control. 3. Leptospiras–aislamiento y purificación. 4. Pruebas serológicas. 5. Guía. I. Título.

AGRADECIMIENTOS (Versión inglesa)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desea expresar su gratitud por el apoyo técnico brindado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Centro Colaborador de Referencia e Investigación en Leptospirosis, Koninklijk Instituut voor de Tropen/Royal Tropical Institute (KIT) Investigación Biomédica en Ámsterdam, Holanda.

La OMS desea agradecer al Dr. T.J. Coleman, Director del Laboratorio del Servicio de Salud Pública, Unidad de Referencia de Leptospira en Hereford, Inglaterra, por su significativa contribución al contenido y edición de este documento y a la señora I. M. Struiksma, KIT, por su amplio apoyo secretarial.

La OMS desea también agradecer al gobierno de Italia por su contribución financiera a este proyecto.

AGRADECIMIENTOS (Versión en español)

La Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) quiere dejar constancia de su agradecimiento a la dedicación y esfuerzo de la Dra. Claudia M. E. Romero Vivas de la Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia en la traducción del presente documento. Desea, igualmente, reconocer la colaboración prestada en la tarea por la Dra. Bibiana Vanasco del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de Santa Fe, Argentina, a la Dra. Piedad Agudelo del Instituto Colombiano de Medicina Tropical, CES, Medellín, Colombia y la Dra. Saskia Hendrickx de la Organización Mundial de la Salud

Asimismo expresa su gratitud por el aliento y apoyo permanente del Centro Colaborador de Referencia e Investigación en Leptospirosis, el Royal Tropical Institute (KIT) de Ámsterdam, Holanda, en la persona del Dr. Rudy Hartskeerl.

CONTENIDO

PREFACIO A LA VERSIÓN EN ESPAÑOL.	6
PREFACIO A LA VERSIÓN ORIGINAL.	7
INTRODUCCIÓN.	9
I. MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.	11
II. PRESENTACIÓN CLÍNICA Y TRATAMIENTO.	15
III. APOYO DEL LABORATORIO.	19
IV. FUENTES DE INFECCIÓN ANIMAL.	29
V. TIPIFICACIÓN.	32
VI. TRANSMISIÓN Y EXPOSICIÓN.	35
VII. PREVENCIÓN E INTERVENCIÓN.	37
VIII. SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO, VIGILANCIA Y MANEJO DE BROTES.	40
ANEXO 1 DIRECCIONES DE CENTROS DE REFERENCIA, SOCIEDAD INTERNACIONAL DE LEPTOSPIROSIS (SIL) Y LABORATORIOS NACIONALES DE REFERENCIA EN AMÉRICA.	46
ANEXO 2 FACTORES DE RIESGO Y GRUPOS DE RIESGO.	55
ANEXO 3 CONTROL DE LA LEPTOSPIROSIS.	58
ANEXO 4 VIGILANCIA.	64
ANEXO 5 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA LEPTOSPIROSIS.	68
ANEXO 6 MICROSCOPIA Y COLORACIÓN.	72

ANEXO 7	LEPTOSPIRAS PATÓGENAS VERSUS SAPROFITAS.	75
ANEXO 8	SEROTIPIFICACIÓN Y PREPARACIÓN DE ANTISUERO DE CONEJO.	76
ANEXO 9	CLASIFICACIÓN BASADA EN ADN.	80
ANEXO 10	TÉCNICAS SEROLÓGICAS (MAT Y ELISA).	84
ANEXO 11	OTRAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS.	99
ANEXO 12	AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LEPTOSPIRAS.	103
ANEXO 13	AISLAMIENTO DE LEPTOSPIRAS USANDO ANIMALES DE DE LABORATORIO.	105
ANEXO 14	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	106
ANEXO 15	PRUEBAS COMERCIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SUERO, ANTICUERPOS MONOCLONALES Y CEPAS DE LEPTOSPIRA.	111
ANEXO 16	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	115
ANEXO 17	SEGURIDAD EN EL LABORATORIO.	123
	BIBLIOGRAFIA GENERAL.	124
	LISTA DE COLABORADORES.	124

PREFACIO A LA VERSIÓN EN ESPAÑOL

La Organización Panamericana de la Salud con la colaboración de la Sociedad Internacional de Leptospirosis promovió una serie de reuniones de expertos con el objetivo de establecer las necesidades existentes en la región americana en relación al diagnóstico de leptospirosis, la primera de las cuales tuvo lugar en México en febrero del 2004.

De las discusiones mantenidas quedó en claro que con el cierre del Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) y luego del Instituto Panamericano de Protección de alimentos y Zoonosis (INPPAZ) se había generado un vacío significativo al no contar la región con un laboratorio de referencia en torno al cual se pudiera estructurar una red de instituciones dedicadas al tema. De igual forma, se identificó la armonización de los procedimientos diagnósticos realizados en los laboratorios nacionales como una de las tareas prioritarias a ser realizadas para facilitar el intercambio de información técnica entre laboratorios y servicios de epidemiología.

Siguiendo estas líneas estratégicas, en marzo de 2008, la OPS/OMS tuvo el honor de comunicar al gobierno de Brasil la designación del Laboratorio Nacional de Referencia para Leptospirosis del Departamento de Bacteriología del Instituto Oswaldo Cruz como Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud – Organización Panamericana de la Salud, para leptospirosis. Igualmente, en un emprendimiento conjunto del Centro Colaborador para Referencia e Investigación en Leptospirosis de la OMS/FAO; Royal Tropical Institute, Ámsterdam, Holanda; del recién nombrado Centro Colaborador de la Fundación Oswaldo Cruz y la OPS/OMS se comenzó la distribución a los laboratorios nacionales de referencia del área de un cepario estandarizado por serología y biología molecular.

La presente traducción al español de la Guía para el Diagnóstico, Vigilancia y Control de la Leptospirosis se integra en el marco mencionado, ajustándose a la estrategia adoptada por la Organización Panamericana de la Salud de cooperar con los países promoviendo la cooperación horizontal y movilizando los recursos disponibles en la región.

Dr. Albino Belotto

Director del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa &
Jefe del Proyecto de Salud Pública Veterinaria

PREFACIO A LA VERSIÓN ORIGINAL

¿Por qué fue escrita esta guía?

La leptospirosis es un problema de salud pública mundial; en las áreas tropicales y subtropicales húmedas, donde se encuentran la mayoría de países en desarrollo, constituye un problema de mayor significación que en aquellos países que tienen un clima templado. La magnitud del problema en las regiones tropicales y subtropicales puede ser, en gran parte, atribuido a las condiciones climáticas y ambientales, pero también es consecuencia de la alta probabilidad de personas y animales entrar en contacto con ambientes contaminados con *Leptospira* debido, por ejemplo, a prácticas locales de agricultura, viviendas precarias con inadecuada disposición de residuos o desechos domiciliarios; todo lo cual da lugar a diferentes fuentes de infección. En los países con clima templado, además de las infecciones adquiridas localmente, la leptospirosis puede ser contraída por turistas, especialmente, aquellos que visitan la región tropical.

La leptospirosis puede, potencialmente, constituir una enfermedad grave aunque susceptible de ser tratada; sus síntomas pueden ser similares a los de otras infecciones no relacionadas, tales como influenza, meningitis, hepatitis, dengue o fiebres virales hemorrágicas. Algunas de estas infecciones, en particular el dengue, pueden dar lugar a grandes epidemias y los casos de leptospirosis que ocurran durante esas epidemias, pueden pasar desapercibidos. Por esta razón, es importante distinguir la leptospirosis del dengue y otras fiebres hemorrágicas en pacientes provenientes de países donde estas enfermedades son endémicas; aunque actualmente esto es aún difícil, nuevos desarrollos pueden reducir los problemas técnicos en un futuro cercano. Es necesario incrementar la conciencia y el conocimiento de la leptospirosis como un problema de salud pública y el objetivo de esta guía es asistir en ese proceso.

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

¿A quienes va dirigida esta guía?

Esta guía va dirigida a los trabajadores de la salud (médicos, técnicos de laboratorio, microbiólogos, trabajadores de salud pública, veterinarios y biólogos interesados en zoonosis) que no tienen un conocimiento especializado sobre la leptospirosis pero que desean tener una información general sobre el microorganismo en cuestión y la enfermedad que puede causar. La misma no constituye un manual y evita detalles técnicos, pero el lector interesado puede encontrar información adicional en los anexos y en la bibliografía general.

Debido a que el apoyo técnico es muchas veces difícil de encontrar en aquellos países donde los problemas clínicos son mayores, se hace énfasis en métodos relativamente simples aunque algunos de ellos no sean apropiados para la práctica de rutina. La información sobre la disponibilidad de apoyo técnico se encuentra en la lista de los centros expertos (*Anexo 1*).

La leptospirosis es un problema de salud humano y veterinario, sin embargo esta guía trata esencialmente la leptospirosis humana. El papel de los veterinarios en el control de la leptospirosis es

indiscutible, pero incluir información sobre leptospirosis veterinaria podría saturar al lector general. La guía tiene la forma de preguntas y respuestas y muchas de las preguntas están basadas en las preguntas frecuentes que reciben los centros de referencia a lo largo de estos años.

Perspectivas futuras

La leptospirosis pasa fácilmente desapercibida, es relativamente poco lo que se conoce sobre ella y pocos estudios se llevan a cabo respecto de la enfermedad colaborando así a que continúe pasando desapercibida. Esta guía tiene como propósito incrementar la atención sobre la misma pues mejores programas de diagnóstico y vigilancia romperían este círculo vicioso.

Esta guía será actualizada a intervalos regulares. El lector puede dirigirse a la Secretaría de la Sociedad Internacional de Leptospirosis (Anexo 1) para obtener mayor información sobre la Sociedad y sobre la leptospirosis.

La guía fue realizada por un grupo de personas pertenecientes a la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad Internacional de Leptospirosis.

INTRODUCCIÓN

Leptospirosis

¿Qué es la leptospirosis?

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas llamadas leptospiras que son transmitidas, directa o indirectamente, desde los animales a los seres humanos siendo, por tanto, una zoonosis. La transmisión entre humanos ocurre muy raramente.

Distribución

¿Dónde ocurre la leptospirosis?

La leptospirosis ocurre en todo el mundo, pero es más común en las áreas tropicales y subtropicales con altos índices de precipitación. La enfermedad se encuentra en cualquier lugar en donde los humanos entran en contacto con la orina de animales infectados o un ambiente contaminado con orina.

Incidencia

¿Qué tan frecuente es la leptospirosis a nivel mundial?

El número de casos humanos que ocurren mundialmente no es conocido con precisión. De acuerdo con los reportes disponibles, la incidencia anual varía dentro de un rango desde, aproximadamente 0.1-1 por 100 000 en climas templados hasta 10 -100 por 100.000 en climas húmedos tropicales. Cuando se producen brotes, y en los grupos con alto riesgo de exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 por 100.000 (*Anexos 2, 3 y 4*).

Desconocimiento y subregistro

¿Por qué la leptospirosis no es reconocida?

La leptospirosis puede presentarse con una diversidad de manifestaciones clínicas que pueden variar desde una enfermedad pseudo gripal leve hasta una enfermedad seria que puede llegar a ser fatal. La leptospirosis también puede mimetizar otras enfermedades, como por ejemplo el dengue y otras enfermedades hemorrágicas virales.

La ictericia, es un síntoma relativamente común en leptospirosis pero que también puede ser encontrado en otras enfermedades que involucran el hígado como las diversas formas de hepatitis. Otros síntomas (*ver Anexo 5*) son menos comunes y no son reconocidos como posibles indicadores de una infección por leptospiras.

El diagnóstico es confirmado con pruebas de laboratorio, pero estas no están siempre disponibles, especialmente en países en desarrollo.

Por estas razones la leptospirosis es pasada por alto y subregistrada en muchas áreas del mundo.

Historia

¿Cuál es la historia de la leptospirosis?

Adolf Weil describió la leptospirosis como una enfermedad en el año 1886, su nombre aún es relacionado a la forma severa de la leptospirosis, también

conocida como enfermedad de Weil y que es tradicionalmente atribuida a una infección transmitida por ratas, causada por los serovares icterohaemorrhagiae y copenhageni (Ver serovar Pág. 1). Hoy en día, se considera preferible referirse a todas las infecciones con leptospiras como leptospirosis, independiente de los síntomas y signos clínicos (*Anexo 5*).

No fue sino hasta la segunda década del siglo XX que las leptospiras fueron reconocidas por Inada e Ido en Japón y muy poco después, e independientemente, en Alemania por Uhlenhuth y Fromme como la causa de la enfermedad que había sido originalmente descrita por Weil.

I. MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Microorganismos patogénicos

¿Qué son las leptospirosis?

Las leptospirosis son bacterias que pueden ser patógenas (es decir que tienen el potencial de causar enfermedad en animales y humanos) o saprofitas (de vida libre y que generalmente no causan enfermedad)

En la naturaleza, las leptospirosis patógenas son mantenidas en los túbulos renales de ciertos animales.

Las leptospirosis saprofitas se encuentran en diversos tipos de ambientes líquidos o húmedos, que comprenden desde aguas superficiales y suelos húmedos hasta agua del grifo. Leptospirosis saprofitas halofílicas (resistentes a la sal) son encontradas en agua de mar.

Morfología

¿Cómo es la morfología de las leptospirosis?

Las leptospirosis tienen forma parecida a la de un sacacorchos y difieren de las otras espiroquetas por la presencia de ganchos en los extremos. Pertenecen al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, género *Leptospira*. Siendo demasiado delgadas para ser visibles bajo un microscopio normal, la microscopía de campo oscuro (Anexo 6) es la más usada su observación. Todas las leptospirosis son muy parecidas, con solo algunas diferencias mínimas, por lo cuál la morfología no ayuda a diferenciar entre leptospirosis patógenas o saprofitas o entre las diferentes leptospirosis patógenas.

Saprofitas

¿Cuál es la importancia médica de las leptospirosis saprofitas?

Se supone que las leptospirosis saprofitas no causan enfermedad; aunque es posible encontrarlas, ocasionalmente, en cultivos provenientes de material clínico, el significado de su presencia es incierto. Su mayor importancia en microbiología médica es como contaminante de materiales supuestamente estériles o al menos libres de saprofitas. Pueden encontrarse en cultivos cuando no se pudo mantener la esterilidad durante la preparación del medio de cultivo, cuando se utilizaron ingredientes no estériles en la preparación del medio de cultivo o cuando las muestras clínicas no fueron obtenidas asépticamente.

Patógenas y saprofitas

¿Cómo se pueden distinguir las leptospirosis patógenas de las saprofitas?

Existen varias pruebas basadas en condiciones de cultivo y en propiedades antigénicas o genéticas que pueden ser usadas para diferenciar entre leptospirosis patógenas y saprofitas (Anexo 7).

Huéspedes naturales de mantenimiento

¿Las leptospirosis patógenas siempre causan enfermedad?

Ciertas especies de animales vertebrados tienen una relación comensal con las leptospirosis en la cual actúan como huéspedes naturales de mantenimiento de las leptospirosis patógenas que viven en sus riñones. Estas leptospirosis causan poco o ningún daño para estos huéspedes que, sin embargo mantienen la infección y son conocidos como huéspedes naturales de mantenimiento. Si otros animales que no son huéspedes naturales de mantenimiento (incluyendo los seres humanos) se infectan por la misma *Leptospira* patógena, generalmente se enferman. Si un huésped de mantenimiento para una *Leptospira* en particular es infectado con otro serovar (ver abajo), puede desarrollar los síntomas y signos de la leptospirosis.

Serovar

¿Puede distinguirse las leptospirosis patógenas entre ellas?

Sí, la unidad básica es el serovar, que se define sobre la base de similitudes y diferencias antigénicas como las reveladas en la llamada prueba de absorción de aglutinación cruzada (Anexo 8). Cada serovar tiene una conformación antigénica característica.

Número de serovares

¿Existen muchos serovares?

Sí, se han descrito alrededor de 200 serovares patógenos, los que han sido agrupados en 25 serogrupos en base a sus similitudes antigénicas. Cepas distintas, con pequeñas diferencias antigénicas, pueden algunas veces encontrarse dentro de ciertos serovares.

Importancia del concepto de serovar

¿Cuál es la importancia práctica del concepto de serovar?

Tiene importancia epidemiológica pues un determinado serovar puede desarrollar una relación comensal o de leve patogenicidad con determinada especie animal. Por ejemplo, el ganado vacuno es a menudo asociado con el serovar hardjo, los perros con canicola y las ratas con icterohemorrágica y copenhageni.

El concepto de serovar ha sido ampliamente aceptado y tiene una base práctica (Anexos 8 y 9).

***Leptospira* spp.**

¿Hay otras formas de clasificación de las leptospirosis?

Sí, el concepto de especie. Inicialmente fueron reconocidas dos especies, la llamada patógena *Leptospira interrogans* y la saprofita *Leptospira biflexa*. Recientemente, varias especies de *Leptospira* (Anexo 9) han sido diferenciadas sobre la base de la relación entre sus ADN.

Nuevas investigaciones pueden revelar la existencia de más especies de las reconocidas actualmente.

Los dos sistemas de clasificación basados en los conceptos de serovar y especie no siempre coinciden y cepas pertenecientes al mismo serovar pueden pertenecer a diferentes especies de *Leptospira*.

Huéspedes accidentales o incidentales

¿Qué es un huésped accidental o incidental?

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

La distinción entre huéspedes naturales y accidentales o incidentales no siempre está claramente definida debido a que la interacción entre leptospiras patógenas y la especie animal hospedera es dinámica y las leptospiras se pueden adaptar a nuevas especies animales.

Patogenia

¿Qué pasa con las leptospiras patógenas después de haber penetrado en el cuerpo humano?

Después de la infección, las leptospiras aparecen en la sangre e invaden prácticamente todos los tejidos y órganos. Ellas son, subsecuentemente, eliminadas del organismo por la respuesta inmune del huésped, no obstante lo cual, pueden asentarse en los túbulos contorneados de los riñones y ser eliminadas en la orina por un período de pocas semanas a varios meses y ocasionalmente por un lapso mayor. Son luego eliminadas de los riñones y otros órganos aunque pueden persistir en los ojos por mucho más tiempo.

Repuesta de anticuerpos

¿Cuál es la naturaleza de la respuesta de anticuerpos?

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

La seroconversión puede ocurrir de 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad pero algunas veces solo después de 10 días o incluso más (Ver Muestras clínicas, Pág. 9 y detección de anticuerpos, Pág.10).

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

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

Los anticuerpos son dirigidos contra (*Anexo 8*):

- Antígenos comunes (llamados antígenos género específicos) que son compartidos por todas las leptospiras tanto patógenas como saprofitas;
- Antígenos serovar específicos y serogrupo específicos.

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

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

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

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

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

Inmunidad protectora

¿Es la respuesta de anticuerpos protectora?

Generalmente, se cree que los anticuerpos serovar específicos son protectores y que un paciente es inmune a la reinfección con el mismo serovar mientras que la concentración (título) de anticuerpos sea lo suficientemente alta. Anticuerpos provocados por la infección con un serovar particular no necesariamente protegen contra la infección con otros serovares.

II. PRESENTACIÓN CLÍNICA Y TRATAMIENTO

Manifestaciones clínicas

¿Cuáles son las manifestaciones clínicas de la leptospirosis?

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son muy variables (Ver: Es esto leptospirosis?, (Pág. 6 y Anexo 5).

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, p.ej. dengue y otras fiebres hemorrágicas, es particularmente común en los trópicos (Anexo 5), además, las presentaciones clínicas se pueden superponer en la medida en que la infección progresa.

Morbilidad

¿Cuál es la morbilidad de la leptospirosis?

No hay seguridad, la leptospirosis puede ser subdiagnosticada porque

- (a) el diagnóstico es difícil de confirmar
- (b) puede ser confundida con otras enfermedades
- (c) la enfermedad puede ser leve y no ser investigada en el laboratorio

Hallazgos de laboratorio

¿Cuáles son los hallazgos de laboratorio en pacientes con leptospirosis?

El estudio de muestras de pacientes hospitalizados ha revelado varias anomalías no diagnósticas incluyendo tasas elevadas de sedimentación eritrocítica, trombocitopenia, leucocitosis, hiperbilirrubinemia y niveles elevados de creatinina sérica, creatinina quinasa y amilasa sérica.

Patogénesis

¿Cuál es la causa del cuadro patológico en leptospirosis?

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son consecuencia de los daños provocados en la capa endotelial de pequeños vasos sanguíneos por mecanismos poco entendidos todavía. Todos los órganos internos pueden ser afectados, lo que explica el amplio rango de manifestaciones clínicas, p.ej. nefritis intersticial y tubular, lesiones glomerulares y vasculares en riñones que determinan la uremia y la oliguria/anuria; daño vascular de capilares hepáticos, en ausencia de necrosis hepatocelular, causando la ictericia; inflamación de las meninges causando dolor de cabeza, cuello rígido, confusión, psicosis, delirio, etc.; la trombocitopenia (reducción en el número de plaquetas) que puede llevar al sangrado.

Tasa de letalidad	¿Cuál es la tasa de letalidad debida a leptospirosis? Las tasas de letalidad que han sido reportadas en diferentes partes del mundo varían en un rango inferior al 5% hasta 30%. Estas cifras no son muy confiables debido a que en muchas áreas la ocurrencia de la enfermedad no está bien documentada. Además, los casos leves pueden no ser diagnosticados como leptospirosis. Mejoras importantes en el pronóstico de la leptospirosis grave o severa se ha hecho en las últimas décadas, gracias al uso de hemodiálisis como manera de manejar la falla renal reversible que puede ocurrir en algunos casos y a una agresiva implementación de medidas de soporte.
Causa de muerte	¿Si un paciente muere de leptospirosis cuál es la causa de la muerte? Entre las causas principales de muerte están la falla renal, falla cardiopulmonar y la hemorragia extensiva; la falla hepática es rara, aún cuando se presente ictericia.
Recuperación	¿Si un paciente sobrevive, se recupera completamente de la leptospirosis? La mayoría de los pacientes se recuperan completamente de la leptospirosis, sin embargo, en algunos pacientes esta recuperación puede tomar meses o años y se pueden presentar secuelas a largo plazo.
Secuelas a largo plazo	¿Cuáles son las secuelas de la leptospirosis? Las secuelas a largo plazo incluyen fatiga crónica y otros síntomas neuropsiquiátricos tales como dolor de cabeza, paresias, parálisis, cambios de humor y depresión. En algunos casos, pueden ocurrir uveítis e iridociclitis como una presentación tardía de la leptospirosis. Los síntomas oculares pueden ser atribuidos a la persistencia de las leptospiras en los ojos, en donde están protegidas de la respuesta inmune del paciente. Además del compromiso ocular, se desconocen otros síntomas tardíos o persistentes. La existencia de infecciones persistentes o crónicas no ha sido confirmada y las “cicatrices” causadas durante la fase aguda de la enfermedad no han sido demostradas.
Embarazo	¿Cuál es el resultado de la leptospirosis durante el embarazo? La leptospirosis durante el embarazo puede ocasionar muerte fetal, aborto, nacimiento prematuro o leptospirosis congénita, pero pocos casos han sido reportados.
Virulencia	¿Por qué algunos pacientes sufren una leptospirosis severa y otros una forma leve de la enfermedad? Los factores que influyen la virulencia de las leptospiras son poco entendidos. Algunos serovares tienden, en general, a causar una enfermedad leve

mientras otros ocasionan una enfermedad severa. Sin embargo, no existe una presentación específica de la infección para un serovar y cualquier serovar puede causar una enfermedad leve o severa dependiendo del huésped. Factores relacionados con el paciente tales como la edad y múltiples problemas médicos subyacentes están frecuentemente asociados con una presentación clínica más severa y un incremento de la mortalidad. La dosis infectante también puede tener influencia en el curso de la leptospirosis.

Es esto leptospirosis?

¿Cuándo los médicos deben considerar un diagnóstico de leptospirosis?

El diagnóstico de la leptospirosis debe ser considerado en cualquier paciente que presente fiebre súbita, escalofríos, inyección conjuntival, dolor de cabeza, mialgia e ictericia.

El diagnóstico es más difícil cuando los pacientes presentan síntomas tales como tos, disnea, náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, artralgias y erupción en la piel. La inyección de la conjuntiva y el dolor muscular, más notable en las áreas lumbares y pantorrillas, son los hallazgos clínicos más distintivos (Ver estudios basados en hospitales, Anexo 4, A4, 2, 1, Pág. 43 y Anexo 5).

La sospecha se incrementará si hay historia de exposición ocupacional o recreacional a animales infectados o a un ambiente potencialmente contaminado con orina animal. Una vez que se haya considerado la posibilidad de la leptospirosis se deben aplicar pruebas apropiadas de diagnóstico y manejo clínico.

Período de incubación

¿Qué tan largo es el período de incubación?

El período de incubación es usualmente de 5 -14 días, con un rango entre 2 y 30 días.

Tratamiento con antibióticos

¿Cuál es el tratamiento óptimo para la leptospirosis?

El tratamiento con antibióticos efectivos debe ser iniciado tan pronto como se sospeche un diagnóstico de leptospirosis y preferiblemente antes del quinto día de la aparición de la enfermedad.

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

Los médicos nunca deben esperar los resultados del laboratorio para empezar el tratamiento con antibióticos debido a que las pruebas serológicas no son positivas hasta cerca de la semana después de la aparición de los síntomas y los cultivos pueden no resultar positivos hasta después de varias semanas.

Antibióticos

¿Cuáles son los antibióticos más adecuados para tratar la leptospirosis?

Los casos severos de leptospirosis deben ser tratados con altas dosis de penicilina endovenosa. Los casos menos severos pueden ser tratados con antibióticos orales tales como la amoxicilina, ampicilina, doxiciclina o

eritromicina. Cefalosporinas de tercera generación, tales como ceftriaxona y cefotaxime, y antibióticos quinolónicos parecen ser también efectivos. Reacciones de Jarisch-Herxheimer pueden ocurrir después del tratamiento con penicilina.

Experimentos *in vitro* y con animales han demostrado que las leptospirosis son sensibles a un amplio rango de antibióticos pero hay, desafortunadamente, una limitada experiencia clínica con muchos de los nuevos antibióticos.

Tratamiento de apoyo y hemodiálisis

En casos severos se hace necesario la admisión hospitalaria. Un agresivo cuidado de soporte con estricta atención al balance de líquidos y electrolitos es esencial. Realizar diálisis peritoneal o hemodiálisis es lo indicado en caso de falla renal. Un excelente cuidado de soporte y la utilización de diálisis han reducido la mortalidad de esta enfermedad en los últimos años.

La enfermedad en animales

¿Los animales infectados con leptospirosis desarrollan la enfermedad?

No. Los animales que son huéspedes naturales de un serovar en particular usualmente no muestran o muestran muy pocos efectos de la enfermedad frente a ese serovar, sin embargo, ellos pueden desarrollar la enfermedad después de infectarse con otro serovar.

En la etapa inicial de la infección, los animales pueden mostrar síntomas leves, tales como malestar y reducción en la producción de leche en vacas. Infecciones crónicas pueden llevar a problemas reproductivos, tales como abortos y baja fertilidad en vacas o cerdos. Una infección leve en animales domésticos puede pasar inadvertida. Ocasionalmente, los terneros y lechones pueden sufrir un síndrome icterohemorrágico con un desenlace potencialmente fatal.

Como en humanos, los animales que son huéspedes incidentales pueden enfermarse de una forma severa y las infecciones pueden ser fatales. Los perros pueden sufrir de una enfermedad crónica que conduce a un daño renal, pero también pueden sufrir una enfermedad aguda parecida al síndrome de Weil después de la infección con ciertos serovares.

III. APOYO DEL LABORATORIO

Facilidades básicas **¿Qué se necesita para establecer un laboratorio de diagnóstico básico para leptospirosis?**

Los requerimientos generales son esencialmente los mismos que para cualquier laboratorio de diagnóstico microbiológico en términos de equipo, personal técnico y entrenamiento, prácticas de seguridad de laboratorio, etc. Ayuda y asesoría está disponible a partir de las fuentes de expertos listados en el *Anexo 1*.

La necesidad del laboratorio **¿Por qué es necesario el apoyo de un laboratorio para leptospirosis?**

El apoyo del laboratorio es necesario para:

1. Confirmar el diagnóstico; la leptospirosis es difícil de diferenciar desde el punto de vista clínico de un gran número de enfermedades. Los métodos de laboratorio ayudan a confirmar la leptospirosis en donde se sospecha la enfermedad en base a los aspectos clínicos.
2. Razones epidemiológicas y de salud pública; tales como determinar el serovar que está causando la infección, la probable fuente de infección, el reservorio potencial y su ubicación, todo lo que contribuye a definir las estrategias de control.

Métodos de diagnóstico **Qué métodos están disponibles para el diagnóstico de la leptospirosis en el laboratorio?**

La enfermedad es usualmente diagnosticada en el laboratorio mediante la detección de anticuerpos, (serodiagnóstico, *Anexos 10 y 11*), el cultivo de la bacteria a partir muestras de sangre, orina o tejidos (*Anexos 12 y 13*), o por la demostración de la presencia de leptospiras en los tejidos usando anticuerpos conjugados con marcadores de fluorescencia. Algunos centros disponen de otros métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la inmunotinción (*Anexos 6, 13 y 14*).

Muestras clínicas **Qué muestras clínicas deben ser colectadas para examen?**

Esto depende de la fase de infección; las leptospiras usualmente circulan en la sangre del paciente por aproximadamente 10 días después de la aparición de la enfermedad. También aparecen en otros fluidos corporales, tales como orina y líquido cefalorraquídeo, unos pocos días después de la aparición de la enfermedad y penetran a órganos internos durante este tiempo. Títulos detectables de anticuerpos aparecen en la sangre de 5 - 10 días después de la aparición de la enfermedad aunque algunas veces pueden tardar más, especialmente si se implementó tratamiento con antibióticos.

Las muestras apropiadas y que más comúnmente se colectan en consecuencia, son:

1. Sangre con heparina (para prevenir coagulación) para cultivo (*Anexo 12*) en los primeros 10 días. El cultivo de la sangre después de los 10 días de la aparición de la enfermedad no es recomendado, ya que las leptospiras han desaparecido en su mayoría de la sangre y los anticuerpos habrán comenzado a ser detectables en el suero permitiendo el serodiagnóstico. Muestras para cultivo deben ser guardadas y transportadas a temperatura ambiente, debido a que las bajas temperaturas son perjudiciales para las leptospiras patógenas.
2. Sangre coagulada o suero para serología (*Anexos 10 y 11*). Deben obtenerse preferiblemente dos muestras con un intervalo de varios días en base a la fecha de aparición o inicio de la enfermedad y el tiempo probable de seroconversión. El análisis de muestras pareadas es necesario para detectar un incremento en los títulos entre ambas muestras o la seroconversión, y por tanto para confirmar el diagnóstico de la leptospirosis (Ver importancia de la serología p.10). Un resultado serológico negativo en la fase aguda de la enfermedad no excluye la leptospirosis.
3. Orina para cultivo (*Anexo 12*). Las leptospiras mueren rápidamente en la orina por lo que el uso de orina para cultivo puede ser valioso solamente cuando es posible obtener una muestra limpia que pueda ser inoculada en un medio de cultivo apropiado en no más de 2 horas después de haber sido recogida. La supervivencia de las leptospiras en la orina ácida puede incrementarse haciendo la orina neutra.
4. Muestras postmortem (*Anexo 12*). Es importante coleccionar muestras del mayor número de órganos posibles, incluyendo cerebro, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, pulmones, riñones, hígado, páncreas y corazón, y si es posible, sangre del corazón, para serología. Los especímenes coleccionados dependerán de los recursos disponibles y de las restricciones culturales que puedan existir en la sociedad. Las muestras postmortem deben ser obtenidas asépticamente y tan pronto como sea posible después de la muerte; deben ser inoculadas en el medio de cultivo lo más rápido que se pueda. Las muestras deben ser guardadas y transportadas a + 4°C, previniendo la autólisis de las células a 4°C y una consecuente disminución del pH, lo que compensará la reducción en la viabilidad de las leptospiras patógenas a bajas temperaturas. Tejidos frescos o fijados pueden ser también examinados para la presencia de leptospiras usando anticuerpos marcados con marcadores de fluorescencia. Además, otros métodos como tinción con plata, inmunotinción e inmunohistoquímica pueden ser de utilidad pero son técnicamente demandantes y requieren de una experiencia considerable para su correcta interpretación (*Anexo 6*).
5. Líquido cefalorraquídeo y dializado para cultivo (*Anexo 12*).

La serología es usada a menudo para el diagnóstico

¿Cuál es el método de laboratorio más frecuentemente usado para el diagnóstico de la leptospirosis?

Los métodos actuales para la detección directa (*Anexos 6, 12, 13 y 14*) de leptospiras son lentos o de limitada confiabilidad por lo que la serología es, la mayoría de las veces, el método de diagnóstico más apropiado. Además, en la práctica, los pacientes muy frecuentemente buscan la ayuda médica o son

admitidos en los hospitales cuando ya han estado enfermos por un período de tiempo lo suficientemente largo para producir anticuerpos detectables.

Importancia de la serología

¿La serología positiva es una evidencia de una infección actual?

No siempre; la detección de anticuerpos no es, en sí misma, prueba de una infección actual debido a que algunos anticuerpos pueden persistir por largos períodos de tiempo después de una infección.

Generalmente, la seroconversión (primera muestra, títulos no son detectables, segunda muestra positiva, encima del punto de corte) o un incremento del título de cuatro veces o mas (primera muestra, título bajo, segunda muestra, un título muchísimo mas alto) en muestras de suero consecutivas es considerado prueba o confirmación diagnóstica de infección reciente o actual.

Un título alto de IgM, p.ej. un título varias veces superior al punto de corte (Ver punto de corte para la MAT, p.12) en una única muestra de suero como la detectada por ELISA o una prueba similar (Ver ELISA / otras pruebas comerciales, p.13) es consistente con una leptospirosis reciente o actual, pero se debe tener en cuenta que los anticuerpos clase IgM pueden permanecer detectables por varios meses e incluso años.

Los datos de la serología son importantes en el proceso diagnóstico pero deben ser siempre considerados en conjunto con la presentación clínica y los datos epidemiológicos (una historia de posible exposición, presencia de factores de riesgo). El aislamiento de leptospirosis patógenas es la única prueba directa y definitiva de infección.

Detección de anticuerpos

¿Cómo son detectados los anticuerpos?

Los anticuerpos (género específicos, serovar específicos y serogrupo específicos) reaccionan con antígenos (*Anexo 8*) y, las pruebas serológicas ponen en contacto el suero del paciente con los antígenos. En algunas pruebas el antígeno consiste en leptospirosis vivas mientras que en otras, se utilizan extractos de leptospirosis como antígenos. El título detectado en la sangre dependerá de las concentraciones relativas y la fuerza de las reacciones entre los anticuerpos y los antígenos. El título puede ser medido preparando diluciones del suero y determinando la más alta dilución en la cuál la reacción puede aún ser detectada; la dilución final que resulta en una reacción detectable es denominada el título. El título es algunas veces llamado también "título positivo" o "título significativo" si está sobre cierto nivel, llamado el punto de corte (ver Punto de corte para la MAT, p.12). El título de anticuerpos se incrementa gradualmente durante la enfermedad, alcanza un pico y luego cae después de la recuperación del paciente. La interpretación de una reacción serológica débil no siempre es clara ya que puede representar una fase muy temprana de la respuesta inmune, una muy tardía o tratarse de reacciones no específicas. Además, títulos bajos o una respuesta retardada pueden ser observados en casos severos, en pacientes inmunosuprimidos y en aquellos en que altas dosis de antibióticos fueron administradas en la fase temprana de la enfermedad.

Pruebas serológicas

¿Qué métodos son usados para el serodiagnóstico?

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) (*Anexo 10*) es considerada la “prueba de oro” o la piedra angular del serodiagnóstico por su insuperable especificidad diagnóstica (serovar/serogrupo) en comparación con las otras pruebas disponibles actualmente.

Una variedad de otros métodos serológicos, incluyendo la ELISA (*Anexos 10 y 11*) han sido desarrollados, muchos de los cuales constituyen pruebas de tamizaje de leptospirosis relativamente simples.

MAT

¿Qué es la prueba de aglutinación microscópica (MAT por sus siglas en inglés)?

La MAT es una prueba que determina los anticuerpos aglutinantes en el suero de un paciente mediante la mezcla de varias diluciones de éste con leptospirosis vivas o muertas (formolizadas). Los anticuerpos antileptospirosis presentes en el suero hacen que las leptospirosis se peguen unas a otras formando grumos. Este proceso de agrupamiento es llamado aglutinación y es observado usando microscopía de campo oscuro (*Anexo 6*). Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG.

Especificidad de la MAT

¿Cómo se muestra la especificidad de la MAT?

Los pacientes producen, normalmente, anticuerpos aglutinantes contra el serovar infectante; sin embargo, anticuerpos con reacción cruzada frente a otros serovares también son a menudo encontrados siendo esto particularmente notable al inicio de la infección. En las primeras semanas de la enfermedad, las reacciones cruzadas heterólogas con otros serovares pueden ser aún más fuertes que la reacción homóloga con el serovar infectante. Ocasionalmente, una reacción heteróloga puede ser positiva mientras que una reacción homóloga es o permanece negativa, fenómeno llamado reacción paradójica. El título de los anticuerpos de reacción cruzada tiende a disminuir relativamente rápido, después de algunos meses, mientras que los anticuerpos serogrupo y serovar específicos pueden persistir por un tiempo más largo, algunas veces por años.

Se ha encontrado que:

- (a) anticuerpos aglutinantes con frecuencia reaccionan solamente con ciertos serovares o serogrupos.
- (b) muchos serovares pueden circular y causar enfermedad en un área determinada
- (c) la prevalencia de diferentes serovares puede cambiar como resultado de la introducción de nuevos huéspedes de mantenimiento, prácticas de agricultura, etc.
- (d) nuevos serovares pueden ser introducidos.

Por esta razón, se deben mantener en el laboratorio paneles de leptospirosis vivas pertenecientes a diferentes serovares para ser usadas como antígenos en la MAT. Estos paneles deben incluir, como mínimo, todos los serovares que circulan localmente. Si el panel está incompleto, los anticuerpos del serovar que está ausente en el panel puede no ser detectado y el serodiagnóstico dar resultados imprecisos o falsos negativos. Si los serovares circulantes

localmente no son conocidos o están sujetos a cambio, el panel debe constar o incluir serovares representantes de todos los serogrupos.

Títulos de la MAT

¿Cuándo un título MAT es positivo o significativo?

La MAT no puede diferenciar entre anticuerpos aglutinantes debidos a una infección actual, reciente o pasada. Idealmente, al igual que con otras pruebas serológicas, deberían ser examinadas dos muestras consecutivas de suero para observar seroconversión o un incremento de cuatro veces o más en el título.

Frecuentemente se obtiene solo una muestra de sangre, en general de la fase aguda de la enfermedad; el significado de los títulos en muestras únicas es un tópico de debate, y en diferentes áreas, distintos puntos de corte pueden ser utilizarse. Algunos consideran un título de 1:100 como positivo, mientras que otros aceptan 1:200, 1:400 o 1:800 como diagnóstico de una infección actual o reciente.

Puntos de corte para la MAT

¿Cómo se debe determinar el punto de corte para la MAT en un área determinada?

En un área donde la leptospirosis sea rara, un título relativamente bajo tiene valor diagnóstico, pero que debe siempre considerarse en conjunto con los factores clínicos y epidemiológicos (exposición, grupos de riesgo).

En áreas altamente endémicas, muchos individuos tienen la posibilidad de tener anticuerpos persistentes debido a infecciones pasadas y un título relativamente bajo en una muestra única puede ser, por consiguiente, difícil de interpretar.

El punto de corte, y por ende, el significado clínico de un título en una muestra única, debe ser determinado:

- enfrentándolo a los antecedentes de la seroprevalencia de anticuerpos persistentes debido a infecciones pasadas en la población general;
- en relación con la ocurrencia de otras enfermedades productoras de anticuerpos que pueden causar reacciones cruzadas, tales como la legionelosis, hepatitis y enfermedades autoinmunes.

El punto de corte se debe basar, idealmente, en una comparación entre los resultados obtenidos de un paciente con cultivo positivo para leptospirosis y los resultados serológicos de un grupo de pacientes con otras enfermedades confirmadas por el laboratorio. Sin embargo, esta aproximación no es normalmente posible porque es difícil obtener un grupo representativo de pacientes positivos al cultivo de leptospirosis, ya que los esfuerzos para cultivar leptospirosis de muestras clínicas no siempre tienen éxito (ver serología es frecuentemente usada para diagnóstico, p.10, y cultivo, p.14).

MAT: ventajas y desventajas

¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la MAT?

La mayor ventaja de la MAT es su alta especificidad.

Una desventaja importante es la necesidad de facilidades para el cultivo y mantenimiento de paneles de leptospiros vivas. Además, la prueba es técnicamente exigente y consume mucho tiempo, especialmente cuando el panel es grande. Un obvio pero definitivo defecto, es que los anticuerpos no pueden ser detectados cuando la cepa causante no está representada en el panel o solamente un título bajo es encontrado con un serovar que antigénicamente se parece al serovar ausente, causante de la enfermedad. No encontrar títulos o un bajo título en la MAT no excluye la leptospirosis en estas circunstancias.

Nunca es posible estar seguro de que el panel esté completo desde que nuevas y no identificadas leptospiros pueden causar la enfermedad. Por esta razón es aconsejable incluir una prueba de tamizado género específica tal como el ELISA usando un antígeno ampliamente reactivo (*Anexos 10 y 22*).

Estandarización de la MAT

¿Puede la MAT ser estandarizada?

La MAT no puede ser estandarizada porque utiliza leptospiros vivas como antígenos. Dado que los resultados de la prueba pueden variar un poco de un día para otro, las muestras pareadas deben ser examinadas al mismo tiempo.

Un grado de estandarización puede ser alcanzado usando como antígenos leptospiros preservadas con formalina, pero esto se aplica solamente mientras se usa el mismo lote de antígeno y, desafortunadamente, el antígeno preservado se desnaturaliza después de solamente unas pocas semanas.

Aglutinación serovar / serogrupo específica

¿La serología revela el serovar causante de la enfermedad en un paciente individual?

Los pacientes generalmente producen anticuerpos aglutinantes contra el serovar infectante. En pacientes con infección en curso o reciente, la reacción cruzada en la MAT puede hacer imposible la identificación del serovar infectante o de su serogrupo con algún grado de certeza. Puede ser útil obtener una muestra de suero (p.ej. 1 mes) algún tiempo después de la aparición de la enfermedad con la esperanza de que, para ese tiempo, los anticuerpos residuales sean lo suficientemente específicos como para dar una indicación del serogrupo o, más raramente, del serovar.

La ELISA usualmente solo detecta anticuerpos reactivos con un antígeno género específico ampliamente reactivo y por tanto, no da indicación del serovar o serogrupo causante de la enfermedad.

Seroepidemiología

¿La serología revela el rango de los serovares que causan la infección en una población, en un área determinada?

Con base en la aglutinación con los diferentes serovares incluidos en el panel, la MAT puede revelar el serogrupo presuntivo al cuál puede pertenecer el serovar infectante y, bajo las mejores condiciones, la MAT puede revelar el serovar. Es así que las investigaciones seroepidemiológicas de muestras de suero de la población general pueden indicar los serogrupos circulantes, ya que los anticuerpos residuales de infecciones pasadas tienden a reaccionar con antígenos serogrupo específicos.

ELISA / otras pruebas (comerciales)

¿Qué otros métodos serodiagnósticos, además de la MAT, son usados con mayor frecuencia?

Existe una variedad de métodos serodiagnósticos (*Anexos 10 y 11*), algunos de los cuales están comercialmente disponibles (*Anexo 5*).

Las pruebas de ELISA son populares y varios ensayos están disponibles; estas pruebas pueden realizarse con kits comerciales o con antígenos producidos “en la casa”. Un antígeno ampliamente reactivo llamado género específico es generalmente usado para detectar IgM y algunas veces también anticuerpos IgG. La presencia de anticuerpos IgM pueden indicar una leptospirosis actual o reciente, pero debe recordarse que los anticuerpos IgM pueden permanecer detectables por varios años. El punto de corte (título positivo) se determina mejor sobre la base de las mismas consideraciones presentadas para la MAT (ver punto de corte para la MAT, p.12). Pruebas género específicas tienden a ser positivas más temprano en la enfermedad que la MAT.

**ELISA:
Ventajas y
desventajas**

¿Cuáles son las ventajas y desventajas del ELISA en comparación con la MAT?

Ventajas

- La prueba de ELISA puede detectar anticuerpos clase IgM en la fase temprana de la enfermedad por lo que puede indicar si se trata de una infección actual o reciente. Cuando no se detectan anticuerpos o se encuentra un título bajo, una segunda muestra de suero debe ser examinada para observar seroconversión o un aumento en el título.
- Solo utiliza un antígeno, llamado antígeno género específico, el cuál es compartido por leptospirosis patógenas y saprofitas.
- Al contrario de la MAT, la ELISA puede ser estandarizada
- No requiere del cultivo de leptospirosis en el laboratorio local, para proveer de antígeno desde que un kit comercial esté disponible.

Desventajas

- Algunas pruebas de ELISA son menos específicas que la MAT y reacciones cruzadas débiles, debido a la presencia de otras enfermedades, pueden ser observadas. Los resultados de la ELISA deben ser, por lo tanto, confirmados por MAT. Esto puede requerir probar una muestra adicional si la inicial fue obtenida en una fase temprana en la infección cuando la prueba de ELISA puede ser positiva, pero la MAT es negativa.
- Como se basa en un antígeno género específico, la prueba de ELISA no da indicación del serovar infectante.

Tamizado

¿Es posible tamizar rápidamente anticuerpos contra leptospirosis?

Un número de pruebas (*Anexo 11*) como la aglutinación macroscópica, la prueba de aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, aglutinación en microcápsula, aglutinación de látex, pruebas de *dipsticks*, y la prueba de hemoaglutinación indirecta, son fácilmente realizadas y dan resultados relativamente rápidos. Los resultados de las pruebas de rastreo,

tanto si son positivos o negativos, deben ser confirmados por otras pruebas y preferiblemente por la MAT.

Métodos directos

¿Cuáles son los métodos directos para detectar las leptospiras?

Los métodos directos incluyen cultivo, microscopía de campo oscuro, inoculación de animales de experimentación, coloración (inmunológica) y la reacción en cadena de la polimerasa (*Anexos 6, 12, 13 y 14*).

Cultivo

¿Cómo se pueden cultivar las leptospiras?

Las leptospiras crecen en una variedad de medios de cultivo (*Anexo 16*), su crecimiento es relativamente lento con un tiempo de duplicación celular de 6 a 8 horas como muy bueno. Las temperaturas óptimas de crecimiento van desde los 28 a los 30°C pero algunos serovares son más exigentes que otros en términos de sus requerimientos de cultivo.

Muestras para cultivo

¿Cómo se cultivan las leptospiras de un paciente?

Normalmente se utiliza una muestra de sangre, la que es inoculada en el medio de cultivo (*Anexo 12*). Cultivos a partir de otros fluidos corporales o de tejidos pueden también ser realizados. Usualmente 1 - 3 gotas de sangre o de otros líquidos corporales son incorporadas al medio de cultivo aunque también puede usarse una pequeña porción de tejido molido.

El crecimiento puede ocasionalmente ser detectado después de cultivar alrededor de una semana, pero muchas veces toma más tiempo. El medio de cultivo debe ser revisado a intervalos regulares por un período de alrededor 4 meses y, para este propósito debe utilizarse el microscopio de campo oscuro (*Anexo 6*).

La sangre y otras muestras clínicas para cultivo deben ser obtenidas antes de administrarse antibióticos. Se debe tener cuidado para asegurar que el medio de cultivo usado esté libre de saprofitos contaminantes y otras bacterias. El equipo usado en el cultivo y los recipientes para las muestras clínicas deben estar estériles para evitar el crecimiento de flora no deseada y especialmente de bacterias saprofitas.

Puede el cultivo ofrecer un diagnóstico rápido y temprano?

¿El cultivo contribuye a un diagnóstico rápido y temprano?

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

Usos del cultivo

Cuáles son los usos del cultivo?

El aislamiento de leptospiros patógenos es una prueba de infección. También, las leptospiros aisladas pueden ser tipificadas para identificar los serovares. Tipificar las leptospiros aisladas es útil para la vigilancia de los serovares patógenos locales, el reconocimiento de nuevos patrones de presentación de la enfermedad, la evaluación de la efectividad de las medidas de intervención, etc.

Animales de experimentación

Cómo son usados los animales de experimentación para detectar las leptospiros patogénicas?

Sangre u otros materiales clínicos se inyectan en la cavidad abdominal del animal (*Anexo 13*), siendo el hámster dorado el animal más frecuentemente usados para este propósito. Se obtiene una muestra del fluido de la cavidad abdominal con una pipeta fina a intervalos regulares y se la examina por microscopía de campo oscuro para detectar la presencia de leptospiros. Además, el animal es observado por si presenta los signos de la enfermedad.

Este método es raramente usado en la actualidad, probablemente porque el cultivo *in vitro* lleva a resultados comparables y evita el sufrimiento del animal.

Microscopia de campo oscuro

Cómo se usa la microscopía de campo oscuro?

Usando un microscopio de campo oscuro, las leptospiros se observan como microorganismos delgados, enroscados y de rápidos movimientos en fluidos tales como el medio de cultivo, sangre u orina (*Anexo 6*). Las leptospiros pueden concentrarse en sangre u orina por centrifugación diferencial.

Microscopia de campo oscuro: ventajas y desventajas.

Cuáles son las ventajas y desventajas de la microscopía de campo oscuro?

Ventajas

- La microscopía de campo oscuro es particularmente útil para observar las leptospiros en cultivo, sobre todo cuando están presentes en gran número y para observar la aglutinación en la MAT.

Desventajas

- La microscopía de campo oscuro es técnicamente exigente; reconocer las leptospiros es difícil, en particular cuando están presentes en poca cantidad. Artefactos, tales como trazos de fibrina en sangre, son fácilmente confundidos con leptospiros.
- Diagnósticos falsos positivos ocurren con frecuencia. En consecuencia, la microscopía de campo oscuro es útil solamente para quienes tienen considerable experiencia observando leptospiros. 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.

Coloración

Pueden ser las leptospirosis coloreadas?

Las leptospirosis pueden ser coloreadas por una variedad de métodos de coloración (*Anexo 6*) pero muy débilmente o no pueden ser coloreadas por coloración convencional de Gram. La coloración con plata puede dar resultados satisfactorios; se han usado métodos de coloración inmunológica, tales como la inmunofluorescencia directa y variantes como la coloración de inmunoperoxidasa. Los métodos de coloración pueden ser útiles en diagnósticos postmortem y en tejidos fijados o no. Sin embargo, todos los métodos de coloración sufren los mismos errores de la microscopía de campo oscuro como son los altos riesgos de falsos positivos y falsos negativos. Artefactos son fácilmente confundidos con leptospirosis, particularmente cuando pocas están presentes.

PCR

Qué es la PCR para leptospirosis?

EL PCR (*Anexo 14*) es un método de amplificación de segmentos específicos del DNA de *Leptospira*, p.ej. en muestras clínicas como sangre, hasta que alcancen niveles detectables. De esta manera, la presencia de leptospirosis es confirmada por la detección e identificación de segmentos específicos del ADN de *Leptospira*.

PCR: ventajas y desventajas

Cuáles son las ventajas y desventajas de la PCR?

Ventajas

- 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.

Desventajas

- 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. También puede dar resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores en los materiales clínicos que están siendo examinados. La validez de los datos de PCR depende esencialmente de la calidad de los controles incluidos en la prueba. Si bien la tecnología de PCR es ampliamente aplicada al diagnóstico de muchas enfermedades, su valor general para el diagnóstico rápido de la leptospirosis no ha sido evaluado a nivel mundial y no es ampliamente usada, particularmente, en los países del trópico y subtropical.

Diagnóstico postmortem

Cómo puede ser la leptospirosis diagnosticada postmortem?

Además de la serología y el cultivo, las leptospirosis pueden ser demostradas en tejidos usando PCR o coloración (inmunohistoquímica) en especial por inmunofluorescencia directa

IV. FUENTES DE INFECCIÓN ANIMAL

Fuentes de infección ¿Qué especies animales pueden transmitir las leptospiras a humanos?

Una amplia variedad de especies animales, mamíferos en primer lugar, pueden servir como fuentes de infección para el ser humano (*Anexo 4*).

En este contexto, las siguientes especies son considerados las más importantes:

- (1) pequeñas especies de mamíferos, notablemente roedores silvestres y peridomésticos (ratas, ratones, roedores de campo, etc.) e insectívoros (musarañas y puercoespines).
- (2) animales domésticos (vacas, cerdos, perros, más raramente ovejas, cabras, caballos y búfalos).

Animales (zorro plateado, visón y nutria), criados en cautiverio para producción de piel son potencialmente fuentes de leptospirosis humanas. Los reptiles y anfibios pueden también portar leptospiras.

Manipulación de animales portadores ¿Cómo es posible determinar si un animal es portador de leptospiras?

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

Reservorio de la Infección ¿Cómo se mantiene la infección con leptospiras bajo condiciones naturales?

Las infecciones con leptospiras perduran dentro de una población de huéspedes naturales de mantenimiento por transmisión vertical y horizontal. Tal población de especies animales huéspedes naturales constituye el reservorio de la infección.

Huésped natural ¿Cuál es el papel del huésped natural en la transmisión de la infección?

El huésped natural de mantenimiento asegura la circulación continua de un serovar de *Leptospira* particular en un área geográfica (foco natural) sin necesidad de que otro huésped accidental esté involucrado. Los huéspedes naturales de mantenimiento pueden portar una cepa particular de *Leptospira* en su riñones y eliminarlas con su orina durante largos períodos de tiempo, y algunas veces durante toda su vida. Muchas cepas de *Leptospira* parecen estar tan bien adaptadas a sus huéspedes naturales que, como regla, producen infección sin causar ningún signo de enfermedad en el animal.

Los roedores han sido reconocidos como los reservorios más importantes y más ampliamente distribuidos de infección por leptospiras. Algunas especies de insectívoros, carnívoros y rumiantes pueden ser reservorios de una variedad de serovares. En cada región específica, el riesgo de infección humana variará dependiendo de la oportunidad directa o indirecta de contacto con la orina de uno de los huéspedes naturales de mantenimiento de leptospiras. Además de

estos huéspedes de mantenimiento de largo plazo, cualquier animal infectado puede ser fuente de infección para otros de su misma especie u otras especies, incluyendo seres humanos.

Huéspedes naturales de mantenimiento y serovares

¿Hay una asociación entre ciertos serovares de *Leptospira* y algunos huéspedes en particular?

Sí; generalmente cada serovar de leptospirosis tiende a estar asociado con un huésped natural de mantenimiento particular. Por ejemplo, el serovar Copenhageni está asociado con ratas, el serovar canicola con perros, el serovar hardjo con vacas, etc. Sin embargo, hay muchas excepciones a esta regla, como ser que un serovar puede ser portado por diferentes huéspedes y una especie animal puede actuar como huésped de diferentes serovares. Además, un serovar se puede adaptar a una nueva especie huésped, la cuál puede entonces llegar a ser reservorio natural para esta infección.

Huésped terminal

¿Cuál es el papel de un huésped accidental o incidental en la transmisión de la infección?

Huéspedes accidentales o incidentales (ver huéspedes accidentales e incidentales, p. 2) usualmente desarrollan una enfermedad evidente y, si sobreviven, normalmente se recuperan y limitan el crecimiento de las leptospirosis infectantes en pocas semanas. Los seres humanos y otros huéspedes accidentales son huéspedes “terminales” para leptospirosis ya que no constituyen reservorios de la infección. Los casos humanos con leptospirosis representan poco riesgo para otras personas. La transmisión persona a persona de leptospirosis se ha descrito, pero ocurre muy rara vez (ver transmisión humano / humano, p. 21).

Animales domésticos

¿Cuál es el papel de los animales domésticos en la transmisión de la infección?

En todos los animales domésticos, las manifestaciones clínicas de la leptospirosis varían de una infección aguda a subaguda a una infección crónica. La infección crónica se localiza en los riñones (algunas veces también en el tracto genital), usualmente sin evidencia clínica detectable de la enfermedad. Los animales portadores pueden eliminar las leptospirosis por meses o años en su orina, algunas veces en grandes cantidades, contaminando suelos húmedos (madrigueras, corrales o bebederos). La contaminación de aguas superficiales representa un riesgo de transmisión de la infección para otros animales y seres humanos, y de brotes de infección humana por origen hídrica.

Evidencia de la Leptospirosis en animales domésticos

¿Cómo puede ser reconocida la leptospirosis en animales domésticos?

El diagnóstico de leptospirosis aguda debe ser sospechado en ganado bovino en los casos con aparición repentina de síndrome de baja en la producción de leche, ictericia, hemoglobinuria (particularmente en animales jóvenes), meningitis, nefritis aguda y abortos. El diagnóstico de leptospirosis crónica debe ser considerado en cerdos en aquellos casos con abortos, óbitos fetales (parto en el que el feto nace muerto) e infertilidad y en caballos en casos de oftalmia periódica. La mayoría de los casos de leptospirosis de animales que

viven en rebaños son o asintomáticos o presentan formas clínicas raras. El diagnóstico puede ser entonces confirmado solamente si las leptospiras son cultivadas del animal en cuestión de la orina o riñón, o por el uso de una prueba serológica como la MAT. La leptospirosis asintomática en animales domésticos algunas veces, solamente puede ser descubierta siguiendo el contacto y la infección humana, sirviendo los casos humanos como centinelas.

Perros y otras mascotas

¿Cuál es el rol de las mascotas en la infección humana con leptospiras?

Los perros pueden estar infectados con leptospiras y transmitirlos al ambiente o directamente a los humanos. Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis en perros son variables al igual que en otras especies animales, y pueden fluctuar desde una carencia total de síntomas (estado de portador renal), el cuál es el más común, hasta una enfermedad severa icterohemorrágica con nefritis aguda intersticial. Cachorros no vacunados (hasta 1 año de edad) sufren de las formas más severas de la enfermedad, algunas veces con desenlace fatal.

Debe tenerse cuidado cuando se manipula la orina y otros fluidos corporales de perros y otros animales de compañía, los que deben considerarse como fuentes potenciales de infección hasta que se demuestre lo contrario. Cuando se están tratando perros u otros animales enfermos deben tomarse las medidas higiénicas apropiadas (*Anexo 3*).

V. TIPIFICACIÓN

Tipificación	¿Cuál es el propósito de tipificar las leptospiras? Desde el punto de vista del manejo clínico, es suficiente conocer si el paciente tiene leptospirosis o no. Sin embargo, desde el punto de vista de la salud pública, la tipificación puede dar una indicación de las fuentes de infección y los reservorios, y por tanto delimitar la selección de los métodos para una eventual prevención y control.
Cepas de referencia	¿Cómo se describen los serovares? Existe una cepa de referencia para cada serovar. Las colecciones de estas cepas de referencia son mantenidas en laboratorios de referencia y en otros laboratorios especializados (Anexo 1). Además de las cepas de referencia, también se mantienen colecciones de antisueros de referencia (Anexo 8).
Identificación de serovares	¿Deben tipificarse hasta el serovar todas las leptospiras aisladas? Idealmente todos los aislamientos deberían ser tipificados hasta el nivel de serovar, porque el concepto de serovar y la clasificación de serovares en serogrupos son ampliamente aceptados y usada en epidemiología. En general, determinar el serovar en un aislamiento proporcionará bastante información; complementariamente, la tipificación por métodos genéticos puede ser necesaria para describir adecuadamente una cepa.
Métodos de tipificación	¿Cómo se puede tipificar una leptospira aislada? Como se explicó anteriormente, la unidad sistemática básica para la clasificación es el serovar (ver Serovar, p.1). El mismo puede ser determinado mediante la llamada prueba de absorción de aglutinación cruzada usando antisuero de conejo (Anexo 8). Esta prueba es complicada y toma tiempo, por lo que no es apropiada cuando se necesitan resultados rápidamente y es utilizada solamente en unos pocos laboratorios especializados. Varios métodos alternativos de tipificación han sido desarrollados, por ejemplo, existen dos métodos serológicos basados en el reconocimiento de las características antigénicas de las leptospiras que utilizan anticuerpos monoclonales o “suero factor” (Anexo 8). Otros métodos se basan en el examen de las diferencias en el ADN de las leptospiras (Anexo 9) y sus resultados son comparables en alguna medida con aquellos de la tipificación de los serovares.
Anticuerpos monoclonales	¿Cómo se usan los anticuerpos monoclonales para la tipificación? Se han preparado anticuerpos monoclonales de conejo que aglutinan leptospiras (Anexo 8) y los serovares pueden ser identificados con base en patrones característicos de aglutinación. Preparar anticuerpos monoclonales es difícil y toma tiempo, pero usarlos en la MAT para serotipificar es fácil y da

resultados rápidos. Actualmente están disponibles anticuerpos monoclonales para tipificar cerca de la mitad de los serovares más comunes actualmente reconocidos (*Anexo 5*).

Suero factor

¿Cómo puede ser usado el “suero factor” para la tipificación?

Los “suero factor” son sueros de conejo, convencionalmente preparados, que tienen una alta especificidad después de ser absorbidos por varias leptospiras (*Anexo 8*). Paneles de “suero factor” pueden ser usados de manera similar a los anticuerpos monoclonales para identificar rápidamente las cepas a nivel de serovar. La preparación de “sueros factor” consume tiempo y la preparación de lotes no siempre conduce a resultados reproducibles.

Tipificando el ADN

¿Cómo puede ser usado el ADN para tipificar?

El ADN de cada organismo viviente es único para ese organismo. Varios métodos de análisis de ADN están disponibles (*Anexo 9*). EL ADN puede ser procesado y fragmentos de ADN o productos obtenidos mediante su procesamiento pueden ser separados sobre geles, dando patrones que son, por lo general, característicos de las cepas de leptospiras. Los métodos basados en ADN suelen dar resultados útiles pero algunos son relativamente complicados y requieren de habilidad técnica y equipamiento especializado.

Selección de métodos

¿Qué método de tipificación debe ser seleccionado?

Si los aislamientos son enviados a centros de referencia, puede existir una larga demora en la obtención de los resultados. Además, el envío de aislamientos por correo o mensajería de acuerdo con regulaciones internacionales es costoso debido a las precauciones que deben ser tomadas para evitar derrames y riesgo de contaminación para aquellos que manipulan los especímenes. Por lo tanto sería preferible que la tipificación se realice en el lugar de aislamiento.

La decisión dependerá de la información que se requiera. La mayoría de los investigadores probablemente querrán conocer qué cepas están circulando en un área determinada y cuáles son las probables fuentes de infección y reservorios. En muchas áreas tropicales, diferentes serovares pueden circular y es probable que algunos no hayan sido identificados. Una posibilidad es usar un método que permita la rápida identificación de los aislamientos más comunes mientras los aislamientos raros o inusuales pueden ser enviados a un centro de referencia para su tipificación. La elección del método dependerá de las facilidades técnicas y la experiencia del personal disponible aunque algunos métodos no son claramente apropiados para su uso en laboratorios de rutina.

Cualquiera sea el método de tipificación usado es necesaria la comparación con las cepas de referencia. Los aislamientos locales pueden exhibir características únicas que difieran de aquellas de las cepas de referencia. La observación de las diferencias entre las cepas de referencia y los aislamientos locales es importante, tanto desde el punto de vista epidemiológico como en la definición de las características particulares que permitirá identificar las cepas locales. Debido a que actualmente no hay métodos de tipificación disponibles que den siempre resultados satisfactorios, los laboratorios especializados y

centros de expertos suelen usar una combinación de métodos serológicos y genéticos para caracterizar un aislamiento.

VI. TRANSMISIÓN Y EXPOSICIÓN

Transmisión

¿Cuál es el modo de transmisión de la leptospirosis?

Las infecciones humanas con leptospirosis resultan ante todo de la exposición directa o indirecta a la orina de animales infectados aunque otras formas de transmisión de la infección, tales como manipulación de tejidos de animales infectados y la ingestión de alimentos o agua contaminada, son también posibles. El agente infeccioso es transmitido de un animal portador a otro, mediante el contacto directo o indirecto con orina u otros fluidos infecciosos que contengan leptospirosis viables. Existen también otras formas de transmisión de la infección entre animales de granja como la infección por vía congénita o neonatal. También ha sido también reportada la transmisión sexual de leptospirosis, p.ej. en el apareamiento de ratas, vacas, cerdos y perros.

Puerta de entrada de la infección

¿Cómo entran las leptospirosis en el cuerpo de humanos y animales?

Las leptospirosis pueden entrar en el cuerpo de los seres humanos a través de cortaduras o abrasiones en la piel, a través de las membranas mucosas intactas (nariz, boca, ojos) y, probablemente, a través de piel que ha permanecido por mucho tiempo sumergida en el agua. Las leptospirosis pueden ocasionalmente entrar al cuerpo humano mediante la inhalación de gotas de orina o en el agua de bebida.

Transmisión de humano a humano

¿Las leptospirosis pueden ser transmitidas entre humanos?

Sí, aunque raramente. Ellas pueden ser transmitidas de humano a humano por relaciones sexuales, por vía transplacentaria de la madre al feto y por la leche materna. La orina de un paciente con leptospirosis debe ser considerada infecciosa. Como las leptospirosis pueden ser cultivadas a partir de la sangre, ésta debe ser vista como infecciosa desde algún tiempo antes de la aparición de los síntomas (ver transfusión de sangre, abajo) y durante los primeros 7 - 10 días de la enfermedad.

Transfusión de sangre

¿Puede la leptospirosis ser transmitida por transfusión de sangre?

No se sabe con precisión cuándo las leptospirosis aparecen en la sangre después de la infección. Es posible que, durante el período de incubación, antes de que la persona infectada se enferme, las leptospirosis puedan circular en la sangre y ser transmitidas por transfusión sanguínea. Sin embargo, los anticuerpos aparecen después de una semana de la aparición de la enfermedad y usualmente limpian las leptospirosis de la sangre. Después de la recuperación, los anticuerpos persistentes, teóricamente protectores, probablemente ayudan a liberar de leptospirosis la sangre y la mayoría de tejidos, pero en sitios con privilegios inmunológicos como los ojos, las leptospirosis pueden sobrevivir por largos períodos. Quizá, en el futuro, será posible usar métodos rápidos como la PCR, para revisar la presencia de leptospirosis en sangre para transfusión.

Riesgo de infección

¿Todos los humanos tienen la misma posibilidad de infectarse con leptospirosis?

El riesgo de infección depende de la exposición (*Anexo 2*), de hecho, algunos humanos tienen un alto riesgo de exposición y los grupos de riesgo pueden ser definidos sobre esta base. En algunos países, prácticamente toda la población está en riesgo como resultado de una alta exposición a aguas contaminadas en actividades diarias como, p.ej. cultivos de arroz.

Grupos de riesgo

¿Cuáles son los grupos de riesgo?

Los grupos de riesgo en una población son ciertos conjuntos de seres humanos que tienen mayor probabilidad de estar expuestos como resultado de sus actividades ocupacionales o recreativas. Debido a que hay un número grande de potenciales fuentes de infección y muchas diferentes oportunidades para la transmisión, los grupos de riesgo pueden diferir de un área a otra (ver *Anexo 2* para una lista de posibles factores de riesgo).

Sin embargo, en muchas áreas tropicales las formas de transmisión no han sido completamente estudiadas. Cuando se intenta identificar los grupos de riesgo en los trópicos, puede ser útil prestar especial atención a los conglomerados de casos. La epidemiología de la leptospirosis es dinámica, nuevos grupos de riesgo pueden surgir como resultado de cambios en las prácticas agrícolas o sociales o la población de animales reservorios en un área.

La vigilancia continua y el establecimiento de un sistema de reporte o notificación de casos son altamente recomendados.

La carga de la enfermedad puede ser baja en la población como un todo, pero muy alta en ciertas subpoblaciones.

Endémica o epidémica

¿La leptospirosis es una enfermedad endémica o epidémica?

La leptospirosis es una enfermedad endémica en muchos países, quizá en todo el mundo. Tiene con frecuencia una distribución estacional, incrementándose con el aumento de lluvias y temperatura, sin embargo, la enfermedad puede ocurrir a lo largo de todo el año. Las epidemias pueden estar asociadas con cambios en el comportamiento humano, contaminación del agua con animales o aguas residuales, cambios en la densidad de los reservorios animales, o a partir de un desastre natural como ciclones o inundaciones.

VII. PREVENCIÓN E INTERVENCIÓN

Prevención y control

¿Cómo se puede prevenir y controlar la leptospirosis?

Por causa del gran número de serovares y fuentes de infección y las amplias diferencias en las condiciones de transmisión, el control de la leptospirosis es complicado y dependerá de las condiciones locales. El control puede ser alcanzado interviniendo el reservorio o reduciendo la infección en las poblaciones de animales reservorio tales como perros o ganado. El control de animales silvestres puede ser difícil. Las medidas preventivas deben estar basadas en el conocimiento de los grupos particularmente vulnerables a la infección y los factores epidemiológicos locales (*Anexos 2 y 3*).

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.

Control de la fuente de infección

¿Cómo se puede controlar la fuente de infección?

Es importante establecer qué especies animales constituyen la fuente de infección en un área en particular (*Anexos 3 y 4*) 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.

Otros ejemplos son dados en el *Anexo 3*.

Interrupción de la transmisión

¿Cómo se puede interrumpir la transmisión?

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, p.ej. exposición ocupacional o recreativa (ver *Anexo 3*).

Protección en humanos

¿Cómo se pueden proteger los humanos?

Todo depende del conocimiento detallado de cómo, dónde y cuándo los humanos pueden infectarse en un área en particular. Una posibilidad es elevar el grado de conciencia sobre la enfermedad entre la población, grupos de riesgo y proveedores de salud, de tal manera que la enfermedad pueda ser reconocida y tratada tan pronto como sea posible. Se ha reportado que la doxiciclina confiere alguna protección contra la infección y la enfermedad. En ciertos países se dispone de vacunas para uso humano, pero debe recordarse que ellas solamente pueden inducir una respuesta inmune para los serovares incluidos en la vacuna (ver Inmunización humana, abajo y Anexo 3 para información adicional y más detallada).

Inmunización en humanos

¿Cómo pueden ser protegidos los humanos mediante la inmunización?

La inmunización por medio de vacunas parece proveer un cierto grado de protección. Las vacunas son en principio, una suspensión de leptospiros muertas y la protección es principalmente serovar específica. En aquellas áreas donde muchos serovares están causando leptospirosis, la vacuna debe incluir los diferentes serovares que circulan localmente. En algunos países, p.ej. China, en donde muchos serovares circulan, las vacunas consisten de una mezcla de unos pocos serovares de los más prevalentes. Anticuerpos protectores son producidos solamente contra los serovares presentes en la vacuna usada.

Vacunas: ventajas y desventajas

¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la inmunización?

La información sobre vacunas humanas es limitada y están disponibles solo en ciertos países. Se ha reportado que las vacunas proporcionan algún grado de protección y esto es particularmente importante en áreas en donde ocurren las formas más serias de leptospirosis, donde el acceso al servicio médico es limitado o en donde es probable que exista demora para recibir el tratamiento. Sin embargo, la protección es, relativamente, de corta duración siendo necesario el refuerzo a intervalos regulares para mantener los títulos de anticuerpos protectores. Las vacunas también pueden producir efectos colaterales tales como dolor en el sitio de inoculación y fiebre.

Inmunización animal

¿Los animales pueden ser inmunizados?

Los animales pueden ser inmunizados con vacunas que consisten en suspensiones de leptospiros muertas; la protección es serovar específica. La inmunización puede prevenir la enfermedad pero no siempre impide la evolución al estado de portador crónico con manutención de las leptospiros en los riñones (*Anexo 3*).

Descontaminación

¿Se pueden controlar las leptospiros patogénicas en el ambiente?

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 leptospiros mueren rápidamente con desinfectantes y con la desecación; sin embargo, las leptospiros 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.

VIII. SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO, VIGILANCIA Y MANEJO DE BROTES

Apoyo del laboratorio

¿Si se va a proveer apoyo de laboratorio, qué actividades deben desarrollarse?

Esto depende en gran medida de las condiciones locales (*Anexo 4*), pero debe considerarse lo siguiente:

- En donde el cuidado de la salud está gravemente limitado en términos de facilidades y recursos, la investigación de la leptospirosis podría restringirse a métodos simples de tamizado serológico.
- Si las instalaciones del laboratorio y los recursos financieros lo permiten, se recomienda el desarrollo o introducción de una ELISA o una prueba similar usando un antígeno ampliamente reactivo (género específico) para el serodiagnóstico de las diferentes formas de leptospirosis. Los kits pueden ser comprados de varias firmas comerciales (*Anexo 5*) o desarrollados “en casa”.
- Si se dispone de los recursos y hay apoyo nacional para establecer un laboratorio de referencia, se debe añadir la MAT al repertorio diagnóstico. Una prueba género específica (p.ej. ELISA) en combinación con la MAT normalmente permite confirmar la infección y el serogrupo infectante ser determinado por la MAT, aunque raramente será posible determinar el serovar.
- Además de ofrecer confirmación serológica y diagnóstica, también se puede realizar el cultivo de las leptospiras ya que las instalaciones necesarias para este fin son las mismas que se requieren para mantener las cepas usadas para la MAT.
- Un PCR validado puede ser usado en un laboratorio bien equipado y con personal con experiencia.

Servicios de diagnóstico para la comunidad

¿Cómo se pueden proveer los servicios diagnósticos a la comunidad?

Para los servicios de diagnóstico se pueden considerar tres o cuatro niveles de capacidad diagnóstica, como sigue:

Primer nivel. Es el nivel más básico del cuidado de la salud; se debe disponer de métodos simples de rastreo o tamiz para anticuerpos antileptospira.

Segundo nivel. Puede operar métodos serológicos moderadamente complicados y quizá cultivos, para poder revisar las observaciones realizadas en el primer nivel.

Tercer nivel. Este nivel puede manejar métodos de diagnóstico complicados, revisar los hallazgos del segundo nivel y realizar control de calidad. Para propósitos de salud pública, puede realizarse la tipificación provisoria de aislamientos de leptospiras.

Cuarto nivel. Este es el nivel de laboratorios de referencia nacional e internacional u otros centros de expertos que mantienen las colecciones de cultivos, realizan la tipificación y revisan la calidad del desempeño de otros laboratorios.

Los laboratorios que pueden realizar estudios epidemiológicos, p.ej. fuentes de infección y modos de transmisión, son particularmente valiosos en la vigilancia y en la introducción y evaluación de medidas de control.

Impacto en Salud Pública

Si no existe un sistema de notificación confiable, ¿cómo las autoridades de salud pública pueden, sospechando que la leptospirosis ocurre, investigar la ocurrencia de la enfermedad y su impacto en la salud humana?

Existen varias posibilidades (*Anexo 4*) que se discuten a seguir:

Muestras clínicas, especialmente suero, pueden ser obtenidas de pacientes hospitalizados que sufran una enfermedad que se ajusta a la descripción clínica de la leptospirosis. Estas muestras deben ser examinadas en un laboratorio que ofrezca pruebas para leptospirosis. De esta forma se obtendrá información sobre la ocurrencia de leptospirosis severa y se pueden perder los casos leves debido a que es poco probable que estos casos sean hospitalizados. Los médicos deberían por lo tanto ser invitados a enviar muestras de pacientes de la comunidad con sospecha de tener leptospirosis a un laboratorio competente, y éstas deberían incluir muestras pareadas de suero (p.ej. con un intervalo de 14 días; por supuesto, el intervalo entre muestras sucesivas puede ser reducido si se necesitan resultados rápidos) y sangre completa (heparinizada) para cultivo.

Muestras de sangre también pueden obtenerse de grupos de riesgo conocidos y ser examinadas para la presencia de anticuerpos antileptospira. Los miembros de tales grupos deben ser interrogados sobre alguna enfermedad en el pasado que pudiera haber sido leptospirosis.

Muestras de sangre aleatorias deben ser examinadas para determinar seroprevalencia. También pueden tomarse muestras aleatorias de sangre de la población general sana y examinarlas para detectar anticuerpos. Sin embargo, este tipo de muestreo debe ser el menos útil de los métodos mencionados previamente. Es así que, en un estudio realizado en Hawai en un área de alta incidencia, se tomaron muestras de varios cientos de donantes de sangre pero se encontraron muy pocos títulos detectables de anticuerpos; la prevalencia general fue de aproximadamente 0,5%. La evaluación serológica de pacientes hospitalizados y ambulatorios con síndrome febril probablemente suministraría mejores pistas sobre la incidencia de leptospirosis no reconocida, mientras que las muestras de sangre de personas pertenecientes a grupos de alto riesgo sería útil para evaluar o confirmar niveles endémicos de infección. Tales estudios de seroprevalencia reflejan la exposición pero no necesariamente la ocurrencia actual de la enfermedad.

Identificando los reservorios animales

¿Se pueden identificar las fuentes animales de leptospirosis en el ambiente?

Las fuentes animales pueden ser identificadas por pruebas serológicas y por cultivo de tejidos y/o orina.

Las pruebas serológicas pueden proporcionar resultados rápidos, pero dar solamente una información limitada sobre las tasas de infección y los serovares circulantes. Los animales pueden portar las leptospirosis sin presentar anticuerpos detectables.

Los cultivos están sujetos a contaminación y requieren de períodos prolongados de incubación de hasta 6 meses. Sin embargo, los cultivos pueden proveer una identificación definitiva del serovar infectante. Distintas especies animales se afectan de manera diferente por la enfermedad. Los roedores usualmente no muestran signos de la enfermedad, pero una vez infectados, eliminan los organismos en su orina durante toda su vida. La enfermedad presenta diferentes patrones clínicos en perros, ganado bovino y porcino, los cuáles son considerados los animales domésticos reservorios primarios que pueden transmitir la enfermedad a humanos, si bien los caballos y otros animales también pueden ser afectados clínicamente. Encuestas en animales son útiles para determinar los reservorios primarios en una comunidad, la extensión de la infección en la especie y las posibles variaciones geográficas de las tasas de infección en esa especie.

La mayoría de las pruebas para leptospirosis no han sido evaluadas en profundidad en animales y algunas, como las pruebas de ELISA, requieren conjugados provenientes de la especie animal a ser evaluada, aunque se pueden utilizar la prueba de aglutinación del látex y las pruebas de hemaglutinación indirecta desarrolladas para humanos. La prueba de elección, si está disponible, es la MAT la que también puede proveer de alguna indicación del serogrupo/serovar causante de la infección. Sin embargo, el muestreo serológico en roedores resulta inapropiado ya que muchos de los animales infectados no muestran respuesta de anticuerpos. Para maximizar la sensibilidad del diagnóstico en roedores se requiere tanto de cultivo como de MAT.

Cultivar el tejido de riñón de animales muertos por eutanasia resulta el método más confiable para detectar la infección en animales. Sin embargo, las muestras de riñón (0,5 cm x 0,5 cm) deben ser extraídas asépticamente del animal, maceradas o cortadas en pequeñas secciones con instrumentos estériles e inoculadas en medio de cultivo conteniendo 5-fluorouracil o antibióticos apropiados para suprimir el crecimiento de contaminantes bacterianos, sin afectar la viabilidad de las leptospirosis (*Anexo 12*).

El muestreo de roedores requiere la captura de animales vivos, mientras que las encuestas en cerdos y ganado bovino pueden ser llevadas a cabo en mataderos después de haber sido sacrificado el animal y abierta la cavidad abdominal durante la evisceración.

El cultivo de la orina de animales domésticos vivos puede ser llevado a cabo, aunque es difícil y las muestras se contaminan fácilmente. Se debe administrar un diurético para incrementar la producción de orina. Los genitales pueden ser lavados con una solución desinfectante (chlorohexidene) y deben ser secados con un pedazo de tela limpia y seca. Se debe eliminar la primera orina para prevenir mezclas y la orina ser colectada en un recipiente estéril. La muestra se debe procesar dentro de las dos horas siguientes, ser centrifugada y el sedimento inoculado en un medio de cultivo que inhiba el crecimiento de bacterias contaminantes como se describió arriba para muestras de tejido (ver también Anexo 12).

Muestreando el medio ambiente para presencia de leptospirosis

¿Puede el medio ambiente ser muestreado para leptospirosis patógenas?

Muestras de agua y suelo pueden ser cultivadas y revisadas para el crecimiento de leptospirosis patógenas. Sin embargo estas pruebas pueden tomar varias

semanas o meses y los resultados son por lo tanto retrospectivos y se aplican únicamente al tiempo y lugar en los cuales las muestras fueron obtenidas. Se puede tratar de realizar la PCR, pero las mismas desventajas aplican a las apuntadas en “PCR: ventajas y desventajas”, p.16. Animales experimentales han sido usados como centinelas.

La sensibilidad de los muestreos ambientales es pobre. Es importante tener en cuenta que las leptospirosis saprofitas pueden vivir en ambientes en donde las leptospirosis patógenas pueden ser eliminadas por animales y, por lo tanto, interferir en la detección de las leptospirosis patógenas (*Anexo 7*).

Probabilidades de contaminación con leptospirosis

¿Pueden las leptospirosis patógenas ser detectadas mediante el examen de muestras colectadas en el ambiente?

La prueba de la existencia de leptospirosis patogénicas mediante cultivo y tipificación es, en principio, epidemiológicamente relevante. Sin embargo, esto requiere de semanas o meses para la obtención de resultados ya que las leptospirosis crecen lentamente. Un resultado negativo no excluye la presencia de leptospirosis patógenas ya que estas pueden estar en el ambiente pero distribuidas en forma desigual y, por lo tanto, no estar presentes en la pequeña muestra examinada. Además, el ambiente pudo estar libre de leptospirosis patogénicas en el momento en que la muestra fue tomada pero haber sido contaminado un poco después por un animal infectado.

Seguridad ambiental

¿Es posible asegurar que la superficie de agua es segura para nadar, bañarse o para otros propósitos recreativos?

Si existe la posibilidad que haya animales infectados que tengan acceso a la superficie de aguas, es lógico asumir que el ambiente esté regularmente contaminado con leptospirosis patógenas y que exista el riesgo de infección. Es, por tanto imposible asegurar categóricamente, que la superficie de agua es segura porque no es posible colectar y examinar una muestra de agua que sea representativa de un cuerpo grande de agua. Encontrar las leptospirosis patógenas en agua por cultivo, o quizás por PCR u otros métodos apropiados, es una prueba de su ocurrencia en el agua en el momento y lugar en donde se tomó la muestra y confirma que existe un riesgo de infección. Sin embargo, no encontrarlas no significa necesariamente que estén ausentes.

Si la presencia de leptospirosis patógenas resulta en infección dependerá de un número de factores tales como la concentración de las leptospirosis, la duración de la exposición, la posibilidad que las leptospirosis puedan penetrar el cuerpo humano, etc.

Si se sospecha la contaminación de la superficie de aguas con leptospirosis patógenas, una forma de evaluar la posibilidad de contaminación es revisando el área alrededor del cuerpo de agua para la presencia de animales que puedan ser fuentes de infección. Este consejo aplica para todas las situaciones en donde se sospeche la transmisión.

**Avisos de riesgo
(viajeros, turistas,
grupos de riesgo)**

**¿Qué aviso puede ser dado a una persona que pregunte si existe un
riesgo de infección con leptospirosis?**

Individuos, particularmente aquellos que pertenezcan a un grupo de riesgo conocido (Anexo 2) deben ser conscientes del riesgo potencial de infección por leptospirosis asociado con ambientes donde los animales están presentes. El individuo puede tomar las medidas de precaución y prevención dadas en el Anexo 3. Durante un período de alto riesgo de exposición, un doctor puede considerar prescribir doxiciclina como profilaxis, balanceando el riesgo de efectos colaterales no deseados contra los efectos por la leptospirosis. Cuando circunstancias, ocupacionales, recreativas o sociales ponen al público en riesgo, aquellos a quienes corresponda deben generar conciencia sobre los síntomas de la leptospirosis. Si una persona desarrolla un cuadro clínico compatible con leptospirosis, debe buscar atención médica sin demora e informar al personal de salud sobre la exposición.

**Leptospirosis
endémica**

¿Cómo se pueden planear las medidas de control en un área endémica?

En muchos departamentos de salud, una persona o un pequeño grupo de personas serán las responsables de la vigilancia y control de la leptospirosis junto con otras enfermedades. Cuando en un área la leptospirosis es un problema mayor, es conveniente formar un comité “*ad hoc*” para ayudar en el desarrollo de medidas de control en la comunidad. Tal comité, usualmente encabezado por un profesional de la salud pública, puede incluir representantes de varias disciplinas relevantes al problema. Estas disciplinas incluyen especialistas en vigilancia en salud pública, personal de laboratorio de salud pública, expertos en control de roedores, representantes de universidades locales (epidemiólogos de salud pública, especialistas en enfermedades infecciosas, medicina preventiva, seguridad y salud ambiental, y veterinarios), médicos practicantes, ganaderos (de carne y lecheros), criadores de cerdos, oficiales responsables de parques, áreas recreativas, pesca y vida salvaje, agricultura y militares involucrados en medicina preventiva. Trabajando en conjunto, un comité puede ser más efectivo en la planificación e implementación de medidas de control y prevención en la comunidad y la identificación de recursos que puedan amplificar el alcance de la educación de la comunidad. Ejemplos específicos se encuentran en los Anexos 3 y 4.

**Brote de una
enfermedad
parecida con
leptospirosis**

**¿Qué medidas deben ser tomadas si hay un brote de una enfermedad con
manifestaciones compatibles con la leptospirosis?**

La leptospirosis es fácilmente confundida con otras enfermedades febriles.

Condiciones climáticas que causan inundaciones pueden incrementar el riesgo de leptospirosis y otras enfermedades. Una respuesta temprana a un brote de una enfermedad febril inesperada debe incluir una prueba rápida de rastreo para leptospirosis.

Al contrario de la mayoría de las infecciones virales, un tratamiento efectivo y específico está disponible para la leptospirosis. Por tanto, donde sea posible, las tentativas para el diagnóstico de la leptospirosis deben ser alentadas para proveer la implementación de un tratamiento temprano con antibióticos adecuados y otras medidas de apoyo.

Esto requiere la colección de muestras clínicas para pruebas de laboratorio. Para brotes en áreas remotas, el uso local de pruebas de rastreo para la detección de anticuerpos puede ser de mucha ayuda. Sin embargo, se deben tener en cuenta las limitaciones de tales pruebas, en particular, el hecho que los anticuerpos no son detectables hasta al menos 5 - 6 días después de la aparición de los síntomas de la enfermedad.

Para detectar animales reservorios, animales domésticos y salvajes deben ser investigados por serología y cultivo para la infección con leptospiras. Los hallazgos deben corresponder con los hallazgos en los pacientes con leptospirosis.

Cuando se sospecha un brote de leptospirosis o se lo identifica por pruebas diagnósticas, debe darse información apropiada a aquellos que están en riesgo. Esta puede incluir la emisión de comunicados de prensa (brindando información sobre la identificación de la enfermedad, la importancia de buscar atención médica apropiada para aquellos que desarrollen la enfermedad y las formas en que la exposición puede ser limitada o prevenida) colocación de avisos de alerta si el brote se confirma a pocas fuentes (p.ej lagos). Consejos más específicos se encuentran *en Anexos 3 y 4*.

ANEXO 1.

DIRECCIONES DE CENTROS DE EXPERTOS Y DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE LEPTOSPIROSIS (ILS)

I. Centros Colaboradores

OMS/FAO - Centro Colaborador para Referencia e Investigación en Leptospirosis
Queensland Health Scientific Services
39 Kessels Road, Coopers Plains, QLD 4108, Australia.
Tel: + 61 7 32 74 90 64; Fax: + 61 7 32 74 91 75
Dr. L. D. Smythe. Email: Lee_Smythe@health.qld.gov.au
Sitio Web: http://www.health.qld.gov.au/ghpss/ghps/lepto_home.htm

OMS/FAO - Centro Colaborador para Referencia e Investigación en Leptospirosis
Koninklijk Instituut voor de Tropen / Royal Tropical Institute (KIT), KIT Biomedical Research
Meibergdreef 39, NL – 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.
Tel: + 31 20 566 54 38 / 40; Fax: + 31 20 697 18 41
Dr. R. A. Hartskeerl. Email: R.Hartskeerl@kit.nl
Sitio Web: www.kit.nl

OMS/FAO - Centro Colaborador para Epidemiología de Leptospirosis.
Unité de Biologie des Spirochètes, Centre National de Référence des leptospiroses, Institut Pasteur
28 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris, Cedex 15, France.
Tel: + 33 1 45 68 83 37; Fax: + 33 1 40 61 30 01
Dr. M. Picardeau, Dr. M. Cornet. Email: mpicard@pasteur.fr y mcomet@pasteur.fr
Sitio Web: www.pasteur.fr

OMS – Centro Colaborador para Diagnóstico, Referencia, Investigación y entrenamiento en Leptospirosis
Regional Medical Research Centre, Indian Council of Medical Research
Post Bag No. 13, Port Blair 744101, Andaman and Nicobar Islands, India.
Tel: + 91 3192 25 11 58 / 251043, Fax: + 91 3192 25 11 63
Dr. P. Vijayachari. Email: pblicmr@sancharnet.in y vijayachari@yahoo.com

OPS/OMS – Centro Colaborador en Leptospirosis
Laboratório Nacional de Referência em Leptospiroses. Departamento de Bacteriologia; Instituto Oswaldo Cruz – IOC.
Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brasil
Tel: + 55 21 22 70 65 65 and + 55 21 25 98 42 83; Fax: + 55 21 22 70 65 65 and + 55 21 25 98 42 83
Dra. Martha Pereira. Email mpereira@ioc.fiocruz.br
Sitio Web: www.ioc.fiocruz.br y <http://labcentres@ioc.fiocruz.br>

II. Centros de Referencia

OIE - Laboratorio de Referencia para Leptospiras,
Queensland Health Scientific Services
39 Kessels Road, Coopers Plains, QLD 4108, Australia.
Tel: + 61 7 32 74 90 64; Fax: + 61 7 32 74 91 75
Dr. L. D. Smythe. Email: Lee_Smythe@health.qld.gov.au
Sitio Web: http://www.health.qld.gov.au/ghpss/ghps/lepto_home.htm

OIE - Laboratorio de Referencia para Leptospiras,
Koninklijk Instituut voor de Tropen / Royal Tropical Institute (KIT), KIT Biomedical Research
Meibergdreef 39, NL – 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.
Tel: + 31 2 05 66 54 38 / 40; Fax: + 31 2 06 97 18 41
Dr. R. A. Hartskeerl. Email: R.Hartskeerl@kit.nl
Sitio Web: www.kit.nl

OIE - Laboratorio de Referencia para Leptospiras,
Veterinary Sciences Division, Agri-Food & Biosciences Institute
Stoney Road, Stormont, Belfast BT4 3SD, Northern Ireland, UK.
Tel: + 44 0 28 90 51 94 41; Fax: + 44 0 28 90 52 57 55
Dr. Dermot Mackie. Email: Dermot.Mackie@afbini.gov.uk

OIE - Laboratorio de Referencia para Leptospiras,
Instituto de Patobiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria, Castelar
Casilla de Correo 77, 1708 Morón, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.
Tel: + 54 11 46 21 12 89; Fax: + 54 11 46 21 17 12
Dr. L. Samartino. Email: lsanma@correo.inta.gov.ar

OIE - Laboratorio de Referencia para Leptospiras,
Gerencia de Laboratorios, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
Av. Alexander Fleming 1653, 1640 Martínez, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.
Tel: + 54 11 48 36 19 92; Fax: + 54 11 48 36 19 92
Dra. Gleyre T.D. de Mazzone. Email: dilab@senasa.gov.ar y gmazzone@senasa.gov.ar

OIE - Laboratorio de Referencia para Leptospiras,
National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010, United States of America
Tel: + 1 515 663 75 65; Fax: + 1 515 663 75 69
Dr. D. Miller. Email: david.a.miller@aphis.usda.gov

III. Centros de Experiencia

Statens Serum Institut, Department of Bacteriology, Mycology and Parasitology
Artillerivej 5 DK-2300 Copenhagen S, Denmark.
Tel: +45 3268 3745; Fax: + 45 3268 3873
Dr. K.A. Krogh. Email: KAK@ssi.dk

Leptospirosis Laboratory, Israel Institute of Biological Research
P.O. Box 19, Ness-Ziona 70450, Israel.
Tel: +972 8 938 1656; Fax: + 972 8 940 1404
Dr. A. Barnea

Leptospirosis Laboratory, Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology
Gamaleya Street 18, 123098 Moscú, Rusia.
Tel: +7 095 19 3 300; Fax +7 095 193 6183
Dr. J.V. Ananyina. Email: 1570.q23@g23.relcom.ru

Leptospirosis Laboratory, Institute of Epidemiology, Medical Faculty of the Comenius University
Spitalska 24, 81372 Bratislava, Slovakia.
Tel: +421 2 5935 7488; Fax: +421 2 5935 7506
Prof. P. Bakoss; Email: Pavol.Bakoss@fmed.uniba.sk

Leptospira Reference Unit, Department of Microbiology and Immunology, County Hospital, Hereford
HR1 2ER, United Kingdom.
Tel: +44 1432 277 707; Fax: +44 1432 351 396
Dr. A. S. Johnson. Email: leptospira.lru@htr.nhs.uk

Bacterial Zoonoses Branch, Center for Disease Control and Prevention, Public Health Service,
Department of Health and Human Services, Atlanta
GA 30333, USA.
Tel: + 1 404 639 2743; Fax: + 1 404 639 4421
Dr. R. L. Galloway. Email: zul0@cdc.gov

Leptospira Laboratory, Ministry of Health, Lower Collymore Rock
Enmore 2, St. Michael, Barbados
Tel: +1 246 427 5586, Fax: +1 246 429 6738
Dr. C. Edwards. Email: cedwards@sunbeach.net y chedwards@caribesurf.com

Chinese Academy of Preventive Medicine, Institute of Epidemiology and Microbiology
P.O. Box 5, Chang Ping, Beijing 102206, People's Republic of China.
Tel: +86 10 6978 9319; Fax: +86 10 6978 0233
Prof. Jiang XiuGao. Email: xiaogao@163.net

Ministry of Health, National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products
Temple of Heaven, Beijing, People's Republic of China.
Tel: +86 10 670 1775-404/352
Dr Qin JinCai

Consiliar Laboratory for Leptospirosis, Federal Institute for Risk Assessment
Diedersdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany
Tel: +49 (0) 30 8412 2053; Fax: + 49 (0) 30 8412 2000
Dr. K. Nöckler. Email: karsten.noeckler@bfr.bund.de
Sitio Web: www.bfr.bund.de

National Centre for Leptospirosis, Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Viale
Regina Elena 299, I-00161 Rome, Italy
Tel: +39 06 4990 2741; Fax: +39 06 4990 2934 / 4938 7112
Dr L. Ciceroni. Email: ciceroni@iss.it

Laboratorio Spirochete, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Trieste
Via Fleming 22, I-34127 Trieste Italy
Tel: +39 040 676 7178; Fax: 39 040 56 822
Prof. M. Cinco. Email: Cinco@univ.trieste.it
Sitio Web: <http://dfp.univ.trieste.it/spirolab/>

Leptospira Laboratory, Institut Pasteur of New Caledonia
9-11 Paul Doumer Street, PO Box 61, 98845 Noumea Cedex, New Caledonia
Tel: +687 277 531; Fax: + 687 273 390
Dr. F. Merien. Email: fmerien@pasteur.nc

National Leptospirosis Reference Center, US Department of Agriculture / ARS, National Animal Disease
Center, Bacterial Diseases of Livestock Research Unit
P.O Box 70, Ames, IOWA 50010, USA
Tel: +1 515 663 7392; Fax: +1 515 663 7458
Dr. R.L Zuerner. Email: Richard.Zuerner@ars.usda.gov

IV. International Leptospirosis Society (ILS)

International Leptospirosis Society (ILS), c/o KIT (Koninklijk Instituut voor de Tropen / Royal Tropical
Institute), KIT
Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands
*Dr R.A. Hartskeerl, President; Dr. R. Chappel, President Elect, Dr J. Vinetz, Secretary; Dr B Adler, Adjunct
Secretary*
Tel: +31 20 566 5438; Fax: +31 20 697 1841, Email: R.Hartskeerl@kit.nl
Sitio Web: www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html

V. Laboratorios Nacionales de Referencia en Latinoamérica y el Caribe

AMÉRICA DEL SUR

ARGENTINA

HUMANOS

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”, Administración Nacional de
Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), Blas Parera. 8260, Santa Fe, Argentina

Tel. + 54 (343) 4892 830; Fax: +54 (343) 4892 827
Bibiana Vanasco; jlotters@fbc.unl.edu.ar

VETERINARIA

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; CASTELAR
Las Cabañas y Los Reseros, Villa Udaondo, Castelar, Argentina
Tel. + 54 11 4 6211289 interno 23; Fax: + 54 11-4-621-1712
Bibiana Brihuega. Email: bbrihuega@cnia.inta.gov.ar
Luis Samartino. Email: lsanma@cnia.inta.gov.ar

Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria, Coordinación de Bacteriología
Av. Fleming 1653, Martínez, CP 1640, Buenos Aires, Argentina
Tel: + 54 (11) 4836 1992; Fax: + 54 (11) 4836 1992
Dra. Gleyre Mazzonelli. Email: dilab@senasa.gov.ar o gmazzone@senasa.gov.ar
Dra. Jessica Petrakovsky. Email: jpetraco@senasa.gov.ar

BOLIVIA

HUMANOS

Centro Nacional de Enfermedades Tropicales, Ministerio de Salud (CENETROP)
Av. 26 de Febrero esquina Centenario. Zona Universitaria. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia
Tel: + 591 3 354 2006; Fax: + 591 3 354 1801
Dra. Yelín Roca Sánchez. Email: velin_roca@yahoo.com.mx

VETERINARIA

Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIVET)
Av. Ejercito N° 153, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia
Tel: + 591 3 332 2630;
Dra. Ana María Cuellar. Email: cuellaranamaria@hotmail.com

BRASIL

AMBOS

Instituto Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21.045 - 900.
Tel: + 55 (21) 2598 4283; 2270 6565; 2958 4283; Fax: + 55 (21) 2270 6565; 2958 4283
Dra. Martha Maria Pereira. Email: mpereira@ioc.fiocruz.br

CHILE

HUMANOS

Instituto de Salud Pública de Chile.
Avenida Marathon 1000, Ñuñoa, Santiago.
Tel: + 56 (2) 350 7477; Fax: + 56 (2) 350 7578
Liliana Urrea Molina. Email: lurra@ispch.cl

COLOMBIA

HUMANOS

Instituto Nacional de Salud

Avenida calle 26 No. 51-20 - Zona 6 CAN Bogotá, D.C., Colombia
Tel.: + 571 220 7700; Fax: + 571 220 0901
María Victoria Ovalle. Email: movalle@ins.gov.co

VETERINARIA

Instituto Colombiano Agropecuario
Av. El dorado Nro 42 - 42, Bogotá, Colombia
Tel: + 57 (1) 368 6827 - ext 137
Ivonne Yulieth Hernández Toro. Email: ivonhernandez@gmail.com

ECUADOR

AMBOS

Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Zona Norte - Quito, Laboratorios de Salud Animal
Iquique 2045 y Yaguachi, Quito-Ecuador
Tel: + 593 (2) 255 2715; 269 0749; Fax: + 193 (2) 255 2715; 269 0749
Dr. Luis Vasco. Email: mhchiriboga@hotmail.com y inh@andinanet.net

Laboratorios del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez
Esmeraldas 905 y Julián Coronel, Guayaquil, Ecuador
Tel: + 593 228 2281; Fax: + 593 429 3189
Dr. Washington Yépez Plascencio. Email: wyepez@inh.gov.ec y sescobar@inh.gov.ec

PARAGUAY

HUMANOS

Laboratorio Central de Salud Pública
Avenida Venezuela y Florida, Asunción, Paraguay
Tel: + 595 (21) 294 999; Fax: + 595 (21) 294 999
Dr. Mario Fabián Martínez Mora. Email: mmartinez@sce.cnc.una.py
Dra. Beatriz Quiñones. Email: bacref@cmm.com.py

VETERINARIA

Dirección General de Laboratorios - DIGELAB
Calle Ciencia Veterinarias c/ 2da - Km 10,5 - San Lorenzo - Paraguay
Tel: + 595 (21) 584 496; Fax: + 595 (21) 584 496
Dra. Natalia Vergara. Email: nvergara@senacsa.gov.py
Sitio Web: www.senacsa.gov.py

PERÚ

HUMANOS

Instituto Nacional de Salud
Av. Defensores del Morro 2268, Chorrillos Lima
Tel: + 511 251 6151 (Anexo 429); Fax: + 511 2516151 (Anexo 541)
Dr. Manuel Céspedes Zambrano. Email: mcespedes@ins.gob.pe

URUGUAY

AMBOS

Dirección de Laboratorios Veterinarios. Servicio de Leptospirosis
Ruta 8, Brig. Gral. Juan A. Lavalleja, Km 17 ½, Montevideo, Uruguay
Tel: + 598 (2) 222 1063 (ext. 111); Fax: + 598 (2) 222 1157
Dra. Nora Negrín. Email: nnegrin@mgap.gub.uy

VENEZUELA

HUMANOS

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel
Ciudad Universitaria, Universidad Central de Venezuela, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela
Tel: + 58 (212) 693 45 51; Fax: + 58 (212) 693 45 51
Lic. Eneida López. Email: eneida_lopez_ve@yahoo.com

VETERINARIA

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
Avenida Principal Las Delicias, Maracay, Estado Aragua, Venezuela.
Tel: + 58 (243) 247 4111; Fax: + 58 (243) 247 4111
Responsable a designar

MÉXICO Y AMÉRICA CENTRAL

MÉXICO

HUMANOS

Instituto Nacional de Diagnostico Referencia Epidemiológica
Prolongación Carpio 470 Col. Sto. Tomas C.P. 11340 México DF
Tel: + 52 (55) 5342 7574; 5342 7578; 5341 1101; Fax: + 52 (55) 5341 3264
Dra. Rosario García Suárez. Email: rosleptos@hotmail.com

COSTA RICA

HUMANOS

Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud
Cartago, Tres Ríos 100 metros al oeste de la estación de servicio Tinoco, Costa Rica
Tel: + 506 279 9911; Fax: + 506 279 5546
Dra. María de los Ángeles Valverde Jiménez. Email: mvalverde@inciensa.sa.cr

EL SALVADOR

HUMANOS

Laboratorio Central "Dr. Max Bloch"
Alameda Roosevelt entre Hospital Nacional Rosales y Sanidad Militar, San Salvador, El Salvador
Tel: + 503 271 1337 – 221 5751; Fax: + 503 271 1337
Lic. Martha Elizabeth Meléndez. Email: labcentralsv@yahoo.es y emelendezquev@yahoo.es

GUATEMALA

HUMANOS

Laboratorio Nacional de Salud

Km 22 Carretera al Pacífico, Barcena, Villa Nueva, Guatemala
Tel: + 502 6630-3014; Fax: + 502 6630-6011
Lic. Leticia del Carmen Castillo Signor. Email: leticiadelcarmen@gmail.com,

VETERINARIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Universidad de San Carlos
Ciudad Universitaria, Zona 12, Ciudad Guatemala, Guatemala
Tel : + 502 2443 9500 ext. 1666
Dra. Blanca Zelaya de Romillo. Email: zelayaromillo@yahoo.es

HONDURAS

HUMANOS

Laboratorio Nacional de Vigilancia de la Salud, Sección Bacteriología
Centro de Salud Alonso Suazo, 3er Piso, Barrio Morazán, Tegucigalpa, Honduras.
Tel: + 504 232 5840; Fax: + 504 239 7580
Dra. María Luisa Matute. Email: marialuisamatute@yahoo.com.mx

VETERINARIA

Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinarias.
Nueva aldea, Carretera a Lepaterique, Km 13, Francisco Morazán, Honduras
Tel: + 504 229 0536; 504 229 0677; Fax: + 504 229 0677
Dra. Brenda Margarita Orellana Madrid. Email: baide6@hotmail.com

NICARAGUA

HUMANOS

Centro Nacional de Diagnostico y Referencia
Complejo Nacional de Salud, Dra. Concepción Palacios, Managua, Nicaragua
Tel: + 505 289 4604; Fax: + 505 289 7723
Dr. Alcides González Mairena. Email: cndr@ibw.com.ni y cndr@minsa.gob.ni

PANAMA

HUMANOS

Laboratorio Central del Ministerio de Salud (MINSA)
Av. Justo Arosemena, Ed. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Panamá
Tel: + 507 227 7121; Fax: + 507 227 7122
Lic. Carlos Raúl Justo. Email: cjusto@gorgas.gob.pa

VETERINARIA

Laboratorio de Diagnóstico e Investigación Veterinaria (MIDA)
Rio Tapia Tocumen, Apartado 5390, Panamá 5, Panamá
Tel: + 507 266 0187; Fax: + 507 220 3266
Dra. Miroslava Tarté Vasquez. Email: mtartevasquez@yahoo.com

CARIBE

BARBADOS

Veterinary Services Laboratory
The Pine, Saint Michel, Barbados, West Indies
Tel: + 1 246 427 5492; Fax: + 1 246 429 2143
Dr. David Elcock. Email: vetlab@caribsurf.com

CUBA

HUMANOS

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí
Autopista Novia del Mediodía Km. 61/2, Box 601, Marianao 13, La Habana, Cuba
Tel: + 53 (7) 202 0651; Fax: + 53 (7) 204 6051
Dra. Carmen Fernández Molina. Email: carmen@ipk.sld.cu

HAITI

AMBOS

Laboratorio TAMARINIER
Route Nationale # 1, rue 15, Bon Repos, Port-au-Prince, Haiti.
Tel: + 1 509 513 5733
Dr. Michel Alain Louis. Email: michelalainlouis@yahoo.com

JAMAICA

VETERINARIA

Ministry of Agriculture, Veterinary Services Division
193 Old Hope Road, Kingston 6, Jamaica
Tel: + 1 876 977 2489; 927 0594; Fax: + 1 876 977 0885
Dr. Cedric Lazarus. Email: cedriclazarus@yahoo.com

REPÚBLICA DOMINICANA

VETERINARIA

Laboratorio Veterinario Central
Av. Monumental, Los Girasoles, Santo Domingo, Rep. Dominicana
Tel: +1 809 564 6500; Fax: + 1 809 560 0449
Dra. Sandra Cabral. Email: lab.veterinario@codetel.net.do

TRINIDAD Y TOBAGGO

HUMANOS

Caribbean Epidemiology Centre
16-18 Jamaica Boulevard, Federation Park, Port of Spain, Trinidad
Tel: + 1 868 622 4262; Fax: + 1 868 622 2792
Mrs. Radha Gosein. Email: goseinra@carec.paho.org

ANEXO 2

FACTORES DE RIESGO Y GRUPOS DE RIESGO

La exposición depende de la probabilidad de contacto entre humanos y animales infectados o con un ambiente contaminado. Los nombres dados para algunas formas de la leptospirosis (p.ej. fiebre de los campos de arroz, enfermedad de los cortadores de caña, enfermedad de la porqueriza, fiebre del tambo, fiebre del barro) reflejan las condiciones de en que se produce la transmisión. El grado y naturaleza de la exposición depende muchas veces de actividades ocupacionales y /o de actividades recreativas y sociales, como se muestra en los siguientes ejemplos.

- Los ganaderos se pueden exponer al manipular ganado, principalmente durante el ordeño, o cuando manipulan fetos muertos, abortados u otros productos de desecho de partos o abortos, como placenta o líquido amniótico; o si entran en contacto con gotas infecciosas cuando el ganado está orinando.
- Criadores de cerdos pueden exponerse durante las tareas de cuidado de los animales.
- Agricultores y jardineros pueden exponerse, directa o indirectamente, a roedores infectados o a su orina.
- Los granjeros pueden estar expuestos a agua contaminada por la orina de roedores u otros animales, cuando irrigan sus campos.
- Cultivadores de arroz, particularmente cuando trabajan descalzos, pueden estar expuestos al agua contaminada por roedores o búfalos, p.ej. cuando están arando.
- Los veterinarios o cuidadores de mascotas pueden exponerse a animales infectados que están enfermos o murieron de leptospirosis o que son portadores/excretadores asintomáticos (esto también aplica a criadores de ganado bovino y porcino).
- Trabajadores de mataderos y carniceros pueden exponerse cuando sacrifican animales infectados y manipulan carcasas u órganos infectados, p.ej. riñones.
- Las personas involucradas en la preparación de alimentos pueden estar expuestas a un entorno contaminado por ratas cuando las medidas higiénicas no son las adecuadas.
- Trabajadores de alcantarillas pueden estar expuestos a aguas residuales contaminadas con orina de roedores.
- Trabajadores de las plantaciones de caña de azúcar pueden exponerse al cortar caña contaminada con orina de roedores que habitan en el área de cultivo.
- Los mineros pueden estar expuestos a agua contaminada con orina de rata en las galerías de las minas.
- Las personas pueden exponerse al arrear ganado.
- Personas que viven en estrecho contacto con animales domésticos pueden estar expuestas si éstos están infectados.
- Pescadores en ríos y trabajadores de granjas de peces o camarones pueden estar expuestos, en particular si el ambiente y la superficie de las aguas están contaminadas.
- Soldados, cazadores y excursionistas pueden exponerse al cruzar superficies de agua contaminadas o pantanos, cuando caminan por suelos contaminados, barro o vegetación húmeda o por contacto con animales.
- Los niños pueden estar expuestos cuando juegan en patios (con charcos o barro) contaminados con orina de animales infectados, tales como perros, cerdos o ratas.
- Los participantes en actividades recreativas (natación, navegación, canotaje, navegación en balsa, explorando cuevas, canotaje, pesca) o que estén involucrados en accidentes (de autos o botes) donde pueden entrar en contacto con superficies de agua contaminadas, especialmente con una prolongada inmersión (cabeza bajo el agua). Esto también se aplica a viajeros que participan en viajes de aventuras en la selva o de actividades deportivas al aire libre.

- Poblaciones enteras pueden estar expuestas cuando la fuente de agua de bebida es tratada de manera inadecuada.
- El personal de laboratorio involucrado en el diagnóstico y la investigación sobre leptospirosis y otras investigaciones zoonóticas y, especialmente, los trabajadores de campo están en riesgo de exposición. (Ver Anexo 17).

Aunque la leptospirosis es generalmente considerada como una enfermedad rural, las personas que viven en ciudades también pueden estar expuestas, principalmente a roedores. El riesgo de tal exposición dependerá de las condiciones de vida y del nivel de higiene, tanto de la casa como de su entorno inmediato, y de las condiciones sanitarias y de higiene general en las diferentes áreas de una ciudad. El número de hombres con leptospirosis es generalmente más alto que el de mujeres. Esto puede ser un reflejo de la exposición ocupacional en las actividades dominadas por hombres. Por la misma razón, hombres jóvenes y de mediana edad pueden tener una prevalencia más elevada de leptospirosis que niños y hombres adultos mayores.

Los brotes de leptospirosis han sido reportados luego de desastres naturales tales como inundaciones y huracanes.

REFERENCIAS

Bovet, P., Yersin, C., Merien, F., Davis, C.E., Perolat, P. Factors associated with clinical leptospirosis: a population – based case-control study in the study in the Seychelles (Indian Ocean). *International Journal of Epidemiology*, 28:583-590, 1999.

Cacciapuoti, B., Ciceroni, L., Maffei, C., Di Stanislao, F., Strussi, P., Calegari, L., Lupidi, R., Scalise, G., Cagnoni, G., Renga, G. A waterborne outbreak of leptospirosis. *American Journal of Epidemiology*, 126 (3): 535-545, 1987.

Campagnolo, E.R., Warwick, M.C., Marx, Jr H.L., Cowart, R.P., Donnell, Jr. H.D., Bajani, M.D., Bragg, S.L., Estaban, J.E., Alt, D.P., Tappero, J.W., Bolin, C.A., D.A. Ashford, D.A. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(5):676-682, 2000.

Centers for Diseases Control and Prevention. Outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage - Nicaragua, 1995. *Journal of the American Medical Association*, 274(21):1668, 1995.

Centers for Diseases Control and Prevention. Update: Leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons-Illinois and Wisconsin, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 47:673-676, 1998.

Centers for Diseases Control and Prevention. Update: Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000 – Borneo, Malaysia, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 50:21-24, 2001.

Corwin, A., Ryan, A., Bloys, W., Thomas, R., Deniega, B., Watss, D. A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. *International Journal of Epidemiology*, 19(3): 743-748, 1990.

van Crevel, R., Speelman, P., Gravekamp, C., Terpstra, W.J. Leptospirosis in travelers. *Clinical Infectious Diseases* 19:132-134, 1994.

Everard, C.O.R., Ferdinand, G.A., Butcher, L.V., Everard, J.D. Leptospirosis in piggery workers on Trinidad. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92:253-258, 1989

Everard, C.O.R., Bennett, S., Edwards, C.N., Nicholson, G.D., Hassell, T.A., Carrington, D.G., Everard, J.D. An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95:13-22, 1992.

Katz, A.R., Manea, S.J., Sasaki, D.M. Leptospirosis on Kauai: Investigation of a common source waterborne outbreak. *American Journal of Public Health*, 81(10): 1310-1312, 1991.

Ko, A.I., Reis, M.G., Dourado, C.M.R., Johnson, W.D., Riley, L.S. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*, 354: 820-825, 1999.

Leptospirosis in India-Report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999 *Weekly Epidemiological Record*, 75(27): 217-223, 2000.

Mackintosh, C.G., Schollum, L.M., Harris, R.E., Blackmore, D.K., Willis, A.F., Cook, N.R., Stoke, J.C.J. Epidemiology of leptospirosis in dairy farm workers in the Manawatu. Part I: A cross-sectional serological survey and associated occupational factors. *New Zealand Veterinary Journal*, 28:245-250, 1980.

Murhekar, M.V., Vijayachari, P., Sharma, S., Sehegal, S.C. Risk factors in the transmission of leptospirosis infection. *Indian Journal of Medical Research*, 107:218-223, 1998.

Onyemelukwe, N.F. A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern Nigeria among people at occupational risk. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96: 301-304, 1993.

Sanders, E.J., Rigua-Perez, J.G., Smits, H.L., Deseda, C.C., Vorndam, V.A., Aye, T., Spiegel, R.A., Weyant, R.S., Bragg, S.I. Increase in leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61: 399-404, 1999.

Sasaki, D.M., Pang, L., Minette, H.P., Wakida, C.K., Fujimoto, W.J., Manea, S.J., Kunioka, R., Middleton, C.R. Active surveillance and risk factors leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 35-43, 1993.

Sehegal, S.C., Vijayachari, P., Murhekar, M.V., Sugunan, A.P., Sharma, S., Singh, S.S. Leptospirosis infection among primitive tribes of Andaman and Nicobar Islands. *Epidemiology and Infection*, 122: 423-428, 1999.

Sehegal, S.C., Sugunan, A.P. Leptospirosis in Andamans-Epidemiological considerations. Leptospirosis in western Pacific and South East Asia. In: *Proceedings of the Regional Seminar – Workshop on Leptospirosis*. Manila, WHO Regional Office for the Western Pacific, 2000. (Unpublished document; available in electronic form from: WHO Western Pacific Regional Office, Email: csr@wpro.who.int): 45-56.

Shaw, R.D. (1992). Kayaking as a risk factor for leptospirosis. *Missourri Medicine*, 89: 354-357.

Anexo 3

CONTROL DE LA LEPTOSPIROSIS

A 3.1 INTRODUCCIÓN

El control puede llevarse a cabo en la forma de las siguientes intervenciones:

- en la fuente de infección (huésped reservorio/portador/excretor);
- en las vías de transmisión;
- a nivel del huésped humano

Debe recordarse que:

- En un área determinada pueden coexistir muchos serovares y muchos huéspedes reservorios, cada uno con su propio nicho ecológico especial.
- Existen muchas vías por las cuales pueden infectarse los seres humanos, dependiendo de la fuente de infección y las condiciones ambientales prevalentes (ver Anexo 2).

En vista de lo anterior, no se pueden establecer normas generales para el control de la leptospirosis y para cada situación deben encontrarse soluciones específicas. Se dan a continuación ejemplos de medidas de intervención.

La erradicación de la leptospirosis en animales silvestres no es posible, pero en poblaciones pequeñas y definidas (perros, rebaños certificados, etc.) las medidas de control pueden ser altamente efectivas.

A 3.2 INTERVENCIONES EN LA FUENTE DE INFECCIÓN

A 3.2.1 Fuentes animales de infección

Las leptospiras viven y se multiplican en los riñones de un portador (generalmente un mamífero) o en un huésped animal de mantenimiento. Son excretadas por la orina y los animales que excretan leptospiras son llamados eliminadores o excretores.

Una cepa particular de *Leptospira* tiene, en general, preferencia por cierto huésped animal con el cual existe una relación de comensalismo donde el huésped no sufre o, comparativamente, sufre sólo una forma leve de infección. Los animales infectados transfieren las leptospiras a su prole *in utero* o durante el período neonatal. Dicha prole transfiere la infección a su propia prole y así sucesivamente. En esta forma, una cadena de infección es continuada por el huésped de mantenimiento. Al mantener la infección, tal huésped de mantenimiento se constituye en el reservorio de la infección.

Los humanos o animales que no son los huéspedes de mantenimiento pueden llegar a infectarse accidentalmente y son llamados huéspedes "incidentales" o "accidentales". Tales huéspedes con frecuencia desarrollan la enfermedad.

La distinción entre huésped natural o de mantenimiento y huésped incidental o accidental no siempre es claramente distinguible, especialmente en animales domésticos cuando son mantenidos en condiciones de hacinamiento que favorecen la transmisión.

Estados excepcionales y de transición pueden también ocurrir como se indica a seguir:

- Las leptospiras pueden adaptarse a un nuevo huésped que puede convertirse, eventualmente, en un huésped natural de mantenimiento si la infección en sí misma se establece en una población de animales de la misma especie, formando así un reservorio de infección.
- Un animal puede portar y excretar leptospiras temporalmente sin ser un huésped natural de mantenimiento, si la infección en sí misma no se establece en una población de animales de una misma especie.
- La infección puede tomar un curso crónico en el huésped de mantenimiento con o sin secuelas serias.

A 3.2.2 Detección de las fuentes de infección

Historias de exposición junto a una adecuada anamnesis de las actividades ocupacionales y recreativas pueden ayudar a identificar la fuente de infección. Si se identifica una probable fuente o fuentes de infección, los animales sospechosos deben ser examinados para determinar si ellos son los portadores de leptospiras y si están excretando los organismos en su orina. Animales pequeños pueden ser capturados e identificados y, después de su sacrificio, obtener asépticamente sangre, orina y tejidos (riñones) para el examen. Muestras de animales peridomésticos pueden ser colectadas en granjas o mataderos para ser investigadas para leptospirosis (posiblemente en proyectos colaborativos sobre otros problemas de salud en animales). La orina de animales domésticos grandes puede ser colectada después de la administración de un diurético o por el uso de un catéter. La sangre obtenida de animales debe ser examinada por serología y el tejido de riñón y la orina por cultivo. Los aislamientos realizados a partir de animales deben ser tipificados y comparados con aquellos de humanos.

Es esencial ser conscientes de las limitaciones de los métodos utilizados. La serología tiene valor limitado ya que los animales pueden ser portadores sin evidencia de anticuerpos y la detección de anticuerpos no implica que sean portadores. El cultivo tiene también un valor limitado ya que algunas leptospiras pueden no crecer y algunos animales excretar organismos solo de manera intermitente.

A 3.2.3 Posibles intervenciones

Se incluyen las siguientes

- Los animales infectados (bovinos/cerdos/perros) pueden ser aislados y si es necesario ser destruidos o sacrificados.
- Los animales infectados pueden ser tratados con antibióticos para controlar la excreción de leptospiras.
- Los roedores (ratas, ratones) pueden ser envenenados
- Los roedores y animales salvajes pueden ser capturados
- Se puede impedir el acceso de roedores y otras fuentes silvestres de infección al ambiente humano, mediante la construcción de cercas, cortinas y edificaciones y establos a prueba de roedores.
- Se puede prevenir el acceso de roedores (ratas, ratones) al alimento y agua, construyendo almacenes y depósitos de alimentos, reservorios de agua, establos, patios, corrales a prueba de roedores y retirando toda la comida sobrante fuera del alcance de las plagas.
- Se puede impedir que roedores y otros animales silvestres vivan en áreas de habitación humana manteniendo los alrededores escrupulosamente limpios, removiendo escombros y basuras, cortando pastos y arbustos, instalando un saneamiento adecuado, en particular con una correcta disposición de aguas residuales, de baños y buena provisión de agua limpia.
- Las vacunas pueden ser usadas para la inmunización de mascotas y animales de granja: p.ej. aquellas usadas para perros pueden contener como inmunógenos los serovares icterohaemorrhagiae y canicola; para el ganado: harjo y pomona; para cerdos: pomona, tarassovi y bratislava.
- Los excrementos provenientes de animales domésticos deben ser dispuestos de tal forma de evitar la contaminación.

A 3.3 INTERVENCIONES EN LAS VÍAS DE TRANSMISIÓN

La transmisión puede prevenirse por:

- Uso de ropa protectora (botas, guantes, gafas, delantales, máscaras)
- Cubrir las lesiones de la piel con ropa impermeable
- Lavarse o tomar una ducha después de haber estado expuesto a salpicaduras de orina, suelo o agua contaminada.
- Lavar y limpiar las heridas
- Desarrollar conciencia sobre los riesgos potenciales y los métodos para prevenir o minimizar la exposición p.ej. evitando o previniendo la salpicadura de orina y aerosoles, evitar tocar animales enfermos o muertos, fetos, placentas, órganos (riñones, vejigas) con las manos sin protección y evitar asistir a los animales cuando están pariendo a menos que se usen guantes.
- Utilizar guantes al manejar la orina de perros y otros animales, lavándose las manos posteriormente y siendo conciente de la posibilidad de infección por el cuidado de perros y otros animales enfermos.
- Mantener estrictas medidas higiénicas durante el cuidado y manipulación de animales evitando el contacto con orina y otros líquidos corporales.
- En donde sea posible, desinfectar las áreas contaminadas (fregar pisos en establos, carnicerías, mataderos, etc.).
- Proveer de agua potable.
- Impedir el acceso o dar adecuada alerta sobre cuerpos de agua conocidos o sospechosos de estar contaminados (piscinas, estanques, ríos).
- Mecanizar actividades tales como la cosecha de arroz o el corte de caña.
- Implantar buen manejo del ganado (evitando pastoreos comunales y comprando ganado con certificado de estar libre de leptospirosis).
- Introducir y establecer procedimientos de seguridad estandarizados en laboratorios (*Anexo 17*).

A 3.4 INTERVENCIÓN A NIVEL DEL HUÉSPED HUMANO

Estas deben tomar las formas discutidas a continuación:

A 3.4.1 Incremento de conciencia

Este es un importante enfoque tanto hacia población general como para grupos en riesgo. Las personas necesitan entender la enfermedad y, si es posible, cómo evitar los riesgos; pero también entender que se debe buscar ayuda médica oportuna si se sospecha de leptospirosis después de la exposición. Los médicos y veterinarios deben considerar la leptospirosis como parte del diagnóstico diferencial en casos en que se justifica y proveer tratamiento en tiempo y forma apropiada; por su parte, las autoridades en general y las de salud pública en particular deben introducir medidas preventivas.

A 3.4.2 Profilaxis con antibióticos

El tratamiento profiláctico completo está indicado si se conoce que ha ocurrido la exposición, p.ej. como resultado de un accidente de laboratorio u otra exposición de alto riesgo. Se reporta que la doxiciclina ofrece algún grado de protección a individuos expuestos en áreas no endémicas. Sin embargo, aunque no siempre previene la infección, puede reducir la severidad de la enfermedad y, por consiguiente, su mortalidad y morbilidad.

A 3.4.3 Inmunización

En países en donde se dispone de vacunas, la inmunización puede ser considerada cuando existe un problema importante de salud pública. Las vacunas dan protección solamente contra el serovar o como máximo frente al serogrupo de los serovares presentes en la composición de la vacuna, de forma tal que pueden ser necesarias vacunas que combinen varios antígenos. La protección es de corta duración y es necesaria la revacunación, las vacunas pueden producir efectos colaterales y están disponibles solamente en algunos países.

A 3.4.4 Métodos educativos

Educación y actualización de médicos

Se debe difundir de forma regular información sobre los síntomas de la leptospirosis, factores de riesgo, pruebas diagnósticas y estrategias terapéuticas a médicos y personal vinculado a los servicios de salud. Mensajes directos, artículos en las hojas informativas y boletines de noticias de los departamentos de salud pública, en las revistas locales de medicina, series de presentaciones en hospitales y ambulatorios o mejor todavía, una combinación de todos estos, puede ser usada para este propósito. Mantener un alto nivel de sospecha en las mentes de los clínicos aumentará significativamente la identificación de casos. El impacto exitoso de un programa activo de educación médica puede ser fácilmente vista comparando los porcentajes de impresiones clínicas iniciales correctas de médicos en Hawai (62%) con aquellas de médicos en Estados Unidos en general (27%) (Martone & Kaufmann, 1979) cuando fueron confrontados con un caso eventual confirmado de leptospirosis.

Educación de la comunidad

Una educación generalizada de la comunidad puede ayudar en gran medida para la identificación de factores de riesgo, la prevención de la enfermedad, la reducción de la duración de la enfermedad y su severidad a través del reconocimiento temprano de los síntomas sospechosos y el auto referenciamiento para evaluación y tratamiento. Varios métodos pueden ser usados, como se discute a continuación.

- Panfletos pueden ser producidos a bajo costo y estar disponibles para ser distribuidos profusamente en clínicas, departamentos de salud, departamentos de agricultura, fuerzas armadas, etc. Estos panfletos deben describir la enfermedad, cómo reconocerla clínicamente, cual es el tratamiento y los métodos para prevenir la exposición. El panfleto debe estar escrito en el lenguaje más frecuentemente usado por la comunidad y deben proveer números de contacto telefónico para aquellos que deseen más información.
- Si es políticamente aceptable, avisos de alerta impresos en colores brillantes, pueden ser usados para atraer la atención de la gente. Tales avisos deben listar uno o dos de los factores de riesgo principales, junto con el departamento de contacto y su número telefónico para quien desee más información. Estos avisos pueden ser ubicados en sitios en donde se conoce que existe un riesgo de exposición, así como también en lugares donde los individuos que pertenecen a grupos de riesgo tienen mayor probabilidad de verlos.
- Si los recursos lo permiten, se puede elaborar un video por el departamento de salud o por un comité *ad hoc*, describiendo la enfermedad y cómo reconocerla, tratarla y prevenirla. Estos videos deben ser distribuidos en las oficinas de salud del distrito, bibliotecas y escuelas, y deben estar disponibles para acceso gratuito por parte del público en tiendas de alquiler de videos. Información acerca de su disposición debe ser ampliamente publicitada.
- Carteleras informativas con tablas, gráficas y fotografías de la enfermedad, junto con información sobre su reconocimiento, factores de riesgo, tratamiento y prevención, no son costosos para

realizar y pueden ser muy útiles para promover el mejor entendimiento en campañas de salud, hospitales, clínicas, escuelas y bibliotecas.

- Los comités *ad hoc* deben considerar la producción de camisetas con mensajes apropiados para ser usadas durante actividades educativas y deben ser entregadas a quien quiera una y pueda pagar el costo de su producción.
- Avisos educativos pueden ser desarrollados por un comité *ad hoc* y ubicados en unidades de transporte público para incrementar la conciencia sobre la enfermedad y sus métodos de prevención. Un número telefónico de contacto debe figurar en el aviso para permitir obtener mayor información a la gente interesada.

Diseminación de información para el control de un brote

Cuando ocurre un brote (p.ej. después de un huracán o inundación), tanto la comunidad médica como el público en general necesitan ser informados rápidamente de la situación y de las formas en las cuales la enfermedad puede ser prevenida.

A través de comunicados de prensa y correos, los médicos deben ser informados para ayudarlos a reconocer una posible enfermedad febril debida a leptospirosis y los tratamientos adecuados para la misma.

También mediante comunicados de prensa y anuncios por radio y televisión e incluso poniendo carteles de alerta cuando el brote está confinado a un sitio específico, se debe dar información al público general sobre los signos clínicos de la leptospirosis, el riesgo de exposición y la importancia de acudir al médico tan pronto como sea posible, debido a que la enfermedad responde a antibióticos. Debe proporcionarse también información sobre los métodos de prevención, p.ej. alertar a la población de no tomar o sumergirse en agua que pueda estar contaminada, o de no lavar ropas en agua potencialmente contaminada si cualquier lesión de piel está presente.

Las personas también deben estar informadas de los riesgos para los animales en un brote de gran escala, p.ej. resultante de inundaciones asociadas a huracanes. Los signos y síntomas vistos en animales deben ser publicitados al igual que sobre las vacunas, si están disponibles, que pueden ser administradas a los animales al igual que los antibióticos (como la penicilina) que pueden ser utilizados para minimizar el riesgo de contraer la infección.

REFERENCIAS

Babudieri, B. Schutzzimpfung gegen Leptospirosen. *Zentralblatt für Bakteriologie I Abteilung Originale*, 168:280-283, 1957.

Ting-Zuo, C. Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the Vaccine in China. *Annales Immunologiae Hungaricae*, 26: 125-151, 1986.

Ciceroni, L., Stepan, E., Pinto, A., Pizzocaro, P., Dettori, G., Franzin, L., Lupidi, R., Mansueto, S., Manera, A., Loli, A., Marcuccion, L., Grillo, R., Ciarrochi, S., Cinco, M. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *European Journal of Epidemiology*, 16: 79-86, 2000.

Frantz, J.C., Hanson, L.E., Brown, A.L. Effect of vaccination with a bacterin containing *Leptospira interrogans* Serovar Bratislava on the breeding performance of swine herds. *American Journal of Veterinary Research*, 50:1044-1047, 1989.

Katz, A.R., Ansdell, V.E., Effler, P.V., Middleton, C.R., Sasaki, D.M. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974 - 1998. *Clinical Infectious Diseases*. 33:1834-1841, 2001.

Leptospirosis in India-Report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999. *Weekly Epidemiological Record*, 75(27):217-223, 2000.

Martone, W.J., Kaufmann, A.F. From the Centers for Diseases Control: Leptospirosis in the United States, 1974-1978. *Journal of Infectious Diseases*, 140:1020-1022, 1979.

Perrocheau, A., Perolat, P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year study. *European Journal of Epidemiology*, 13 (2):161-167, 1997.

Sasaki, D.M., Pang, L., Minette, H.P., Wakida, C.K., Fujimoto, W.J., Manea, S.J., Kunioca, R., Middleton, C.R. Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(1):35-43, 1993.

Sehgal, S.C., Suganan, A.P., Murhekar, M.V., Sharma, S., Vijayachari, P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13:249-255, 2000.

Shimizu, M.M. Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, Islands of Hawaii. *International Journal of Zoonoses*, 11: 173-188, 1984.

Takafuji, E.T., Kirkpatrick, J.W., Miller, R.N., Karwacki, J.J., Kelley, P.W., Gray, M.R., McNeill, K.M., Timboe, H.L., Kane, R.E., Sanchez, J.L. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *New England Journal of Medicine*, 310: 497-500, 1984.

Tappero, J., Ashford, J., Perkins, D.A., Leptospirosis. In: Mandell G.L. Bennett J.E. Dolin R, eds. *Principles and practices of infectious diseases*, 5th ed. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone: 2495-2500, 2000.

Torten, M., Shenberg, E., Gerichter, C.B., Neuman, P., Klingberg M.A. A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and Serological evaluation of a field trial with volunteers. *Journal of Infectious Diseases*, 128:647-651, 1973.

World Health Organization. *Report of the WHO Consultation on the Development of National Programs for the Prevention and control of Leptospirosis*, Sapporo, Japan, July 15-16,1984 Geneva (unpublished document WHO/CDS/VPH/86:62: available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland), 1986.

World Health Organization. *Report of Discussions of the WHO Working Group on Leptospirosis Vaccine Development and Vaccinology*, Nagoya, Japan, March 26-27,1993. Geneva (unpublished document VPH/93.122; available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland), 1993.

ANEXO 4

VIGILANCIA

A 4.1 INTRODUCCIÓN

En virtud de la complejidad y variabilidad de la epidemiología de la leptospirosis en sus diferentes manifestaciones es necesario contar con una información de base confiable, como la ofrecida por la vigilancia, antes de considerar el inicio de un programa de control (Anexo 3).

La leptospirosis ocurre mundialmente, pero son escasos los datos confiables sobre su incidencia y prevalencia en las diferentes áreas. La enfermedad es, probablemente, pasada por alto y subnotificada en muchas partes del mundo.

A 4.2 IDENTIFICACIÓN DE CASO (MORBILIDAD Y MORTALIDAD)

A 4.2.1 Estudios basados en hospitales

El diagnóstico debe ser confirmado por pruebas de laboratorio pues las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son frecuentemente atípicas. Se debe sospechar leptospirosis en pacientes que presenten síntomas como fiebre, dolor de cabeza severo, postración, dolor muscular o inyección conjuntival, o en pacientes presentando signos de meningitis aséptica, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto con hemorragia pulmonar, falla renal o ictericia. Se debe obtener información del paciente sobre edad, sexo, ocupación e historia de exposición (lugar, fecha, condiciones del contacto con animales o contacto con ambientes contaminados).

Los métodos de laboratorio deben incluir una prueba serológica confiable y cultivo, el cuál, aunque no contribuye a un diagnóstico temprano, lo confirma cuando se aíslan leptospiras. El aislamiento seguido de tipificación es esencial para la vigilancia ya que provee información acerca de las leptospiras circulantes en un área determinada. Además, esta información puede ser comparada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad en el área de interés. La serología es también importante pero, debido a las reacciones cruzadas, la información obtenida es de valor limitado respecto de los serovares infectantes. Los casos leves pueden no ser admitidos en hospitales, por lo tanto estudios basados en hospitales pueden resultar en un sesgo hacia la severidad al momento de evaluar la importancia en salud pública de la leptospirosis.

Casos muy severos pueden también ser ignorados si los pacientes mueren en una etapa temprana, antes de establecerse el diagnóstico. Especialmente en estos casos, el cultivo, la PCR y la inmunohistoquímica pueden ser métodos útiles para demostrar la etiología de la leptospirosis en muestras postmortem.

A 4.2.2 Vigilancia serológica

La detección de anticuerpos persistentes por la prueba de microaglutinación (MAT) puede dar una indicación de la prevalencia de la leptospirosis en un área determinada. La vigilancia serológica provee información de la leptospirosis mas como infección que como enfermedad y por tanto, como un problema de salud pública, ya que la seropositividad también puede detectarse en casos muy leves. La mejor forma es hacerlo con la MAT usando un panel de antígenos que sea representativo de las leptospiras que circulan localmente. Si las cepas locales no son totalmente conocidas debe usarse un panel amplio, con cepas representativas de todos los serogrupos conocidos. Los anticuerpos persistentes de una infección

pasada son usualmente serogrupo-específicos. El título de los serovares usados como antígenos y su distribución de frecuencias pueden dar información sobre la prevalencia de estos serovares o sobre serovares antigénicamente similares pertenecientes al mismo serogrupo.

Las pruebas de ELISA ofrecen información únicamente de casos recientes o actuales y no dan información sobre los serovares circulantes ya que en esta técnica se usa un antígeno ampliamente reactivo y género-específico para detectar anticuerpos tipo IgM.

A 4.2.3 Grupos de riesgo

Se pueden realizar estudios en grupos seleccionados (cultivadores de arroz, carniceros, etc.) en una población que probablemente esté expuesta a las leptospirosis. Mientras la tasa de incidencia para toda la población en un área puede ser baja, puede ser muy alta en el grupo de riesgo seleccionado. Los métodos preventivos pueden ser focalizados al grupo de riesgo.

A 4.2.4 Estudios de cohorte

Estudios de cohorte, en que el mismo grupo de riesgo de una población es reexaminado después de un intervalo, pueden, a través de la seroconversión, proveer información sobre la incidencia de la infección. Cuestionarios sobre signos y síntomas que sobrevinieron durante el mismo intervalo de tiempo, pueden dar una indicación de la incidencia y presentación de la leptospirosis como enfermedad.

A 4.2.5 Bancos de sangre

El tamizado de donantes de sangre para la detección de anticuerpos antileptospira puede dar una indicación de la prevalencia de la leptospirosis.

A 4.2.6 Formularios para la vigilancia

Los formularios deben ser diseñados para guardar los registros de personas con posible leptospirosis. Los mismos deben ser usados para documentar tanto los casos derivados de situaciones endémicas como de brotes de leptospirosis. Los formularios deben incluir la siguiente información, la cuál ayudará a caracterizar el comportamiento de la enfermedad en la comunidad y a identificar las categorías de personas y áreas de alto riesgo:

- Identificación personal: Nombre, dirección, ciudad/población, estado (departamento), edad, sexo, grupo étnico y ocupación.
- Aspectos clínicos: Nombre del médico, fecha de aparición de síntomas, impresión clínica inicial, período de incubación, hospitalización, duración de la hospitalización, duración de la enfermedad, muerte al igual que una lista de los signos y síntomas clínicos que puedan haber sido observados con la enfermedad.
- Resultados de las pruebas de diagnóstico: nombre(s) de la(s) prueba(s), fechas en que las muestras fueron tomadas y los resultados de las pruebas.
- Historia de exposición (en las 4 semanas anteriores a la aparición de los síntomas), incluyendo el posible contacto con agua o barro contaminado, fecha(s) y lugar(es) de exposición, exposición a animales, lista de animales afectados y si están enfermos o han muerto, presencia de heridas en la piel durante las 4 semanas anteriores a la infección, y fuente(es) de agua potable.
- Impacto económico: días de trabajo perdido como resultado de la enfermedad.

A 4.3 VIGILANCIA ACTIVA Y ESTUDIOS DE CASO-CONTROL

La vigilancia activa es útil para determinar la incidencia de la leptospirosis en una comunidad. Se debe solicitar a los médicos la obtención de sangre completa y suero para cultivo y serología de pacientes que así lo permitan y que presenten síntomas clínicos que cumplan con la definición de caso establecido por el Centro para el Control de Enfermedades de Estados Unidos, la OMS, el Ministerio de Salud Pública o el gobierno nacional. Los cuestionarios deben ser diseñados para caracterizar clínicamente la enfermedad y la historia de la exposición. Una segunda muestra de suero debe ser solicitada, p.ej. 2 - 3 semanas después de la recolección de la primera muestra o antes, ya que la seroconversión puede ocurrir de 5 - 7 días después de la aparición de la enfermedad. Este tipo de vigilancia activa puede dar información valiosa sobre la incidencia "normal" de la leptospirosis en una comunidad y podría identificar los serovares presentes en el área. Las redes de laboratorios de salud pública pueden facilitar el transporte de las muestras a un laboratorio central.

Junto con la vigilancia activa, un estudio paralelo de caso-control para evaluar los factores de riesgo podría identificar con anticipación riesgos desconocidos de exposición a la leptospirosis. Además de la información obtenida arriba y la recolección de muestras para el diagnóstico apropiado, se debe aplicar un segundo cuestionario cubriendo todos los factores de riesgo relevantes. Los controles para este estudio podrían ser aquellos individuos vigilados y encontrados negativos para la enfermedad. Posibles factores de riesgo (durante las 4 semanas antes de la aparición de los síntomas) incluyen la exposición a diversos animales y a su orina, exposición a agua fresca o barro y actividades específicas que involucran exposición, p.ej. natación, alimentación y limpieza de corrales de cerdos, presencia de heridas en la piel, y tomar aguas superficiales o agua de captación y caminar con pies descalzos.

Los cuestionarios completos pueden ser analizados estadísticamente usando un programa de software de acceso libre tal como EpiInfo 6.04 o su última versión EpiInfo 2000, disponible en la Internet a través de la página Web del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos¹.

A 4.4 VIGILANCIA EN ANIMALES

La vigilancia de animales silvestres y domésticos puede ser necesaria para complementar la vigilancia en humanos cuando se están buscando las fuentes de infección.

REFERENCIAS

Chappel, R.J., Prime, R.W., Millar, B.D., Mead, L.J., Jones, R.T.M., Adler, B. Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 30:151-163, 1992.

Ciceroni, L., Stepan, E., Pinto, A., Pizzocaro, P., Dettori, G., Franzin, L., Lupidi, R., Mansueto, S., Manera, A., Loli, A., Marcuccio, L., Grillo, R., Ciarrocchi, S., Cinco, M. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *European Journal of Epidemiology*; 16:79-86, 2000.

Collares-Pereira, M. Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. *Veterinary Record*, 128:549-550, 1991.

Everard, J.D., Everard, C.O.R. Leptospirosis in Caribbean. *Reviews in Medical Microbiology*, 4:114-122, 1993.

Everard, C.O.R., Cazabon, P.I., Dreesen, D.W., Sulzer, C.R. Leptospirosis in dogs and cats on the Island of Trinidad: West Indies. *International Journal of Zoonoses*, 6:33-40, 1979.

¹ <http://www.cdc.gov>

- Everard, C.O.R., Edwards, C.N., Everard, J.D., Carrington, D.G. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. *European Journal of Epidemiology*, 11:311-320, 1995.
- Everard, C.O.R., Fraser-Chanpong, G.M., Hayes, R.J., Bhagwandin, L.J., Butcher, L.V. A survey of leptospirosis in febrile patients mainly from hospitals and clinics in Trinidad. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76:487-492, 1982.
- Everard, C.O.R., Hayes, R.J., Edwards, C.N. Leptospiral infection in School-children from Trinidad and Barbados. *Epidemiology and Infection*, 103:143-156, 1989.
- Everard, C.O.R., Maude, G.H., Hayes, R.J. Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 84:255-266, 1990.
- Farrington, N.P., Sulzer, C.P. Canine Leptospirosis in Puerto Rico. *International Journal of Zoonoses*, 9: 45-50, 1982.
- Katz, A.R., Ansdell, V.E., Effler, P.V., Middleton, C.R., Sasaki, D.M. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory – confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1834-1841, 2001.
- Miller, D.A, Wilson, M.A., Beran, G.W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1761-1765, 1991.
- Miller, D.A, Wilson, M.A., Beran, G.W. Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1766-1768, 1991.
- Minette, H.P. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates - A review. *International Journal of Zoonoses*, 10: 111-121, 1983.
- Perrocheau, A., Perolat, P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year study. *European Journal of Epidemiology*, 13:161-167, 1997.
- Sasaki, D.M., Pang, L., Minette, H.P., Wakida, C.K., Fujimoto, W.J., Manea, S.J., Kunioka, R., Middleton, C.R. Active surveillance and Risk Factors for leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:35-43, 1993.
- Sehgal, S.C., Murhekar, M.V., Sugunan, A.P. A serosurvey for leptospirosis in North Andamans. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 12 (4): 289—291, 1994.
- Taylor, K.D., Turner, L.H., Everard, J.D. Leptospirosis in *rattus* spp on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94:102-103, 1991.
- van Til, L.D., Dohoo, I.R. A serological survey of leptospirosis in Prince Edward Island swine herds and its association with infertility. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55:352-355, 1991.
- Weekes, C.C., Everard, C.O.R., Levett, P.N. Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Veterinary Microbiology*, 57:2315-2322, 1997.
- Yersin, C., Bovet, P., Merien, F., Wong, T., Panowsky, J., Perolat, P. Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): A population-based study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:933-940, 1998.

ANEXO 5

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA LEPTOSPIROSIS

La leptospirosis en humanos puede mostrar una amplia variedad de síntomas y signos que incluyen:

- fiebre;
- dolor de cabeza severo;
- dolores musculares;
- inyección conjuntival;
- ictericia;
- malestar general;
- rigidez en la nuca;
- escalofríos;
- dolor abdominal;
- anorexia;
- náuseas;
- vómitos;
- diarrea;
- oliguria/anuria;
- hemorragias;
- erupciones en la piel;
- fotofobia;
- tos;
- arritmia cardíaca;
- hipotensión;
- confusión mental;
- psicosis;
- delirio.

No existe ningún cuadro clínico de la leptospirosis que sea característico de la enfermedad, por lo que siempre la sospecha clínica de la enfermedad debe ser confirmada mediante pruebas de laboratorio. Se deben consultar libros de texto para la descripción detallada de la presentación clínica.

Las siguientes enfermedades deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial de la leptospirosis:

- influenza;
- dengue y dengue hemorrágico;
- infecciones por hantavirus, incluyendo el síndrome pulmonar por hantavirus u otros síndromes de dificultad respiratoria
- fiebre amarilla y otras fiebres hemorrágicas de origen viral
- rickettsiosis
- borreliosis;
- malaria;
- piolonefritis;
- meningitis aséptica;
- envenenamiento por químicos
- envenenamiento por alimento;
- fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas
- hepatitis virales

- fiebre de origen desconocido (FOD);
- seroconversión primaria por VIH;
- enfermedad de los legionarios;
- toxoplasmosis;
- mononucleosis infecciosa;
- faringitis.

REFERENCIAS

Alexander, A.D., Benenson, A.S., Byrne, R.J., Díaz Rivera, R.S., Evans, L.B., Gochenour, W.S., Hall, H.E., Hightower, J.A., Jeffries, H., De Jesús, J., Martínez, E., Paniagua, M., Pons, J.A., Ramos-Morales, F., Rodríguez-Molina, R., Swisher, K.Y., Woodward, T.E., Yager, R.H. Leptospirosis in Puerto Rico. *Zoonoses Research*, 2:152-227, 1963.

Arean, V.M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *American Journal of Pathology*, 40:393-423, 1962.

Berman, S.J., Tsai, C.C., Holmes, K., Fresh, J.W., Watten, R.H. Sporadic anicteric leptospirosis in South Vietnam: a study of 150 patients. *Annals of Internal Medicine*, 79: 167-73, 1973.

Brethes, B., Puech, P.L., Fraisse, A., Dubois, P., Domenech, J., Bourdin, P., J.P. Moreau, J.P., Capdevielle, P., Dessouter, D., Lambert, M. Leptospirosis and environment. Study of 2 major foci in New Caledonia. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, 26(6): 436-442, 1998.

Chu, K.M., Rathinam, R., Namperumalsamy, P., Dean, D. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India. *Journal of Infectious Diseases*, 177:1314-1321, 1998.

De Brito, T., Morais, C.F., Yaasuda, P.H. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 81(3): 207-214, 1987.

Edwards, C.N., Nicholson, G.D., Everard, C.O.R. Thrombocytopenia in leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(4):827-829, 1982.

Edwards, C.N., Nicholson, G.D., Hassell, T.A., Everard, C.O.R., Callender, J. Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35:352-354, 1986.

Edwards, C.N., Nicholson, G.D., Hassell, T.A., Everard, C.O.R., Callender, J. Leptospirosis in Barbados: a clinical study. *West Indian medical Journal*, 39:27-34, 1990.

Faine, S. Leptospirosis. In: Hausler W. J. Jr Sussman M., eds. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, 9th ed. London, Arnold: Vol. 3: 849-869, 1998.

Farr, R.W. Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21: 1-8, 1995.

Feigin, R.D., D.C. Anderson, D.C. Human Leptospirosis. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 5:413-67, 1975.

Im, J.G., Yeon, K.M., Han, M.C., Kim, C.W., Webb, W.R., Lee, J.S., Han, Y.C., Chang, W.H., Chi, J.G. Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. *American Journal of Roentgenology*, 152:955-959, 1989.

- Johnson, W.D., Silva, I.C., Rocha, H. Serum creatinine phosphokinase in leptospirosis. *Journal of the American Medical Association*, 233:981-982, 1975.
- Katz, A.R., Ansdell, V.E., Effler, P.V., Middleton, C.R., Sasaki, D.M. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1834-1841, 2001.
- Kuriakose, M., Eapen, C.K., Punnoose, E., Koshi, G. Leptospirosis-clinical spectrum and correlation with 7 simple laboratory test for early diagnosis in the Third World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84:419-421, 1990.
- Lai, K.N., Aarons, I., Woodroffe, A.J., Clarkson, A.R. Renal lesions in leptospirosis. *Australians and New Zealand Journal of Medicine*, 12:276-279, 1982.
- Middleton, C.R., Ansdell, V.E., Sasaki, D.M. Of mice and mongooses. A history of leptospirosis research in Hawaii. *Hawaii medical Journal* 60:174,179 -181,184-186, 2001.
- Nicodemo, A.C., Del Negro, G., Amato Neto, V. Thrombocytopenia and leptospirosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32(4): 252-259, 1990.
- O'Neil, K.M., Rickman, L.S., Lazarus, A.A. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Reviews of Infectious Diseases* 13: 705-709, 1991.
- Parsons, M. Electrocardiographic changes in leptospirosis. *British Medical Journal*, 2:201-203, 1965.
- Perrocheau, A., Perolat, P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year study. *European Journal of Epidemiology*, 13(2): 161-167, 1997.
- Sehgal, S.C., Murhekar, M.V., Sugunan, A.P. Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in North Andaman. *Indian Journal of Medical Research*, 102:9-12, 1995.
- Shaked, Y., Spilberg, O., Samra, D., Samra, Y. Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clinical Infectious Diseases*, 17:241-243, 1993.
- Singh, S., Vijayachari, P., Sinha, A., Sugunan, A.P., Rasheed, M.A., Sehgal, S.C. Clinico-epidemiological study of severe cases of leptospirosis in Andamans. *Indian Journal of Medical Research*, 109:94-99, 1999.
- Soie, S., Hironaga, K., Koshiro, A., Konishi, H., Yoshii, Z. In vitro susceptibilities of five *Leptospira* strains to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24(6):905-908, 1983.
- Tappero, J., Ashorfd, D.A., Perkins, B.A. Leptospirosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practices of infectious diseases*, 5th ed. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone: 2495-2500, 2000.
- Trejejo, R.T., Rigau-Pérez, J.G., Ashford, D.A., McClure, E.M., Jarquin-Gonzalez, C., Amador, J.J., De los Reyes, J.O., Gonzalez, A., Zaki, S.R., Shieh, W.J., McLean, R.G., Nasci, R.S., Weyant, R.S., Bolin, C.A., Bragg, S.L., Perkins, B.A., Spiegel, R.A. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 178: 1457-1463, 1998.
- Watt, G., Padre, L.P., Tuazon, M.L., Calubaquib, C., Santiago, E., Ranoa, C.P., Laughlin, L.W. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*, 1(8583):433-435, 1998.
- Yersin, C., Bovet, P., Mérien, F., Wong, T., Panowsky, J., Perolat, P. Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population based study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(6):933-940, 1988.

Zaki, S.R, Spiegel, R.A. Leptospirosis. In: Nelson A.M. Horsburgh C.R. Jr, eds. Part IV, Factors contributing to emergence of infectious diseases. *Pathology of emerging infections* 2, 1st ed. Washington, DC, ASM Press: 73-92, 1998.

Zaki, Z.R., Shieh, W.J. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet*, 347:535-536, 1996.

ANEXO 6

MICROSCOPIA Y COLORACIÓN

A 6.1 MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO

Las leptospiiras son muy delgadas y se colorean muy pobremente con los colorantes habituales, como para ser observadas bajo un microscopio de campo claro convencional. En la microscopía de campo oscuro, una luz oblicua es emitida hacia las leptospiiras sobre el portaobjeto mediante el uso de un condensador especial, mientras la luz central es interrumpida (Figura A6.1) (Culling, 1963; Romeis, 1968). Las leptospiiras se destacan como hebras de plata sobre el fondo oscuro. Es esencial usar un microscopio de campo oscuro de buena calidad.

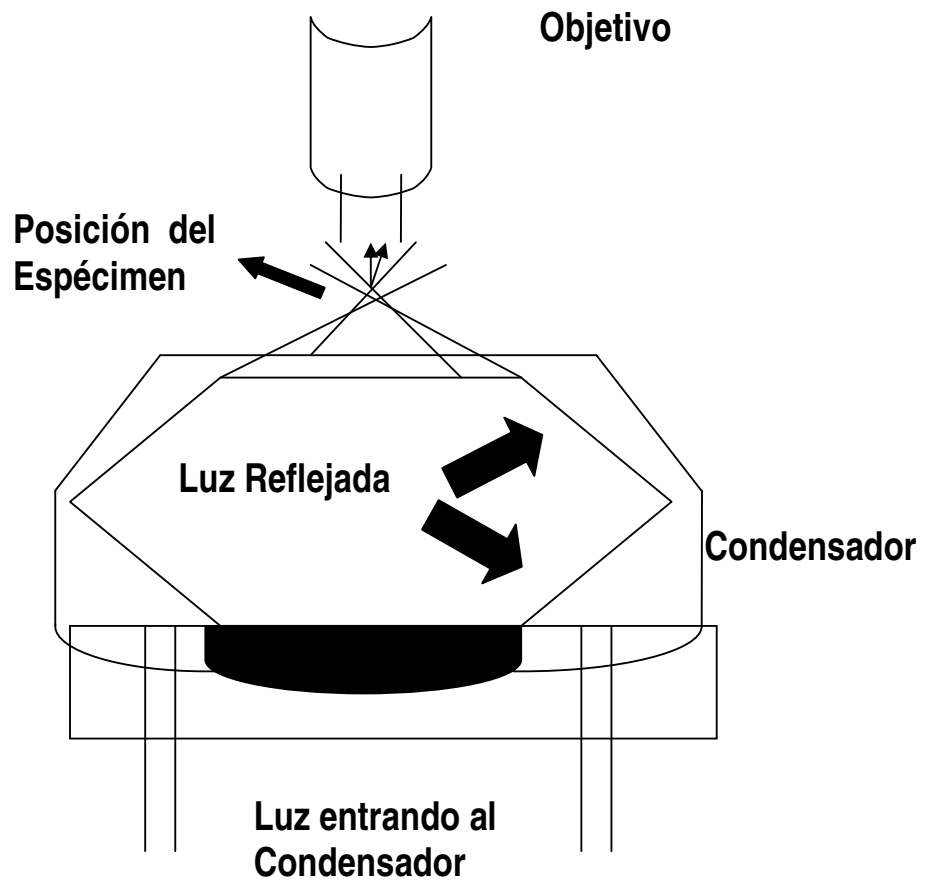


Figura A6.1 Principio de la microscopía de campo oscuro: solamente la luz reflejada hacia arriba y que “impacta” al microorganismo entrará al objetivo.

A 6.2 MICROSCOPIA DIRECTA EN CAMPO OSCURO COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO

Si bien esta técnica se describe en los libros de texto como un método útil para la demostración de las leptospiras en los fluidos, varias veces se ha mostrado de dudoso valor, aún en las manos de personal muy experimentado.

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. Por lo tanto, mucho cuidado y una gran experiencia son necesarios para evitar confundir artificios con leptospiras.

Las leptospiras pueden concentrarse por centrifugación diferencial, pero el porcentaje de observaciones positivas igual se mantiene bajo (Wolf, 1954).

No se recomienda la microscopía directa de la sangre como procedimiento de rutina.

Las leptospiras también se pueden visualizar por microscopía electrónica (Morton & Anderson, 1943).

A 6.3 MÉTODOS DE COLORACIÓN

Estos incluyen:

- Coloración de plata (Murray & Fielding, 1936; Gangadhar & Rajasekhar, 1998).
- Coloración por inmunofluorescencia directa usando anticuerpos monoclonales de conejo marcados con fluoresceína (Sheldon, 1953) o ratón (Stevens et al., 1985, Kaki & Shieh, 1996).
- Coloración con inmunoperoxidasa (Trypathy & Hanson, 1974).
- Hibridación *in situ* usando sondas de ADN (Terpstra et al., 1987).

REFERENCIAS

Culling, C.F.A. *Handbook of histopathological techniques* (including museum technique), 2nd ed., London, Butterworths, 1963.

Gangadhar, N.L., Rajasekhar, M. A modified silver impregnation staining for leptospire. *Indian Veterinary Journal*, 75:349-351, 1998.

Morton, H.E., Anderson, T.F. Morphology of *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* as revealed by electron microscope. *Journal of Bacteriology*, 45:143-146, 1943.

Murray, R.E, Fielding, J.W. Notes on the silver impregnation of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Medical Journal of Australia*, 1:610-611, 1936.

Romeis, B. *Mikroskopische technik*. München-Wien, R. Oldenbourg Verlag, 1968.

Sheldon, W.H. Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technique in human muscle lesions of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84:165-167, 1953.

Stevens, A.E., Headlam, S.A., Pritchard, D.G., Thorns, C.J., Morris, J.A. Monoclonal antibodies for diagnosis of infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo by immunofluorescence. *Veterinary Record*, 116:593-594, 1985.

Terpstra, W.J., Schoone, G.J., Ligthart, G.S, Schegget, J. ter Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labeled DNA probes. *Journal of General Microbiology*, 133:911-914, 1987.

Tripathy, D.N., Hanson, L.E. Immunoperoxidase staining of leptospire. *Applied Microbiology*, 133:911-914, 1974.

Wolff, J.W. *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1954.

Zaki, S.R., Shieh, W.J. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet*, 347:535-536, 1996.

ANEXO 7

LEPTOSPIRAS PATÓGENAS VERSUS SAPRÓFITAS

Los métodos comúnmente usados para diferenciar leptospiiras saprofitas y patógenas son:

- crecimiento en presencia de 8-azaguanina (225 mg/l) (Jonson & Rogers, 1964);
- crecimiento a 13° C (Jonson & Harris, 1967);
- conversión a formas esféricas en 1M NaCl (Jonson & Faine, 1984).

El crecimiento a 13° C en presencia de 8-azaguanine y la conversión a formas esféricas en 1M NaCl sugieren que las leptospiiras son saprofitas. La prueba de ELISA, donde solo los antígenos de las leptospiiras patógenas reaccionan con el anticuerpo monoclonal F9-4 (Cinco, 1990) puede ser también usada.

Algunas técnicas basadas en PCR han sido desarrolladas, las que distinguen entre *Leptospira* patógena y saprofita presentes en el agua (Murgia et al., 1997). La habilidad para distinguir entre leptospiiras patógenas y saprofitas en el ambiente puede ser de gran valor para propósitos epidemiológicos y de salud pública.

REFERENCIAS

Cinco, M. Evaluation of monoclonal antibody f9-4 as immunological probe for *Leptospira interrogans*. *Journal of clinical microbiology*, 28:2154-2155, 1990.

Johnson, R.C., Faine, S. Order I. Spirochaetales: family II. "Leptospiraceae" Hovind-Hougen 1979. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1st ed. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, Vol 1, 245:62, 1984.

Johnson, R.C., Harris, V.G. Antileptospiral activity of serum. II. Leptospiral virulence factor. *Journal of Bacteriology*, 93:513-519, 1967.

Johnson, R.C., Rogers, P. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology*, 88:1618-1623, 1964.

Murgia, R., Riquelme, N., Baranton, G., Cinco, M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiology Letters*, 148:27-34, 1997.

ANEXO 8

SEROTIPIFICACIÓN Y PREPARACIÓN DE ANTISUERO DE CONEJO

A 8.1 AGLUTINACIÓN – ABSORCIÓN CRUZADA

Reacciones antígeno-anticuerpo, como en la MAT, son utilizadas para identificar cepas. La estructura antigénica de las leptospiiras es compleja, la unidad sistemática básica, es el serovar, el cuál está representado por una cepa de referencia (Kmety & Dikken, 1993).

Los serogrupos están integrados por serovares que presentan aglutinación cruzada con títulos que van de moderados a altos (Dikken & Kmety, 1978). Los serogrupos no pueden ser definidos con precisión y no tienen un estatus taxonómico oficial pero cumplen con el propósito práctico de agrupar cepas sobre la base de su semejanza antigénica.

La seroagrupación es necesaria debido a la existencia de más de 200 cepas de referencia que, por razones prácticas, no pueden ser usadas o evaluadas individualmente en experimentos de serotipificación. Debido a que no existe una definición exacta de serogrupo y a que las diferencias entre ellos son muchas veces borrosas, en el pasado, algunos serovares han sido movidos de un serogrupo a otro.

La definición original de serovar formulada por Wolf & Broom (1954), y un grupo de expertos de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1967) fue pensada no solamente con propósitos taxonómicos sino también como una forma práctica de diferenciar leptospiiras sobre la base de la relación huésped - parásito. Bajo la definición actual, se considera que dos cepas pertenecen a diferentes serovares si, después de una absorción – cruzada con cantidades adecuadas de un antígeno heterólogo, más del 10% del título homólogo se mantiene puntualmente en al menos uno de los dos antisueños en pruebas repetidas (Comité Internacional en Bacteriología Sistemática, 1987). Si un serovar desconocido es diferente de todos los serovares conocidos (representados en las cepas de referencia), de acuerdo al criterio dado en la definición anterior se estima que es un nuevo serovar. Si no existe un título homólogo o persiste menos del 10%, la cepa desconocida pertenece al serovar en cuestión. Es así que una cepa desconocida puede o pertenecer a una serovar conocido representado por una cepa de referencia, o ser un nuevo serovar y convertirse en la cepa de referencia para este nuevo serovar. Este criterio de “10% de límite” es crítico. Esta regla permite un margen de diferencia de 0 - 10% para cepas pertenecientes al mismo serovar. (Faine, 1982).

El método convencional de serotipificación de cepas desconocidas involucra los dos procedimientos descritos a continuación.

A 8.1.1 Determinación del serogrupo

Una suspensión de antígeno de una cepa desconocida es usada en titulaciones empleando la MAT, con un rango de antisuero de conejo que represente todos los serogrupos reconocidos para determinar el estatus de serogrupo de la cepa desconocida. Este procedimiento también permite investigar la relación entre la cepa desconocida y otras cepas de referencia dentro del mismo serogrupo. Un serovar desconocido puede ser aglutinado por uno o más antisueños.

A 8.1.2 Prueba de aglutinación - absorción cruzada

El segundo procedimiento es más complicado e involucra comparar las reacciones de aglutinación absorción cruzada observadas en la MAT entre la cepa desconocida y su antisuero con las cepas de referencia y sus antisueros, que fueron positivas en las pruebas para la determinación de serogrupo (Babudieri, 1971; Kmety et al., 1970). La prueba se ejecuta de acuerdo con los métodos estándares descritos por el subcomité Taxonómico de la *Leptospira* (Comité internacional en Bacteriología Sistemática, 1984).

A 8.2 OTROS MÉTODOS DE SEROTIFICACIÓN

La prueba de aglutinación - absorción cruzada es laboriosa y requiere mucho tiempo, lo que restringe su uso para la identificación de cepas a laboratorios especializados. Por esta razón, los laboratorios de referencia se han esforzado en investigar un método rápido para serotipificar cepas de *Leptospira*. Actualmente, esto se alcanza por medio del análisis de factor usando antisuero de conejo (Kmety 1967; Dikken & Kmety, 1978) y la identificación de los aislamientos usando anticuerpos monoclonales (Collares-Pereira et al., 2000; Sehgal et al., 2000; Terpstra et al., 1985, 1987).

A 8.3 ANALISIS DE SUERO FACTOR

La definición oficial no caracteriza cada serovar con precisión, pero define el grado de diferencia serológica necesario para que una cepa represente un nuevo serovar. El análisis de suero factor de Kmety (Kmety, 1967) involucra un estudio más detallado de la estructura antigénica de cada serovar el que es caracterizado por su propia combinación particular, o el mosaico de factores antigénicos mayores y menores. Los sueros factor, son preparados mediante absorción de un antisuero de conejo con uno o más suspensiones de antígenos diferentes hasta que reaccionan solamente con un serovar, un subgrupo o serogrupo.

El análisis de suero factor es un método altamente refinado para el estudio de los grados de semejanza antigénica entre cepas (Kmety, 1967) y permite la determinación rápida y provisional de pertenencia al serovar de la cepa en cuestión (Dikken & Kmety, 1978).

La preparación de suero factor es laboriosa y la repetibilidad es limitada a causa de variaciones de entre los lotes. No obstante, el suero factor es útil para una tipificación presuntiva rápida.

A 8.4 ANTICUERPOS MONOCLONALES

La caracterización usando anticuerpos monoclonales (AcMs) está relacionada con la tipificación convencional y se basa en el reconocimiento de patrones antigénicos característicos de los serovares por los paneles de AcMs. A diferencia de la prueba de aglutinación - absorción cruzada, un gran número de cepas pueden ser tipificadas en un período de tiempo corto usando AcMs.

Los AcMs reaccionan en la prueba de aglutinación microscópica (MAT) con una sola característica antigénica (epítipo). Un epítipo puede ser específico para un determinado serovar o ser compartido por varios serovares. Sobre la base de combinaciones o mosaicos de epítopos característicos de ciertos serovares, se han confeccionado paneles de AcMs para permitir la identificación de las leptospirosis a nivel de serovar y, en ocasiones, de subserovar. La obtención de diferencias en los perfiles de aglutinación con el uso de un panel de AcMs puede indicar la presencia de un nuevo serovar. Aún, es posible observar diferencias entre cepas pertenecientes a un mismo serovar. (Collares Pereira et al. 2000; Sehgal et al., 2000; Terpstra et al., 1985).

El uso de AcMs permite a laboratorios no especializados tipificar leptospirosis rápida y fácilmente, cuando estos laboratorios disponen de paneles de AcMs relevantes a las cepas que circulan localmente.

Cerca de la mitad de los serovares más comunes, reconocidos actualmente, pueden ser tipificados con anticuerpos monoclonales (*Anexo 15*).

El uso de anticuerpos monoclonales también permite una revisión rápida de la identidad de las cepas de leptospiras que usadas como antígenos en la MAT para el serodiagnóstico. Cepas identificadas erróneamente pueden ser nuevamente tipificadas e identificadas con precisión y más fácilmente que con el uso convencional del antisuero de conejo.

La composición de los paneles de AcMs es parcialmente subjetiva debido a que muchos anticuerpos monoclonales son preparados durante procedimientos estándares, pero solamente unos pocos son seleccionados para uso práctico. Esto plantea una limitación en su aplicabilidad.

La especificidad de los AcMs es limitada, entre otros factores, por la estructura antigénica de la cepa inmunizante y el repertorio inmunológico del ratón (Terpstra, 1991).

A 8.5 PREPARACIÓN DEL ANTISUERO DE CONEJO

Concisamente, conejos con un peso entre 3 - 4 Kg. son inyectados por vía intravenosa a intervalos semanales con leptospiras vivas tratadas con formalina. El Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* ha estandarizado el procedimiento (Comité Internacional de Sistemática en Bacteriología, 1984). Las leptospiras deben crecer a una densidad de 2×10^8 por ml. Las dosis inyectadas semanalmente son respectivamente 1, 2, 4, y 6ml. Una semana después de la última inyección el título en la MAT de ser de al menos 1:12 800. Si no fuera así, se puede dar otra inyección de 6 ml y el título ser determinado 1 semana después. El conejo es sangrado por punción cardíaca dos semanas después de la última inyección. Se usan dos conejos. Los sueros pueden reunirse cuando los títulos sean satisfactorios.

REFERENCIAS

Babudieri, B. Proposed standardization of the agglutination-adsorption test for *Leptospira*. *Bulletin of the World Health organization*, 44:795-810, 1971.

Collares-Pereira, M., Korver, H., Cao Thi, B.V., Santos-Reis, M., Bellenger, E., Baranton, G., Terpstra, W.J., Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiology Letters*, 185:181-187, 2000.

Dikken, H., Kmety, E. Serological typing methods of leptospirosis. In: Bergan T., Norris J.R. eds. *Methods in Microbiology*. New York, Academic Press, Vol. 11:260-295, 1978.

Faine, S. *Guidelines for the Control of Leptospirosis*. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No. 67), 1982.

International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira* (1984). Minutes of the meeting, 6 to 10 August, 1982, Boston, Massachusetts, USA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34:258-259.

International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira* (1987). Minutes of the meeting, 5 to 6 September, 1982, Boston, Massachusetts, USA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37:472-473.

Kmety, E., Dikken, H. Faxtorenanalyse von Leptospiren der icterohaemorrhagie und einiger verwandter serogruppen. Bratislava, *Slovak Academy of Sciences*: 214, 1993.

Kmety, E., Dikken, H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen, University Press: 104, 1993.

Kmety, E., Galton, M.M., Sulzer, C.R. Further standardization of the agglutinin absorption test in the serology of leptospirosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 42: 733-738, 1970.

Sehgal, S.C., Vijayachari, P., Smythe, L.D., Norris, M., Symonds, M., Dohnt, M., Korver, H., van de Kemp, H., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J. Lai-like *Leptospira* from the Andaman Islands. *Indian Journal of Medical Research*, 112:135-139, 2000.

Terpstra, W.J. Typing of *Leptospira* from the perspective of a reference laboratory. *Acta Leidensa*, 60: 79-87, 1991.

Terpstra, W.J., Korver, H., van Leeuwen, J., Klatser, P.R., Kolk, A.H.J. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A259:498-506, 1985.

Terpstra, W.J., Korver, H., Schoone, G.J., van Leeuwen, J., Schönemann, C.E., de Jonge- Aglibut, S., Kolk, A.H.J. Comparative classification of *Leptospira* serovar of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction endonuclease analysis. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A266:412-421, 1987.

World Health Organization. *Current problems in leptospirosis Research*. Report of a WHO Expert Group. Geneva (WHO Technical report Series, No. 380):8, 1967.

Wolff, J.W., Broom, B.R. The genus *Leptospira noguchi*, 1917: problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. *Documenta de Medicina Geographica et Tropica*, 6:78-95, 1954.

ANEXO 9

CLASIFICACIÓN BASADA EN EL ADN

Las leptospirosis pertenecen al género *Leptospira*, familia Leptospiraceae, orden Spirochaetales. El género *Leptospira* está compuesto por un grupo de leptospirosis patógenas, *L. interrogans sensu lato* y leptospirosis no-patógenas, *L. biflexa sensu lato*. Actualmente, la determinación de especies está basada en la homología del ADN. Las especies patógenas actualmente reconocidas (ver *Tabla 9.1*) incluyen *L. interrogans sensu stricto* mientras que las especies no-patógenas incluyen *L. biflexa sensu stricto*.

En los últimos años, una variedad de métodos de análisis genético han comenzado a estar disponibles. Sin embargo, la clasificación genética difiere de la clasificación serológica. Las secuencias de ADN de genes son un blanco atractivo para estudios filogenéticos. La secuencia del gen *rrs*, que codifica para el rARN 16S, es la más comúnmente usada y aceptada para estudios de relaciones genéticas (Perolat et al., 1998).

Un sistema de clasificación basado en rasgos genéticos debería, idealmente, permitir la caracterización de subespecies. Los métodos de tipificación deben ser simples y brindar resultados confiables si pretenden atender las necesidades de la práctica clínica y epidemiológica.

Varios métodos son descritos aquí. Al final de este Anexo se dan las referencias de los protocolos prácticos para quien desee consultarlos.

A 9.1 LEPTOSPIRA spp BASADA EN LA HOMOLOGÍA DEL ADN

El uso de la hibridación cuantitativa de ADN-ADN para medir las relaciones entre el ADN de las cepas de leptospirosis es el método de referencia para clasificar las cepas en especies. Actualmente, cerca de 300 cepas han sido clasificadas sobre las bases de la homología del ADN. (Brenner et al., 1999; Faine et al., 1999; Ramadas et al., 1990, 1992; Yasuda et al., 1987).

En la *Tabla A9.1* se listan las especies en base al análisis genético, junto con los serogrupos más comúnmente presentes en estas especies.

Tabla 9.1 Especies y serogrupos más comúnmente presentes en ellas (Brenner et al, 1999)

Especie	Principales serogrupos presentes
<i>L. alexanderi</i> (genomoespecies 2)	Hebdomadis, Manhao
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum, Javanica, Sejroe, Tarassovi
<i>L. interrogans sensu stricto</i>	Australis, Autumnalis, Canícola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Sejroe
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae
<i>L. noguchii</i>	Australis, Icterohaemorrhagiae
<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis, Mini, Pyrogenes, Sejroe
<i>L. weilli</i>	Celledoni, Javanica, Tarassovi
<i>L. fainei</i> ^a	Hurstbridge
<i>L. inadai</i> ^a	Lyme, Manhao
<i>L. meyeri</i> ^a	Javanica, Mini, Sejroe
<i>L. biflexa sensu stricto</i> ^b	Andamana
<i>L. wolbachii</i> ^b	Codice, Semaranga
<i>Tumeria parva</i> (antes <i>L. parva</i>)	Turneri
<i>Leptonema illini</i>	"Leptonema"

Genomoespecie 1 ^a	Serogrupo saprofita Ranarum
Genomoespecie 3 ^b	Serogrupo tentativamente saprofita Holland
Genomoespecie 4 ^b	Icterohemorrhagiae
Genomoespecie 5 ^b	Serogrupo saprofita Ranarum
^a El estatus de patógeno no está claro;	^b Saprofitas/Otro género

Los métodos de homología del ADN tienen la desventaja de ser muy complicados para ser usados de forma rutinaria. Sin embargo, se han desarrollado un número de técnicas de “*fingerprint*” de ADN (ver abajo) que son más fáciles de implementar y; la mayoría de ellos, además, son capaces de discriminar a nivel de subespecie.

A 9.2 Polimorfismo de tamaño de fragmentos de restricción

En esta aproximación (que también incluye un número de técnicas tales como el análisis de enzimas de restricción (AER) y electroforesis en gel de campo pulsado (ECP, ver abajo)), las enzimas de restricción son usadas para cortar el ADN de las leptospiros en fragmentos (llamado Polimorfismo de restricción por tamaño de fragmento RFLPs), que pueden ser característicos a nivel de cepa. Estos fragmentos son separados por electroforesis en gel de agarosa, formando patrones de bandas características (Ellis et al., 1991). Se pueden entonces establecer las relaciones entre las cepas bacterianas comparando los patrones de cepas desconocidas con aquellos de cepas conocidas (referencia). Con los RFLPs se alcanzan altos grados de resolución, muchas veces superando los de los métodos serológicos y pueden revelar pequeñas diferencias entre cepas de leptospiros.

A 9.3 ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO

En la electroforesis de campo pulsado (ECP), enzimas de restricción, tales como *NotI*, se usan para diferenciar entre *Leptospira* spp y muchas veces también entre cepas. Tales enzimas cortan el ADN en fragmentos largos los que son separados electroforéticamente en geles de agarosa, dando patrones característicos. Este método ofrece la ventaja de poder interpretarse de una manera simple ya que están presentes sólo bandas grandes y por lo tanto pocas (Hermann et al., 1992).

A 9.4 RIBOTIPIFICACIÓN

El RFLP puede ser combinado con el procedimiento de “*southern blot*” en el cuál se usan sondas específicas.

Por ejemplo, en la ribotipificación, los fragmentos resultantes de las enzimas de restricción son separados por electroforesis en geles de agarosa, luego transferidos a una membrana y a seguir hibridizados con sondas de 16S- y/o 23S marcadas, resultando en “*fingerprint*” más simples y fáciles de interpretar (Perolat et al., 1993). Debido a que los reactivos que se usan en este método son los que están disponibles comercialmente, el método puede ser realizado en laboratorios de diagnóstico y no requiere del mantenimiento de todas las cepas de referencia y los correspondientes sueros inmunes de conejo.

La ribotipificación también provee información sobre las relaciones genómicas, basadas en la similitud de fragmentos comunes encontrados en las cepas de leptospiros.

Mayor información puede obtenerse en el sitio Web:

<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptopira.html>

A9. TIPIFICACIÓN BASADA EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) provee una base novedosa para la tipificación de las leptospirosis. Los métodos siguientes pueden ser usados:

1. Uso de cebadores deducidos de secuencias de especies o cepas (Gravekamp et al., 1993; Murgía et al., 1997).
2. Determinación de secuencias de productos de PCR (Gravekamp et al., 1993)
3. Aplicación de técnicas de RFLP a productos de PCR (Perolat et al., 1994; Woodward & Redstone, 1993).
4. Uso de cebadores sobre secuencias que tienen posiciones características de cepa en el genoma, p.ej. elementos de inserción tales como IS1500, y por lo tanto generar patrones característicos de cepa en geles de agarosa (Zuerner et al., 1995; Zuerner & Bolin, 1997).
5. Análisis del polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) (Wu et al., 1996).
6. Cebadores de secuencia arbitraria por PCR (AP-PCR), amplificación al azar de ADN polimórfico, o PCR de bajo rigor (LS-PCR) (Brown & Levett, 1997; de Caballero et al., 1994; Perolat et al., 1994).

Los métodos 1 al 5 tienen la ventaja de que, al menos en teoría, son aplicables a muestras clínicas sin necesidad del aislamiento o cultivo.

Las técnicas, tales como las basadas en RFLP, requieren del aislamiento de las leptospirosis. Una desventaja adicional es que los perfiles generados dependen de la calidad del ADN aislado. Por tanto, éstas técnicas son difíciles de estandarizar.

REFERENCIAS

- Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C., Weyant, R.S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International journal of Systematic Bacteriology*, 49:839-858, 1999.
- Brown, P.D., Levett, P.N. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 46:173-181, 1997.
- De Caballero, O.L.S.D., Dias Neto, E., Koury, M.C., Romanha, A.J., Simpsons, A.J.G. Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars. *Journal of Clinical microbiology*, 32:1369-1372, 1994.
- Ellis, W.A., Montgomery, J.M., Thierman, A.B. Restriction endonuclease analyses as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29:957-961, 1991.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira and leptospirosis*, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia, 1999.
- Gravekamp, C., van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G.L., van Eys, G.J.J.M., Everard, C.O.R., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139:1691-1700, 1993.
- Herrmann, J.L., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I. Pulsed-field gel electrophoresis of Not digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:1696-1702, 1992.

- Murgia, R., Riquelme, N., Baranton, G., Cinco, M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. *FEMS Microbiology Letters*, 148:27-34, 1997.
- Perolat, P., Lecuyer, I., Postic, D., Baranton, G. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignment. *Research in Microbiology*, 144:5-15, 1993.
- Perolat, P., Merien, F., Ellis, W.A., Baranton, G. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:1949-1957, 1994.
- Perolat, P., Chappel, R.J., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D.M., Billingham, M.L., Letocart, M., Merien, F., Serrano, M.S. *Leptospira fainei* sp. Nov. isolated from pigs in Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:851-858, 1998.
- Ramadass, P., Jarvis, B.D., Corner, R.J., Cinco, M., Marshall, R.B. DNA-relatedness among strains of *Leptospira biflexa*. *International journal of Systematic Bacteriology*, 40:231-235, 1990.
- Ramadass, P., Jarvis, B.D., Corner, R.J., Penny, D., Marshall, R.B. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40:231-235, 1992.
- Woodward, M.J., Redstone, J.S. Differentiation of *Leptospira* serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Record*, 132:325-326, 1993.
- Wu, W., Bao, L., Wu, Q., Li, S., Huang, W., Wan, B., Zhang, M., Xiong, Q., Fang, Z. 16S rRNA gene PCR-SSCP analysis of the reference strains from 15 serovars (14 serogroups) of pathogenic leptospires in China. *Hua His I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao*, 27:17-20, 1996.
- Yasuda, P.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, K.P., Kaufmann, A.F., Rogers, F., Brenner, D.J. Deoxyribonucleic acids relatedness between serogroups and serovars in the family leptospiraceae with proposal for seven new *Leptospira* Species. *International journal of Systematic Bacteriology*, 37:407-415, 1987.
- Zuerner, R.L., Alt, D., Bolin, C.A. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:3284-3289, 1995.
- Zuerner, R.L., Bolin, C.A. Differentiation of *Leptospira Interrogans* by IS1500 hybridization and PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2612-2617, 1997.

ANEXO 10

TÉCNICAS SEROLÓGICAS (MAT Y ELISA)

A 10.1 INTRODUCCIÓN

Un gran número de técnicas serológicas son usadas para el diagnóstico de la leptospirosis, cada una con su sensibilidad y especificidad propias (Postic et al., 2000). Frecuentemente es necesario usar varias técnicas, ya sea al mismo tiempo o sucesivamente, para alcanzar un diagnóstico confiable. El inmunoensayo enzimático o enzoinmunoanálisis (ELISA) y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) son los métodos de laboratorio más comúnmente utilizados; sin embargo, la MAT, desarrollada por Martin & Petit (1918), sigue siendo el método de referencia y se describe en detalle a continuación.

La interpretación de los datos serológicos siempre se basa en el examen de muestras colectadas secuencialmente, p.ej. dos muestras obtenidas dentro de un período de tiempo mínimo de varios días después de la aparición de los síntomas, p.ej. 8 - 10 días. Una tercera muestra de suero podría ser necesaria para confirmar el diagnóstico clínico y el serogrupo infectante.

A 10.2 PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA

La MAT se basa en la antigua prueba de lisis aglutinación desarrollada por Martín & Petit (1918) y modificada posteriormente (Borg-Petersen & Fargroeu, 1949; Carbrey, 1960; Cole et al., 1973; Postic et al., 2000, Schüffner & Mohtar, 1926; Watt et al., 1988; Wolf, 1954). La noción de lisis después abandonada por considerarse una mala interpretación. La MAT permanece como prueba de referencia y es usada para detectar anticuerpos y determinar su título. Esta prueba puede ofrecer una indicación del serogrupo al cuál pertenece el serovar infectante, pero raramente lo identifica. La MAT detecta tanto los anticuerpos tipo IgM como IgG. La prueba no puede ser estandarizada ya que utiliza antígenos vivos y factores como la edad y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación (Borg-Petersen & Fargroeu, 1949; Carbrey, 1960).

A 10.2.1 Principio

El método es simple y consiste en mezclar el suero a estudiar con leptospiros cultivadas y para luego evaluar el grado de aglutinación usando un microscopio de campo oscuro (Ver figura A10.1). 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 (Comité Internacional sobre Bacteriología Sistemática, 1984)

A 10.2.2 Materiales y reactivos

Se usan placas plásticas para microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. No se requiere un tipo particular de placa si los resultados se leen después de transferir una pequeña gota del contenido con un asa metálica a un portaobjetos de vidrio. Sin embargo, si se va a observar la placa directamente bajo un microscopio invertido de campo oscuro, se necesita de una placa plástica de buena calidad óptica.

Se requiere lo siguiente:

- Solución fisiológica tamponada, pH 7.6; que consiste de 0.85% de solución de NaCl (1840ml) y el tampón Sörensen (ver abajo) 160 ml.
- Tampón Sörensen. Contiene Na₂HPO₄, 12 H₂O (8.33g) y KH₂PO₄ (1.09g) llevado a un volumen final de 1 litro de agua. Esta solución se esteriliza a 110 °C por 20 minutos y se guarda a 4°C.
- Cepas de *Leptospira*. Se selecciona una batería de cepas; esta batería puede estar compuesta por cepas representativas de todos los principales serogrupos o puede basarse en: (i) la frecuencia conocida de ciertos serovares en la localidad afectada y (ii) la probabilidad de que ellos estén presentes, como lo muestran los datos epidemiológicos anteriormente obtenidos.

Una lista de los serovares recomendados para ser incluidos en la batería de antígenos de referencia, usados para identificar una infección por un serovar desconocido por medio de la MAT, se muestra en la Tabla 10.1.

Tabla A 10.1 Serovares recomendados

Serogrupos	Serovares	Cepa
Australis	australis	Ballico
Autumnalis	autumnalis	Akiyami A
Ballum	castellonis	Castellón 3
Bataviae	bataviae	Swart
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
	copenhageni	M20
Javanica	javanica	Veldrat batavia 46
Panama	panama	CZ 214
Pomona	pomona	Pomona
Pyrogenes	ppyrogenes	Salinem
Sejroe	hardjo	Hardjoprajitno
	sejroe	M 84
	wolffi	3705
Tarassovi	tarassovi	Perepeletsin
Semarang	patoc	Patoc 1

Las cepas aisladas localmente, que frecuentemente incrementan la sensibilidad de la prueba comparada con las cepas de referencia, también pueden ser incluidas en la batería de antígenos. Sin embargo, el rango de serovares no debería limitarse a cepas locales pues puede ser el caso de que la infección sea debida a serovares raros o quizás a una cepa que aún desconocida en la región afectada. Por esta razón también, debe incluirse una cepa saprofita (*L. biflexa* cepa Patoc I), la cual reacciona con anticuerpos humanos generados por un número de serovares patógenos. También será necesario agregar otros serovares representantes de otros serogrupos no incluidos en la batería.

El uso de cepas bien caracterizadas es esencial para realizar la prueba de referencia correctamente. Deben realizarse regularmente las pruebas control, en las cuales la actividad de la cepa se determina en relación con el antisero específico de referencia o anticuerpos monoclonales, para verificar que no se ha fallado en la identificación de la cepa o que ha ocurrido una mezcla de antígenos.

La MAT se realiza como se describe a continuación.

- Las cepas se subcultivan en medio EMJH (ver anexo 16, A16.4, p. 111) 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 (Turner, 1968; Sulzer & Jones, 1978; Palmer et al., 1987). Los antígenos muertos tienen la ventaja de ser más seguros de manipular y puede ser guardados por unas pocas semanas antes de que ocurra una pérdida significativa de la actividad (ver estandarización de la MAT, p. 22).

A 10.2.3 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 50 µl 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" (ver Figura A10.2).
- 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 50 µl 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.
- Cada suero que da una aglutinación de al menos 50% de las leptospiras (comparadas con el antígeno control) es considerado positivo.

	Antígeno 1 (Ag1)	Antígeno 2 (Ag2)	Antígeno 3 (Ag3)	Antígeno n (Ag n)
Antígeno Control	Tampón +Ag1	Tampón +Ag2	Tampón +Ag3	Tampón +Ag n
Suero 1	Suero 1 +Ag1	Suero 1 + Ag2	Suero 1 + Ag3	Suero 1 + Ag n
Suero 2	Suero 2 +Ag1	Suero 2 +Ag2	Suero 2 +Ag3	Suero 2 +Ag n
Suero 3	Suero 3 + Ag1	Suero 3 +Ag2	Suero 3 +Ag3	Suero 3 +Ag n
Suero 4	Suero 4 +Ag1	Suero 4 + Ag2	Suero 4 +Ag3	Suero 4 +Ag n
Suero X	Suero x +Ag1	Suero x +Ag2	Suero x +Ag3	Suero x + Ag n

Figura A 10.2 Diagrama de una placa de microtitulación usada en el tamizado para determinar el(los) serogrupo(s) responsable(s).

Las leptospiras aglutinadas forman grumos, los que son más o menos densos y en los cuales los movimientos de los extremos libres de las leptospiras son visibles.

En la práctica, sin embargo, es más fácil evaluar el número de leptospiras libres en relación al control, como sigue:

- si la proporción de las leptospiras libres está entre el 50% y 100%, la reacción es negativa;
- si la proporción de las leptospiras libres es menos que el 50% entonces la reacción es positiva.

MAT Cuantitativa

La MAT cuantitativa se lleva a cabo, haciendo diluciones seriadas al doble (2X) del suero para determinar el título de anticuerpos para cada uno de los antígenos positivos (ver Figura A10.3).

	Antígeno Control	Dilución 1/50	Dilución 1/100	Dilución 1/200	Dilución 1/400	Dilución 1/n	
Suero 1	Tampón +Ag1	Suero 1 1/25+Ag1	Suero 1 1/50+Ag1	Suero 1 1/100+Ag1	Suero 1 1/200 Ag1	etc.	Ag 1
Suero 1	Tampón +Ag2	Suero 1 1/25+Ag2	Suero 1 1/50+Ag2	Suero 1 1/100+Ag2	Suero 1 1/200 Ag2	etc.	Ag 2
Suero 1	Tampón +Ag3	Suero 1 1/25+Ag3	Suero 1 1/50+Ag3	Suero 1 1/100+Ag3	Suero 1 1/200 Ag3	etc.	Ag 3
Suero 1	Tampón +Agx	Suero 1 1/25+Agx	Suero 1 1/50+Agx	Suero 1 1/100+Agx	Suero 1 1/200 Agx	etc.	Ag x
Suero 2	Tampón +Ag1	Suero 1 1/25+Ag1	Suero 1 1/50+Ag1	Suero 1 1/100+Ag1	Suero 1 1/200 Ag1	etc.	Ag 1
Suero 2	Tampón +Ag2	Suero 1 1/25+Ag2	Suero 1 1/50+Ag2	Suero 1 1/100+Ag2	Suero 1 1/200 Ag2	etc.	Ag 2
Suero 2	Tampón +Agy	Suero 1 1/25+Agy	Suero 1 1/50+Agy	Suero 1 1/100+Agy	Suero 1 1/200 Agy	etc.	Ag y

Figura A 10.3 Diagrama de la placa de microtitulación usada para determinar el título del suero para cada antígeno probado.

Interpretación

La MAT es usualmente positiva de 10 a 12 días después de la aparición de los primeros síntomas y signos clínicos, pero la seroconversión puede ocurrir, tan pronto como 5-7 días después de la aparición de la enfermedad. La respuesta de anticuerpos puede ser retardada si se comienza la terapia con antibióticos antes de realizarse la prueba.

El umbral positivo o valor de corte de la reacción es fijado en 1/100 por parte de muchos laboratorios. Sin embargo, el título de anticuerpos debe ser interpretada a la luz de:

- la fecha de obtención de la muestra en relación con los primeros signos clínicos;
- la evolución de los títulos de anticuerpos entre las dos o tres muestras sucesivas;
- el serogrupo causal;
- el tratamiento dado.

Frecuentemente, se presentan co-aglutinaciones (reacciones cruzadas) en los sueros de pacientes con leptospirosis (Borg-Petersen, 1949; Kmety, 1957). Los anticuerpos que causan reacciones cruzadas, son los primeros que normalmente aparecen pero desaparecen rápidamente. Los anticuerpos homólogos, si bien aparecen un poco después, persisten por más tiempo, permitiendo la identificación presuntiva del serogrupo responsable de la infección y también la detección de rastros indicando infecciones previas.

A 10.3 ELISA

A 10.3.1 Principios de la técnica

Esta es una prueba serológica que se usa comúnmente de varias maneras dependiendo del tipo de antígeno y los reactivos empleados durante el curso de la prueba (Adler et al., 1980; Postic et al., 2000; Terpstra et al., 1985; Watt et al., 1988; Zochowski et al., 1987).

Aquí se realizará solamente un esbozo de los principios generales. La prueba sólo detecta anticuerpos género específicos y no es apropiada para la identificación del serogrupo o serovar. Los anticuerpos en los sueros a estudiar son puestos en contacto con un antígeno que está fijado en un soporte sólido como una placa de microtitulación. Luego de un período de incubación y de numerosos lavados para eliminar excesos de anticuerpos, se añade un anticuerpo antiespecie (a la cuál pertenece el suero probado) conjugado con una enzima. La actividad enzimática es entonces determinada por el agregado de un sustrato cromogénico. La intensidad de la reacción de color, que está relacionada con la cantidad de sustrato degradado, es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero analizado (dentro de un cierto rango de concentración de acuerdo con las reglas de Beer-Lambert).

A 10.3.2 Materiales y reactivos

Se requieren los siguientes materiales:

- Microplacas o tiras para la prueba de ELISA. Solamente deben usarse microplacas plásticas específicas para ELISA de 96 pocillos planos o gradillas de 8 x 12 pocillos planos. De lo contrario puede producirse una fijación heterogénea y no reproducible del antígeno o variaciones significativas entre pocillos. Es aconsejable probar cada nuevo lote de placas debido a que la calidad del plástico puede variar. Al momento, las placas de microtitulación para ELISA M 129 A (Dynatech) e Immulon A dan mejores resultados.
- Tampón fosfato salino (PBS). Este es preparado como sigue: NaCl (80 g), Na_2HPO_4 , 12 H_2O (11.33 g), KH_2PO_4 (2 g) y agua destilada a un volumen final de 1 litro. Debe ser esterilizado a 120 °C por 20 minutos y diluido 1/10 antes de usarse.
- Solución PBS-leche. Esta solución se prepara agregando 5% (p/v) de leche en polvo descremada al tampón de lavado-PBS. Se puede agregar también mertiolate a una concentración final de 0,2%, para evitar contaminación (1 ml de una solución stock al 20% en 1 litro de solución PBS-leche). Sin embargo, es mejor preparar una solución fresca de PBS-leche justo antes de usarse.
- Conjugado. Un número variado de compañías suministran anticuerpos IgM antihumanos unidos con peroxidasa. Son diluidos 1/500 o, de acuerdo con el resultado de la titulación con bloqueo en PBS-leche antes de su uso.
- Componentes del sustrato. La actividad enzimática es revelada usando un sustrato específico en una solución tampón apropiada. Un sustrato frecuentemente usado es la 2,2'-bis azina (3-etilbenziltiazoline 6-ácido sulfónico) (ABTS) en la forma de una sal de amonio (Sigma, Boehringer). Se prepara una solución de reserva (madre) disolviendo 0,219 g en 10 ml de H_2O destilada N.B. Este sustrato es altamente carcinogénico y debe ser manipulado con cuidado. El tampón del sustrato consiste de acetato de sodio (13,6 g), NaH_2PO_4 (6,9 g) y agua para un volumen total de 1 litro. Debe ser autoclavado a 100 °C por 20 minutos. La dilución de H_2O_2 (que debe ser preparada con anterioridad) se hace diluyendo 200 μl de 30% H_2O_2 en 7 ml de H_2O destilada.

A 10.3.3 Metodología

Preparación del antígeno

- Usar un cultivo de *L. biflexa* serovar Patoc a una densidad de 10^8 - 10^9 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 µl 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 una 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:
 - 1 ml de solución madre "stock" de solución ABTS.
 - 20 ml del tampón de sustrato.
 - 200 µl de la solución diluida de H_2O_2
- Dispensar 150 µl 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 50 µl de 10% de sodio duodecil sulfato (SDS) en cada pozo.

Análisis

Medir la densidad óptica (DO) a 405 nm 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 estándar.

A 10.3.4 Resultados y limitaciones de la prueba

Precauciones

La prueba es extremadamente sensible, por tanto es esencial que todos los materiales utilizados estén rigurosamente limpios. Es preferible que todo el material de vidrio sea reservado para uso exclusivo en esta prueba.

Tiempo de respuesta

La prueba de ELISA da una respuesta positiva en la evaluación diagnóstica de leptospirosis algo más temprano que la MAT porque es más sensible para los anticuerpos IgM, generalmente se observa positividad 6 - 8 días después de la aparición de los primeros signos clínicos. Por otro lado, la prueba puede negativizarse más rápidamente que la MAT, aunque pueden persistir niveles bajos de IgM específica. Una ventaja potencial de la ELISA es que puede ayudar a diferenciar entre una leptospirosis actual de una previa, debido a que los anticuerpos de una infección pasada o una inmunización pueden no ser detectables. Sin embargo, si un conjugado anti Ig o IgG humano es usado, la positividad de la prueba puede ser extendida, permitiendo la detección de anticuerpos residuales en pacientes en recuperación o inmunizados. El nivel de positividad observado con un conjugado anti Ig total es igual o más alto que el máximo observado con anticuerpos anti IgG o anti IgM.

Sensibilidad y especificidad

La prueba de ELISA es muy sensible y específica para el diagnóstico biológico de leptospirosis. La prueba tiene un valor particular como prueba de tamiz serológico por su simplicidad relativa en comparación con la MAT. Las pruebas de ELISA pueden ser usadas en estudios epidemiológicos para determinar la seroincidencia/seroprevalencia de leptospirosis.

Sin embargo, la prueba no es infalible y puede ser negativa, p.ej en un gran porcentaje de infecciones causadas por el serogrupo Grippotyphosa y, en menos grado, en la detección de infecciones con el serogrupo Australis. Si se emplean como antígenos una variedad de cepas de diferentes serogrupos en lugar de un antígeno derivado de la cepa saprofita Patoc I, la sensibilidad de la prueba se incrementa. Sin embargo, la prueba no permite el diagnóstico a nivel de serogrupo.

Se dispone de kits comerciales de la prueba de ELISA a partir de varias empresas productoras (*ver Anexo 15*).

A 10.4 CONCLUSIÓN

Es necesario tener precaución en la interpretación de los datos serológicos. Deben tomarse en consideración varios factores, incluyendo la técnica empleada, el serogrupo involucrado, el orden cronológico de las muestras tomadas durante la enfermedad y el tratamiento con antibióticos si lo hubo. La prueba género específica tiende a ser positiva más temprano en el curso de la enfermedad que la MAT. (Turner, 1968).

Los resultados de dos, o aún tres, muestras de suero, tomadas a intervalos de cerca de 10 días deben ser comparados para permitir una interpretación serológica de los resultados (*ver abajo*). Es posible reducir el intervalo, cuando existe urgencia en confirmar que el brote o caso de la enfermedad sea leptospirosis.

Por esta razón, un completo formulario epidemiológico y clínico (*ver Apéndice A10.1, abajo*) debe ser remitido con cada solicitud de examen serológico. Éste debe proveer información sobre la fecha en que la enfermedad comenzó, sobre el tratamiento con antibiótico dado, etc. Si los antibióticos fueron suministrados desde el inicio de la enfermedad, la respuesta inmune y de anticuerpos puede ser

demorada y el orden en el cual se positivizan las pruebas puede alterarse o aún resultar negativas, en particular la de ELISA.

Aunque la ELISA puede generalmente demostrar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en muestras de 24 - 48 horas antes de ser detectados por la MAT, también puede ser negativa más temprano. Entonces la MAT puede ser más apropiada para detectar infecciones previas.

De acuerdo con el Instituto Pasteur en París, si se obtiene un título de 1/100 en la prueba de MAT con uno o varios antígenos, el umbral del título positivo ha sido alcanzado (ver títulos de la MAT, p.14). Sin embargo, esto no permite la conclusión que la leptospirosis ha sido plenamente confirmada porque puede ser un título residual indicando de exposición previa. Como se mencionó arriba, el examen o el análisis de una segunda muestra de suero, tomada cerca de 10 días después, es necesario para demostrar el incremento en el título de los anticuerpos. Este incremento debe ser igual o mayor de al menos dos diluciones (una diferencia en un dilución no es significativa) para confirmar un caso reciente o actual de leptospirosis. Además, la seroconversión puede ocurrir entre dos muestras consecutivas. Un título alto de anticuerpos solamente contra el antígeno Patoc I sugiere que la infección es debida a una cepa cuyo serogrupo no está representado en el antígeno del grupo control usado o que una reacción inespecífica.

UNIDAD DE REFERENCIA DE LEPTOSPIRA Laboratorio de Salud Pública, County Hospital, HEREFORD HR1 2ER Telephone 01432 277707; Fax: 01432 351396															
POR FAVOR USE ESTE FORMATO PARA TODAS LAS SOLICITUDES A LA UNIDAD DE REFERENCIA DE LEPTOSPIRA La siguiente información es requerida para ayudar en el diagnóstico y epidemiología de la leptospirosis. Por favor complete TODAS las secciones.															
APELLIDO _____ NOMBRE(S) _____ SEXO M/F EDAD _____ años Fecha de Nacimiento ____/____/____ Dirección _____															
Contacto con Animales ☐ Animales de granja ☐ – Ganado vacuno ☐ -Ovejas ☐ Perros ☐ Ratas ☐ Ratones ☐ Otros animales (especifique en el recuadro de información adicional) ☐ No sabe	Contacto con el Agua ☐ Deporte acuático ☐ -natación ☐ -remo ☐ -surfing de viento ☐ -canotaje ☐ -canotaje de agua blanca ☐ Surf	Ocupación ☐ Granjero ☐ - agricultura ☐ - ganado ☐ Trabajador rural ☐ - agricultura ☐ - ganado ☐ Al aire libre - manual ☐ - con animales ☐ Pesca - granjero ☐ - trabajador ☐ - fileteador ☐ Matarife -trabajador ☐ - carnicero ☐ En interiores - manual ☐ - oficina ☐ - doméstico ☐ Trabajador de ☐ - alcantarillados ☐ - plomería ☐ Veterinario ☐ Médico ☐ Militar ☐ Profesor ☐ Estudiante ☐ Ama de Casa ☐ Jubilado ☐ Desempleado ☐ Otros (especifique)	Detalles Clínicos ☐ Síntoma gripal ☐ Dolor de Cabeza ☐ Mialgia ☐ Pirexia ☐ Letargia ☐ Malestar general ☐ Vómito ☐ Diarrea ☐ Conjuntivitis ☐ LFTs anormal ☐ Ictericia ☐ Falla Hepática ☐ Falla Renal ☐ Meningitis ☐ Sin Síntomas ☐ Muerte ☐ Chequeo médico ☐ Otros (especifique)												
Tipo de Contacto ☐ Ocupacional ☐ Recreacional ☐ Herida/abrasión ☐ Inmersión ☐ Mordida ☐ Otro (Especifique)															
Actividades de tiempo libre Por favor especifique abajo		Ha viajado recientemente ☐ Si ☐ No. Si es afirmativo por favor detalle (cuándo/cómo) en el recuadro de información adicional.													
Información Adicional:		Fecha de aparición de síntomas: _____ Fecha de tratamiento con antibióticos _____ Tratamiento con Antibióticos _____ <table border="1"> <thead> <tr> <th>Tipo de espécimen</th> <th>Fecha de obtención</th> <th>N° Referencia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>_____</td><td>_____</td><td>_____</td></tr> <tr><td>_____</td><td>_____</td><td>_____</td></tr> <tr><td>_____</td><td>_____</td><td>_____</td></tr> </tbody> </table>		Tipo de espécimen	Fecha de obtención	N° Referencia	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Tipo de espécimen	Fecha de obtención	N° Referencia													
_____	_____	_____													
_____	_____	_____													
_____	_____	_____													
Para uso de URL solamente IgM ELISA MAT Serogrupo infectante Epidemiología Serología Solicitada Completada Lab No.	Prueba de laboratorio requerida ☐ CFT ☐ ELISA ☐ Otra (Especifique) _____ Resultados _____ Muestras enviadas previamente ☐ Si ☐ No Fecha _____ Si sí, número de la URL fecha de la muestra: _____ Laboratorio que envía la muestra, si no, laboratorio que solicita la prueba: _____ Laboratorio solicitante _____ Dirección _____ Médico: _____ Fecha: ____/____/____														

APÉNDICE A10.1 Ejemplo de un formato para solicitar el diagnóstico de leptospirosis

SEROLOGÍA PARA LEPTOSPIROSIS: QUE ES Y PARA QUE SE HACE

En el ejemplo la Unidad de Referencia para *Leptospira* (del Reino Unido) ofrece dos pruebas para el diagnóstico serológico de leptospirosis; una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) desarrollada localmente, usada para realizar el tamiz de sueros, con la confirmación de los resultados positivos por el método de referencia estándar; prueba de aglutinación microscópica (MAT).

ELISA para *Leptospira*

Para detectar los anticuerpos IgM, la prueba de ELISA emplea un antígeno derivado de *Leptospira interrogans* serovar harjo, con peroxidasa de rábano picante y un sistema ABT enzima/sustrato.

El suero del paciente puede ser positivo 5 días después de la aparición de los síntomas pero difícilmente antes de este período. En aquellos casos donde el tratamiento con antibióticos ya ha sido iniciado, este período se puede incrementar.

Un título de IgM de 1:80 a 1:160 es considerado sugestivo de infección con leptospirosis y se requiere de muestras adicionales para confirmar el diagnóstico en conjunto con la MAT.

Prueba de Aglutinación Microscópica

La MAT es una prueba de microaglutinación que se realiza empleando una combinación de 19 antígenos. Las leptospirosis pueden ser tanto *L. interrogans* patógenas o *L. biflexa*, no patógenas, siendo conocidos más de 200 serovares diferentes de leptospirosis patógenas. Estos serovares son agrupados en serogrupos sobre la base de su homología antigénica. Los serovares de cada serogrupo se reúnen y son usados como antígenos para la MAT de tal forma que cada suero pueda reaccionar con el mayor número de serovares de leptospirosis posibles.

La MAT puede ser positiva alrededor del décimo día después de la aparición de los síntomas e, inicialmente, un suero puede reaccionar con muchos de los serogrupos antigénicos. Eventualmente, durante un período – que puede ser de varios meses- los anticuerpos para un serogrupo pueden predominar lo que resulta indicativo de la identidad probable del serogrupo infectante.

Para permitir que la URL pueda identificar una infección a nivel de serogrupo, es necesario solicitar varios sueros del paciente a lo largo de un tiempo prolongado.

Por qué es necesaria esta información?

Esta información es vital para el trabajo de monitorear los serogrupos endémicos de leptospirosis en el Reino Unido, reconocer un serovar emergente o la importación de serogrupos no endémicos y tomar las apropiadas acciones.

Esperamos que esta breve explicación de la serología de la leptospirosis ayude a los pacientes cuando sea solicitada una muestra adicional de suero o completar el formulario epidemiológico. Se aprecia la cooperación en proveer las muestras y completar las fichas epidemiológicas.

Muestras requeridas para confirmar el diagnóstico de leptospirosis

1. Serología

- Suero: Volumen mínimo de 250 µl

2. Para el aislamiento de leptospirosis (cuando sea apropiado):

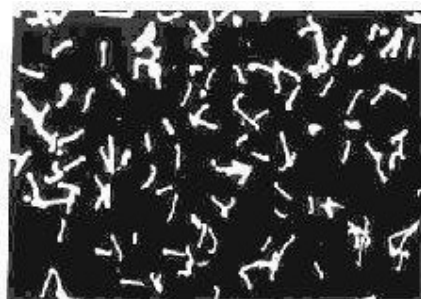
- Líquido Cefalorraquídeo.
- Cultivos aeróbicos de sangre tomados durante los 5 primeros días después de la aparición de los síntomas y enviarlos directamente a la URL.

3. Tejido *Post Mortem* fijado o no fijado para inmunofluorescencia.

La orina no es una muestra apropiada para el aislamiento de las leptospiras.

Por cualquier pregunta relacionada con el diagnóstico de leptospirosis, por favor contacte al personal de la URL en el teléfono 01432 277707.

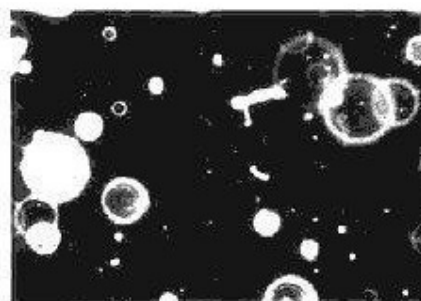
Figura A10.1. Ejemplos de aglutinación de la cepa de referencia M20 (serovar Copenhageni) con su antisuero homólogo de conejo en diluciones sucesivas comenzando por 1:20 y observados bajo microscopio de campo oscuro a 200x. El título es 1:5120.



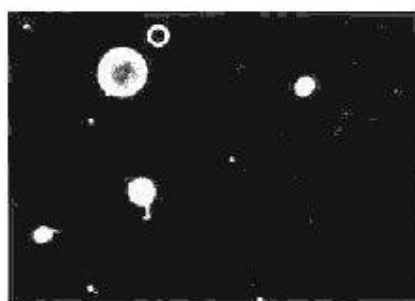
Negative control



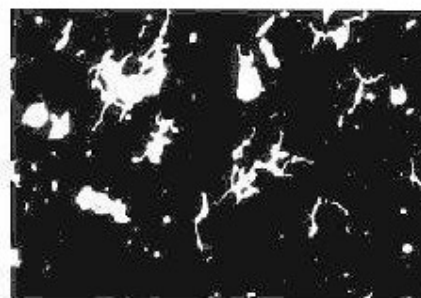
1:160



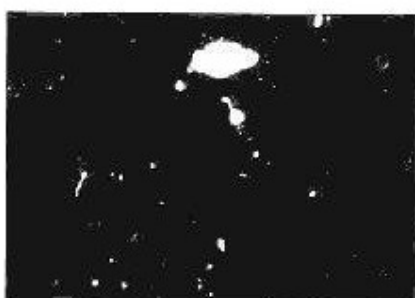
1:20



1:320



1:40



1:640

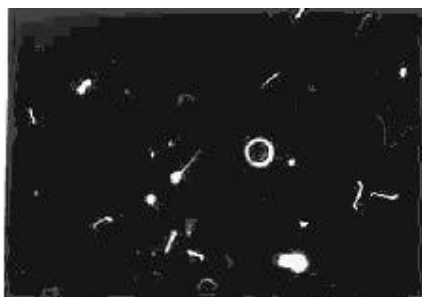


1:80

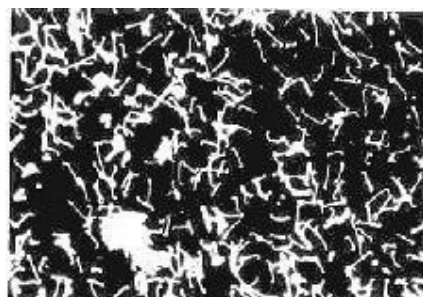


1:1280

Figura A10.1. Ejemplos de aglutinación de la cepa de referencia M20 (serovar Copenhageni) con su antisuero homólogo de conejo en diluciones sucesivas comenzando por 1:20 y observados bajo microscopio de campo oscuro a 200x. El título es 1:5120.



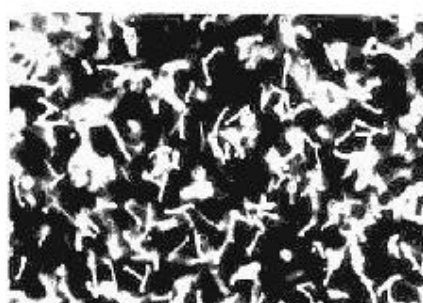
1:2560



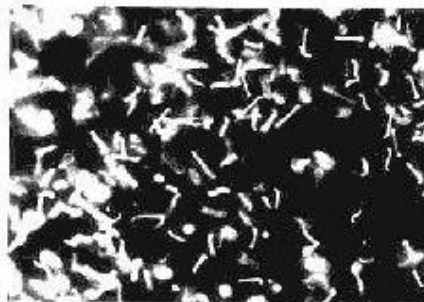
1:40 960



1:5120



1:81 920



1:10 240



1:20 480

REFERENCIAS

- Adler, B., Murphy, A.M., Locarnini, S.A., Faine, S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 452-457, 1980.
- Borg-Petersen, C. Experience of leptospirosis in Denmark. From: Discussion of leptospirosis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 42:714-718, 1949.
- Borg-Petersen, C., Fagroeus, A. The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta Pathologica*, 26:1-4, 1949.
- Carbrey, E.A. The relative importance of variable factors in the agglutination-lysis test. *Annual Proceedings of the United States Livestock Sanitary Association*, 64:130-142, 1960.
- Cole, J.R., Sulzer, C.R., Pursell, A.R. Improved microtechniques for the leptospiral agglutination test. *Applied Microbiology*, 25:976-980, 1973.
- International committee on systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of Leptospira. Minutes of the meeting, 6 to 10 August 1982, Boston, Massachusetts, USA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34:258-259, 1984.
- Kmety, E. Betrachtungen zum Problem der Paradoxen Reaktion und deren bedeutung in der Serodiagnostik einiger Leptospiren. *Zentralblatt für Bakteriologie, Abteilung Originale*, 170:597-608, 1957.
- Martin, L., Pettit, A. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hopitaux de Paris*, 42:972-675, 1918.
- Palmer, M.F., Waitkins, S.A., Wanyangu, S.W. A comparison of live and formalised leptospiral microscopic agglutination test. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und hygiene (International journal of Microbiology and hygiene)*, A265.151-159, 1987.
- Postic, D., Merien, F., Perolat, P., Baranton, G. *Diagnostic biologique leptospirose – borréliose de Lyme/Biological diagnosis leptospirosis- lyme borreliosis*, 2nd ed. Paris, collection des Laboratoires de Référence et d'Expertise. Institut Pasteur à Paris, 177-186, 2000.
- Schüffner, W., Mochtar, A. Experiments on the differential characters of Leptospira-strains with introductory remarks on the process of agglutination and lysis. *Proceedings of the Imperial Academy of sciences, Amsterdam*, 30 (1): 25-32, 1926.
- Sulzer, C.R., Jones, W.L. *Leptospirosis: methods in laboratory diagnosis*. Atlanta, GA, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service (DHEW Publication No. (CDC) 78-8275, 1978.
- Terpstra, W.J., Ligthart, G.S., Schoone, G.J. Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten I. Abteilung Originale*, A247:400-405, 1980.
- Terpstra, W.J., Ligthart, G.S., Schoone, G.J. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *Journal of General Microbiology*, 131: 377-385, 1985.
- Turner, L. Leptospirosis II. Serology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62:880-899, 1968.

Watt, G., Alquiza, L.M., Padre, L.P., Tuazon, M.L., Laughlin, L.W. The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *Journal of Infectious Diseases*, 157:840-842, 1988.

Wolf, J.W. *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1954.

Zochowski, W.J., Waitkins, S.A, Palmer, M.F. The use of ELISA in the diagnosis of human leptospirosis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 43:330-339, 1987.

ANEXO 11

TÉCNICAS SEROLÓGICAS DISTINTAS A MAT Y ELISA

Pruebas	Disponible Comercialmente ^a
Prueba de fijación de complemento (CFT)	Antígenos
Contrainmunolectroforesis (CIE)	–
Pruebas “Dipsticks”: - LEPTO Dip-S-Tick - Lepto Tek Lateral Flow	+ +
Prueba de aglutinación en látex seco (LeptoTek Dri-Dot)	+
Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT)	+
Prueba de hemaglutinación indirecta (IHA)	+
Prueba de aglutinación con látex (LA)	-
Prueba de aglutinación macroscópica en portaobjeto (SAT)	Antígenos
Prueba de aglutinación en microcápsula	+
Agglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (PSAT)	+
Prueba de lisis de eritrocitos sensibilizados (SEL)	-

^a Ver anexo 15.

REFERENCIAS

PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (CFT)

Nicolescu, M., Brosai, L. The estimation of the results obtained by the complement fixation test performed with the Patoc antigen in the diagnosis of human leptospirosis. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie*, 31:209-216, 1972.

Pinto, A.A., Santa Rosa, C.A., Sadatsune, T., Fleury, G.C. Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination test for leptospiral diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil*, 16:28-31, 1974.

Schubert, J.H., Carrington, L.B., Corner, E., Holdeman, L.V. Whole *Leptospira* suspensions as antigens in the complement- fixation test for leptospirosis. *American Journal of Hygiene*, 63:254-260, 1956.

Sturdza, N., Elian, M., Tulpan, G. Diagnosis of human leptospirosis by the complement-fixation test with a single antigen. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale*, 19:571-582, 1960.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Terpstra, W.J., Schoone, G.J., Lightart, G.S. Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of human leptospirosis. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung Originale*, A244:285-290, 1979.

PRUEBA "DIPSTICK"

-Lepto Dip-S-Tick

Levett, P.H., Branch, S.I., Whittington, C.U., Edwards, C.N., Paxton, H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:349-351, 2001.

-LeptoTek Lateral Flow

Eapen, C.K., Sugathan, S., Kuriakose, M., Abdoel, T., Smits, H.L. Evaluation of the clinical utility of a rapid blood test for human leptospirosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 42:221-225, 2002.

Smits, H.L., Ananyina, Y.V., Cheresky, A., Dancel, L., Lai A Fat, R.F.M., Chee, H.D., Levett, P.N., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Muthuesethupathi, M.A., Sanders, E.J., Sasaki, D.M., Domen, H., Yersin, C., Tin Aye, Bragg, S.L., Gussenhoven, G.C., Goris, M.G.A., Terpstra, W.J., Hartskeerl, R.A. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for the detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human leptospirosis. Serum specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:2904-2909, 1999.

Smits, H.L., Chee, H.D., Eapen, C.K., Kuriakose, M., Hussein Gasem, M., Yersin, C., Sasaki, D.M., Pujinato, B., Vestering, M., Abdoel, T.H., Gussenhoven, G.C. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:166-169, 2001.

Smits, H.L., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J. International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. *Tropical Medicine and International health*, 5:124-128, 2000.

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN CON LATEX SECO

Smits, H.L., van der Hooft, M.A.W.G., Goris, M.G.A., Gussenhoven, G.C., Yersin, C., Sasaki, D.M., Terpstra, W.J., Hartskeerl, R.A. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1272-1275, 2000.

Smits, H.L., Chee, H.D., Eapen, C.K., Kuriakose, M., Sugathan, S., Hussein Gasem, M., Yersin, C., Sasaki, D.M., Lai A Fat, R.F.M., Hartskeerl, R.A., Liesdek, B., Abdoel, T.H., Goris, M.G.A., Gussenhoven, G.C. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Tropical Medicine and International Health*, 6:114-118, 2001.

PRUEBA DE INMUNOFLOUORESCENCIA INDIRECTA (IFAT)

Torten, M., Shenberg, E., Van der Hoeden, J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 116:537-543, 1966.

Udomsakdi, S., Potha, U. The diagnosis of leptospirosis by fluorescent antibody technique using saprophytic *Leptospira* as a genus-specific antigen. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 55:101-104, 1972.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (IHA).

Effler, P.V., Domen, H.Y., Bragg, S.L., Tin Aye, Sasaki, D.M. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1081-1084, 2000.

Imamura, S., Matsui, H., Ashizawa, Y. Studies on indirect hemagglutination test for leptospirosis. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 42:563-568, 1972.

Imamura, S., Matsui, H., Kasao, M., Ashizawa, Y. Use of freeze-dried sensitized erythrocytes in indirect hemagglutination test for serodiagnosis of leptospirosis *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 47:441-444, 1977.

Levett, P.N., Whittington, C.U. Evaluation of a hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:11-14, 1998.

Sulzer, C.R., Jones, W.L. Evaluation of a hemagglutination test for a human leptospirosis. *Applied Microbiology*, 26:655-657, 1973.

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN CON LÁTEX (LA)

Kelen, A.E., Labzoffsky, N.A. Studies on latex agglutination test for leptospirosis. *Canadian Journal of Microbiology*, 6:463-473, 1960.

Muraschi, T.F. A simple screening test for the detection of leptospirosis in human beings and animals. *American journal of Public Health*, 49:1074-1078, 1959.

Vosta, J. Die Diagnostik der Leptospirosis mit Hilfe des Latex-Agglutinations-Test mit dem Antigen aus der *L. biflexa*. *Mikrobiologie und Epidemiologie*, 7:515-570, 1962.

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN MACROSCÓPICA EN LÁMINA O PORTAOBJETO (SAT)

Galton, M.M., Powers, D.K., Hall, D., Cornell, R.G. A rapid macroscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *American Journal of Veterinary Research*, 19: 505-512, 1958.

Wolf, J.W., Bohlander, H.J. Screening test in human serum samples with *Leptospira biflexa* antigens incorporated in Galton's macroscopic slide test. *Tropical and Geographical Medicine*, 19:63-69, 1967.

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN MICROCÁPSULA

Arimitsu, Y., Kmety, E., Ananyina, Y., Baranton, G., Ferguson, I.R., Smythe, L., Terpstra, W.J. Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Bulletin of the World Health Organization* 72:395-399, 1994.

Sehgal, S.C., Vijayachari, P., Subramaniam, V. Evaluation of *Leptospira* Micro Capsular Agglutination Test (MCAT) for sero-diagnosis of leptospirosis. *Indian Journal of Medical Research*, 106:504-507, 1997.

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN CON LÁMINA DE PATOC- (PSAT)

Mailloux, M., Mazzonelli, J., Dorta de Mazzonelli, G.T. Thermoresistant antigen in leptospirosis. Possibility of a macroscopic diagnosis of leptospirosis with a single antigen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung Originale*, A229:238-241, 1974.

Mazonelli, J., Dorta de Mazzonelli, G.T., Mailloux, M. Possibilité de diagnostic sérologique macroscopique des leptospires à l'aide d'un antigène unique. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 4-5:253-254, 1974.

Mazonelli, J., Dorta de Mazzonelli, G.T. Mailloux, M. Antigène thermorésistant chez les leptospires. *Annales de Microbiologie*, 125A:125-126, 1974.

Mazonelli, J., Dorta de Mazzonelli, G.T. Mailloux, M. Recherches sur les antigènes de leptospires. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 26:35-42, 1975.

PRUEBA DE LISIS DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS (SEL)

Cox, C.D. Hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with leptospiral extracts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 90:610-615, 1955.

Cox, C.D. Standardization and stabilization of an extract from *Leptospira biflexa* and its use in the hemolytic test for leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 101:203-209, 1957.

Cox, C.D., Alexander, A.D., Murphy, L.C. Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 101:210-218, 1957.

Cox, C.D., Stover, R.C., Treick, R.W. Serological studies on hemolytic antigen from *Leptospira*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98:265-269, 1958.

McComb, D.E., Smith, D.J.W., Coffin, D.L., MacCready, R.A., Shihman Chang, R. The use of erythrocyte sensitizing substance in the diagnosis of leptospirosis. I. The sensitized erythrocyte agglutination test. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene*, 6:90-100, 1957.

Sharp, C.F. Laboratory diagnosis of leptospirosis with the sensitized-erythrocyte lysis test. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 26:349-356, 1958.

Shihman Chang, R., Smith, D.J.W., McComb, D.E., Sharp, C.F., Tonge, J.I. The use of erythrocyte sensitizing substance in the diagnosis of leptospirosis. II. The sensitized erythrocyte lysis test. *American Journal of tropical medicine and Hygiene*, 6:101-107, 1957.

Tan, D.S.K. Sensitized-erythrocyte-lysis (SEL) test as an epidemiological tool for human leptospirosis serological surveys. *Bulletin of the World Health Organization*, 40:899-902, 1969.

ANEXO 12

AISLAMIENTO DE Y CULTIVO DE LEPTOSPIRAS

El aislamiento de leptospiiras depende del material elegido y la etapa de la enfermedad. Durante la fase leptospirémica (desde el día 1 hasta alrededor del día 10 después de la presentación de los síntomas) el material más apropiado es la sangre. En el Anexo 16 se brinda información sobre el medio de cultivo apropiado.

A 12.1 SANGRE

La sangre debe ser cultivada dentro de los 10 primeros días de la enfermedad y antes de que se suministren antibióticos. Se obtiene sangre venosa mediante una técnica aséptica e, idealmente, al lado mismo de la cama del paciente, se la inocular en botellas de cultivo para sangre conteniendo medio de cultivo para *Leptospira*. Inóculos pequeños consistentes de unas pocas gotas de sangre se inoculan en varios tubos, cada uno conteniendo 5 ml de medio apropiado. Inóculos grandes pueden inhibir el crecimiento de las leptospiiras.

Los cultivos deben ser incubados a 30°C y revisados regularmente por un período de 4 - 6 meses.

A 12.2 LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Las leptospiiras se pueden observar con microscopio de campo oscuro (*ver Anexo 6*) y aislarse por cultivo inoculando 0,5 ml de líquido cefalorraquídeo en 5 ml de cultivo semisólido durante las primeras semanas de la enfermedad.

A 12.3 ORINA

Durante la fase de leptospiuria, caracterizada por un incremento en la concentración de anticuerpos, (una semana después de la presentación de los síntomas) la orina y el cortex renal *post mortem* (*ver abajo*) son los inóculos más apropiados para el aislamiento de leptospiiras en los humanos. Animales silvestres y domésticos en el estado de portadores pueden liberar leptospiiras intermitentemente por muchos años o incluso por toda la vida, durante el cuál las leptospiiras pueden ser aisladas de su orina o tejido renal (*ver debajo*).

Se obtiene orina fresca de la mitad del chorro y se inocular inmediatamente. Una gota de orina no diluida se inocular en el primer tubo conteniendo 5 ml de medio de cultivo. Alternativamente, la muestra de orina puede centrifugarse (30 minutos a 1600 g o 1 minuto a 10 000 g) y el pellet resuspenderse en medio, después de lo cuál se realizan diluciones seriadas 10x en 1 ó 2 tubos adicionales. El cultivo se procesa igual a como se hace con la sangre.

Debido a que la orina es ácida, lo que decrece la viabilidad de las leptospiiras, esta debe ser inoculada en el medio de cultivo dentro de las 2 horas después de ser excretada. Se ha reportado un incremento de la viabilidad en muestras de orina neutralizadas con bicarbonato de sodio y con el uso de una solución tamponada de seroalbúmina bovina fosfato (BSA) (Ellinghausen, 1973).

El medio conteniendo 5-fluorouracil o antibióticos apropiados que inhiben el crecimiento de contaminantes bacterianos y no afectan las leptospiiras (*ver Anexo 16*) pueden ser útiles para la reducción de la contaminación de cultivos de orina.

A 12.4 MATERIAL *POST MORTEM*

En casos fatales de leptospirosis de humanos y animales, los organismos pueden ser cultivados a partir de muestras postmortem maceradas provenientes de varios tejidos. Las leptospiras también pueden ser aisladas exitosamente de fetos de animales abortados. Un trozo de tejido se coloca en una jeringa estéril sin aguja y se exprime (colocando presión en el émbolo) a través del orificio al final de la jeringa hacia un tubo conteniendo medio de cultivo. Alternativamente, una parte del hígado o riñón se colocan en un mortero, junto con tampón de fosfato salino (PBS), pH 7,2 o en medio, y se macera, y la suspensión resultante se inocula en el medio de cultivo.

El procedimiento es como sigue:

1. Corte un pedazo de tejido (0,5 x 0,5 cm) en pequeños trozos en una caja de Petri bajo condiciones de esterilidad.
2. Macere finamente los trozos cortados de tejido en 1 ml de medio de cultivo EMJH estándar (ver pp. 113-115).
3. Coloque 0,5 ml de la mezcla de tejido macerado y medio de cultivo en un tubo conteniendo 5 ml de medio EMJH enriquecido con 1% de suero de conejo y 1% de suero de ternero (FCS) mas 5 fluorouracil (5 FU) y otros 0,5 ml en un tubo conteniendo 5 ml de EMJH estándar más 5 FU.
4. Mezcle los contenidos y transfiera 0,5 ml con una pipeta estéril a otro tubo conteniendo 5 ml de medio EMJH enriquecido mas 5 FU y medio estándar de EMJH más 5 FU.
5. Mezcle los contenidos y repita el paso 4 de forma que de obtener dos diluciones en tres tubos de medio EMJH enriquecido mas 5 FU y en medio estándar de EMJH mas 5 FU.
6. Incube estos 6 tubos a 30°C y examine el crecimiento una vez por semana por las primeras dos semanas y después una vez cada dos semanas hasta los 4 - 6 meses.

El aislamiento de leptospiras depende del número de organismos viables presentes en el momento de la inoculación en el medio de cultivo. Cambios *post-mortem* pueden reducir rápidamente el número de organismos viables. Esta reducción en el número de organismos viables depende también de la temperatura. Las leptospiras pueden sobrevivir a 4 °C por algún tiempo pero mueren rápidamente en tejidos mantenidos a 20°C y aún más rápido entre 30 y 40 °C debido a la autólisis de las células y la consecuente disminución del pH. Los tejidos no deben ser congelados, ya que también se reduce la viabilidad de las leptospiras presentes.

REFERENCIAS

Ellinghausen, H.C. Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospirae. *Journal of Medical Microbiology*, 6:487-497, 1973.

Bibliografía

Babudieri, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 24:45-58, 1961.

Ellis, W.A., Little, T.W.A., Eds. *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers, 1986.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne MediSci, 1999.

Levett, P.H. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 296-326, 2001.

Wolff, J.W. *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1954.

ANEXO 13

AISLAMIENTO DE LEPTOSPIRAS USANDO ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El aislamiento indirecto de leptospiiras involucra la inoculación de animales de laboratorio con muestras de sangre u orina. El éxito en el aislamiento varía de acuerdo con la susceptibilidad del animal y depende del serovar de leptospira involucrado y su patogenicidad relativa. Los animales usados son cobayos jóvenes (150 - 175 g) y hamsters dorados (4-6 semanas).

La inoculación (0,5 – 1,0 ml) se realiza intraperitonealmente.

Se toma fluido peritoneal después del tercer día de inoculación haciendo una punción con una pipeta capilar en la pared del cuadrante inferior del abdomen. El fluido peritoneal sube por capilaridad de la pipeta y una gota se coloca en una lámina y se examina con cubre objeto en el microscopio de campo oscuro (Ver Anexo 6). Cuando se observan leptospiiras, puede efectuarse una punción cardiaca con anestesia para coleccionar sangre para cultivo.

Si el animal inoculado muere, es posible obtener una muestra de tejido del hígado y riñón para cultivo en varios medios (*ver Anexo 12*).

Bibliografía

Wolff, J.W. *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1954.

ANEXO 14

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

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 leptospirosis), 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 leptospirosis. 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 y/o realizarse con un set de iniciadores anidados para asegurar una alta especificidad. Con la actual disponibilidad de termocicladores avanzados y rápidos (Woo et al., 1997, 1998) y kits de extracción de ácidos nucleicos "listos para usar", la PCR es un método rápido posible de diagnóstico temprano de la leptospirosis.

Hasta la fecha, se han descrito muchos métodos de PCR (Gravekamp et al., 1993; Hookey, 1992; Merien et al., 1992; Wagenaar et al., 1994; Woodward et al., 1991; Zuerner et al., 1995; Zuerner & Bolin, 1997). Se ha utilizado el gen *rrs* codificante para la 16S rRNA como uno de los blancos principales (Hookey, 1992; Merien et al., 1992; Wagenaar et al., 1994). Otros blancos incluyen los genes *secY* y *flaB* para el set de iniciadores combinados de G1/G2 y B64I/B64II, respectivamente (Gravekamp et al., 1993; Zuerner et al., 2000).

Los protocolos para la PCR con los sets de iniciadores G1/G2 y B64I/B64II y para la extracción del ADN de muestras de orina y sangre se brindan más adelante. Un protocolo detallado y otra PCR amplificadora de la parte del gen *rrs* usando un solo set de iniciadores pueden ser encontrados en Postic et al., (2000).

Las dos PCR basadas en las secuencias de los genes *rrs* y secuencias blanco combinadas *secY* y *flaB* fueron clínicamente evaluadas por Merien et al. (1995) y Brown et al. (1995), respectivamente.

Los protocolos para otras PCR son dados en las referencias. Electroforesis de geles de agarosa, "southern blotting", hibridación y procedimientos de marcado están descritas en manuales de laboratorio estándar o en las instrucciones de varios fabricantes.

A 14.1 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DEL ADN

Estos son protocolos descritos por Boom et al., (1990, 1991).

A 14.1.1 Soluciones

Tampón L₂ 0,1 M. Tris-HCl pH 6,4:

- Disuelva 12,1 g de Tris en 800 ml de agua destilada
- Agregue 8,1 ml de 12N HCl
- Ajuste a 1 litro con agua destilada

Tampón L₂ de lavado

- Disuelva 120 g de tiocianato de guanidina (GuSCN) en 100 ml de tampón L₂, agitando suavemente en baño maría a 60°C.

Tampón de lisis L₆

- Disuelva 120 g de GuSCN en 100 ml de tampón L₂. Después que el GuSCN se ha disuelto, agregar 22 ml de 0,2 MEDTA, pH 8 y 2,6 g de Triton X-100.

0.2 M EDTA, pH 8.0:

- Disolver 37,2 g EDTA y 4,4 g NaOH en un volumen total de 500 ml de agua destilada.

Diatomeas

- Suspender 10 g de kieselguhr-DC en 50 ml de agua destilada
- Agregar 0,5 ml de 12N HCl
- Mezclar bien, repartir y esterilizar.
- Guardar a temperatura ambiente en un lugar oscuro

Las diatomeas pueden ser reemplazadas por sílica gel

Tiocianato de Guanidina: Fluka Biochemica cat nr. 50990.

Kieselguhr-DG: Riedel-de Haen cat nr. 31689.

A 14.1.2. Extracción de ADN de muestras de orina

El procedimiento es como sigue:

1. Recoger 10 ml de orina en un recipiente de 15 ml, agregar 10 µl de formalina (concentración final 0,1%) y guardar la muestra a 4°C antes de su uso.
2. Centrifugar los 10 ml de orina por 30 minutos a 1600 g.
3. Desechar el sobrenadante.
4. Agregar 9 ml de solución tampón L₆ y 40 µl de diatomeas o sílica gel.
5. Incubar con agitación por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar por 5 minutos a 1600 g.
7. Desechar el sobrenadante por succión.
8. Agregar 1 ml de tampón de lavado L₂ y transferir la suspensión a un tubo limpio de 1,5 ml.
9. Lavar el pellet dos veces con 1 ml de tampón de lavado L₂ (1 minuto a 10 000 g).
10. Lavar el pellet dos veces con 1 ml de etanol (1 minuto a 10 000 g).
11. Lavar el pellet con 1 ml de acetona (1 minuto a 10 000 g).
12. Secar el pellet por 10 minutos a 56 °C.
13. Eluir el ADN con 125 µl de solución de proteinasa K (200 ng/ml) por, al menos, 10 min. a 56 °C.
14. Hervir la solución de ADN eluido por 10 minutos a 100 °C (ver abajo).
15. Centrifugar por 2 minutos a 10 000 g.
16. Obtener 100 µl del sobrenadante con una pipeta y usar 10-30 µl para la reacción de PCR.

El tratamiento con proteinasa K (pasos 13 y 14) no es esencial y puede ser omitido. El ADN debe ser entonces desprendido con 125 µl de agua destilada por incubación a 56 °C por 10 minutos y seguir con el paso 15.

A 14.1.3. Extracción del ADN de muestras de suero o plasma.

Varios métodos han sido descritos pero el siguiente procedimiento se ha encontrado confiable:

- Diluya 0,1 ml de la muestra con 0,9 ml de tampón L₆. La muestra se procesa en un tubo Eppendorf.
- 1 ml de muestra diluida con 9 ml del tampón L₆ se procesa inicialmente en un tubo con tapa rosca de 15 ml. Después de la adición de 1 ml del tampón L₂ (paso 8), la muestra es transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. No use más de 1 ml en este protocolo, el cuál consta de los siguientes pasos:
 1. Mezclar un volumen de la muestra y 9 volúmenes del tampón de lisis L₆ en un tubo Eppendorf de 1.5 ml o en un tubo con tapa rosca de 15 ml.
 2. Agregar 40 µl de suspensión de diatomeas o sílica gel
 3. Incubar con agitación por 10 minutos a temperatura ambiente.
 4. Centrifugar por 5 min. a 1600 g (tubo de 15 ml) o 1 min. a 10 000 g (tubos Eppendorf).
 5. Remover por succión y desechar el sobrenadante.
 6. Agregar 1 ml de tampón de lavado L₂ y transferir la suspensión a un tubo de 1,5 ml limpio si el volumen inicial fue de más de 1 ml.
 7. Lavar el pellet dos veces con 1 ml del tampón de lavado L₂ (1 min. a 10 000 g).
 8. Lavar el pellet dos veces con 1 ml de etanol al 70% (1minuto a 10 000 g).
 9. Lavar el pellet con 1 ml de acetona (1minuto a 10 000 g).
 10. Secar el pellet por 10 minutos a 56 °C.
 11. Eluir el ADN con 125 µl de solución de proteinasa K (200 ng/ml) por 10 minutos a 56 °C.
 12. Hervir la solución de ADN eluido por 10 minutos a 100 °C (ver abajo).
 13. Centrifugar por 2 minutos a 10 000 g.
 14. Recoger 100 µl de sobrenadante con una pipeta y usar 10-30 µl para la reacción de PCR.

El tratamiento con proteinasa K (pasos 11 y 12) no es esencial y puede ser omitido. El ADN debe ser entonces desprendido con 125 µl de agua destilada por incubación a 56 °C por 10 minutos y siga con el paso 13.

A 14.2.1 PCR DE ACUERDO CON GRAVEKAMP ET AL.

Este procedimiento fue descrito por Gravekamp et al. (1993) y Bal et al. (1994), con algunas modificaciones.

A 14.2.1 Soluciones

1. GeneAmp 10 x Tampón para PCR II (100 mM Tris HCl, pH 8.3, 500 mM KCl) (Applied Biosystems)
2. Solución de 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems).

A 14.2.2 Iniciadores y tamaño de los productos de PCR

G1 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT
 G2 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG
 Tamaño del producto 285 bp
 B64I 5'-ACT AAC TGA GAA ACT TCT AC
 B64II 5'-TCC TTA AGT CGA ACC TAT GA
 Tamaño del producto 563 bp.

A 14.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla de la PCR para una reacción (50µl) es la siguiente:

- 0,5 µl del iniciador hacia delante, 100 µM (100pmol/ µl).

- 0,5 µl del iniciador de reversa, 100 µM (100pmol/µl).
- 0,5 µl de mezcla de dNTP conteniendo 25 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Amersham Pharmacia).
- 0,125 µl de deoxinucleótido dUTP 100 mM (Amersham Pharmacia).
- 5,0 µl de tampón 10x de RCP (GeneAmp 10 x Tampón para RCP II).
- 6 µl de solución de MgCl₂ 25 mM.
- 0,2 µl de ADN polimerasa AmpliTaq (5U/µl).
- 0,5 µl de uracil glicosilasa (1U/ µl).
- Agregar 10-30 µl de la muestra a la mezcla de la PCR.
- Agregar agua destilada para un volumen final de 50 µl.
- Agregar dos gotas de aceite mineral con una pipeta plástica desechable de 1 ml.

La concentración final del tampón es de 10mM Tris HCL, pH 8,3, 50nM KCL, 3mM MgCl₂. La uracil N-glicosilasa (UNG) es recomendada para la PCR diagnóstica y en donde hay contaminación aparente con amplicones de la mezcla de reacción. Si no se usa el UNG, debe ser reemplazado por agua destilada.

Si se va a procesar más de una muestra, la cantidad de los ingredientes debe ser multiplicada por el número de muestras y las alícuotas transferidas a tubos de PCR limpios.

Las condiciones óptimas, y especialmente las concentraciones de MgCl₂ deben ser determinadas, particularmente cuando se cambian los lotes y/o las compañías administradoras de reactivos y enzimas.

El programa de PCR es como sigue:

- 10 minutos a 36 °C para la digestión de la UNG seguida de 5 minutos a 94°C para inactivar posteriormente la UNG y separar las hebras de ADN. Esto es seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturalización del ADN), 1 minuto a 55 °C (unión del cebador) y 2 minutos a 72 °C (extensión del iniciador por la polimerasa del ADN estable al calor). Incubar a 72°C.
- La sensibilidad y la especificidad de la PCR puede ser optimizada realizando después una hibridación de los productos de la PCR con sondas apropiadas (Bal et al. 1994).

REFERENCIAS

Bal, B.A., Gravekamp, C., Hartskeerl, R.A., de Meza-Brewster, J., Korver, H., Terpstra, W.J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of clinical Microbiology*, 32:1894-1898, 1994.

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:495-503, 1990.

Boom, R., Sol, C.J.A., Heijntink, R., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van der Noordaa, J. Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 29:1804-1811, 1991.

Brown, P.D., Gravekamp, C., Carrington, D.G., van de Kemp, H., Hartskeerl, R.A., Edwards, C.N., Everard, C.O.R., Terpstra, W.J., Levett, P.N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 43:110-114, 1995.

Gravekamp, C., van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G.L., van Eys, G.J.J.M., Everard, C.O.R., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139:1691-1700, 1993.

Hookey, J.V. Detection of leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 90:267-274, 1992.

- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I. Polymerase chain reaction for the detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:2219-2224, 1992.
- Merien, F., Baranton, G., Perolat, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 172:281-285, 1995.
- Postic, D., Merien, F., Perolat, P., Baranton, G. *Diagnostic biologique leptospirose-borréliose de Lyme/Biological diagnosis leptospirosis-Lyme Borreliosis*, 2nd ed. Paris. Collection des Laboratoires de Référence et d'Expertise. Institut Pasteur à Paris, 2000.
- Wagenarr, J.A., Segers, R.P.A.M., van der Zeijst, B.A.M. Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences. *Molecular Biotechnology*, 1994; 2:1-14, 1994.
- Woo T.H., Patel, B.K., Smuthe, L.D., Symonds, M.L., Norris, M.A., Dohnt, M.F. Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:3140-3146, 1997.
- Woo T.H., Patel, B.K., Smythe, L.D., Symonds, M.L., Norris, M.A., Dohnt, M.F. Identification of pathogenic *Leptospira* by TaqMan probe in a LigthCycler. *Annals of Biochemistry*, 256:132-134, 1998.
- Woodward, M.J., Sullivan, G.J., Palmer, J.C., Wooley, J.C., Redstone, J.S. Development of a PCR test specific for *Leptospira hardjo* genotype *bovis*. *Veterinary Record*, 128:282-283, 1991.
- Zuerner, R.L., Alt, D., Bolin, C.A. (1995). IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:3284-3289, 1995.
- Zuerner, R.L., Bolin, C.A. (1997). Differentiation of *Leptospira interrogans* by IS1500 hybridization and PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2612-2617, 1997.
- Zuerner, R.L., Hartskeerl, R.A., van de Kemp, H., Bal, A.E. Characterization of the *Leptospira interrogans* S10-spe-a operon. *FEMS Microbiology Letters*, 18:303-308, 2000.

ANEXO 15

PRUEBAS COMERCIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SUEROS, ANTICUERPOS MONOCLONALES Y CEPAS DE *LEPTOSPIRA*

No se recibió respuesta de varias de las compañías o institutos mencionados a un cuestionario enviado para confirmar la información que se consigna pero existen razones para creer que ellos manufacturan y/o distribuyen materiales y reactivos en sus regiones. Las pruebas comerciales se muestran en la Tabla A15.1 y los medios de cultivo, sueros, anticuerpos monoclonales (AcMs) y cepas de *Leptospira* en la Tabla A15.2.

Tabla A15.1 Pruebas comerciales

País	Compañía Manufacturera	Pruebas Comerciales
Australia	PanBio Limited 116 Lutwyche Road Windsor Windsor, Q 4030, Brisbane, Australia Tel: +61 7 3357 1177 Fax: +61 7 3357 1222 Email: PanBio@PanBio.com.au Web Site: http://www.panbio.com.au/	Prueba de <i>Leptospira</i> IgM ELISA (cat.no. LPM-200)
Bélgica	Sanofi-BioRad Begoniastraat 5, 9810 Nazareth, Belgium Tel: +32 9 385 6554 Fax: +32 9 385 5511	Prueba de aglutinación en lámina TR
Brasil	Bio Manguinhos-Fiocruz Avenida Brasil 4365 Rio de Janeiro, Brasil. Fax: +55 21 2260 4727 Email: emilson@bio.fiocruz.br Web site: http://www.fiocruz.br	1. Prueba simple de macroaglutinación en lámina - leptospirosis-BioManguinhos 2. EIA-IgM-leptospirosis-BioManguinhos
Francia	BioMérieux Chemin de Lórme F-69280 Marcy l'étoile, France Tel: +33 4 7887 2000 Fax: +33 4 7887 2090 Email: infoleptotek@na.biomerieux.com Web site: http://www.biomerieux.com	1. LeptoTek Lateral Flow 2. Lepto Tek Dri-Dot
Alemania	Bios GmbH Labordiagnostik Reisheimerstrasse 52, D-82158 Gräfelfing Postfach 1640, D-82158 Gräfelfing/ München, Germany Tel: +49 89 8988 9541 / 8988 950 Fax: +49 89 8988 9540 / 8988 95 Email: info@bios-world.com	1. El kit Biolisa (leptospirosis IgG e IgM) 2. Prueba Biosave <i>Leptospira</i> latex 3. Prueba Biognost leptospirosis IgG e IgM (IFA)

País	Compañía Manufacturera	Pruebas Comerciales
Alemania	Institut Virion. Serion GmbH Serion Immundiagnostica GmbH Konradstrasse 1, 97072 Würzburg, Alemania Tel: +49 931 309 860 Fax: +49 931 52 650 Email: virion-serion@t-online.de Web site: http://www.virion-serion.de	1. Prueba de fijación del complemento (CFT) -Leptospira, antígeno grupo específico (biflexa) -Leptospira, Suero positivo grupo específico (biflexa) control -Antígeno de <i>Leptospira canicola</i> -Antígeno de <i>Leptospira grippotyphosa</i> -Antígeno de <i>Leptospira</i> <i>icterohaemorrhagiae</i> -Antígeno de <i>Leptospira Pomona</i> -Antígeno de <i>Leptospira sejroe</i> -Suero control positivo de <i>Leptospira</i> -Suero control negativo de <i>Leptospira</i> 2.Pruebas clásicas de ELISA en kits -SERION ELISA clásica de <i>Leptospira</i> IgG en kits. SERION ELISA clásica <i>Leptospira</i> IgM em kit
Japón	Japan Lyophilization Laboratory Koishikawa IS Building 4-2-6- Kohinata,Bunkyo-ku, Tokio,112- 0006,Japan Tel: +81 3 5800 5303 Fax: +81 3 5802 6730 Email: bcg5303@pastel.ocn.ne.jp Contacto: Mr. Takeru Hashimoto, Manager, International Department	LEPTOSPIRA-MC para la detección de anticuerpos de <i>Leptospira</i> (cinco pruebas cualitativas)
Federación Rusa	WHO Collaborating Centre on the Epidemiology of Leptospirosis. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology,Gamaleya Street 18, 123098 Moscú, Federación Rusa Tel: +7 095 193 3001 Fax: + 7 095 193 6183 Email: 1570.q23@23.relcom.ru Contacto: Dr J.V. Ananyina	Kit Leptospirosis BASA de aglutinación en lámina
Estados Unidos de América	Focus Technologies 10703 Progress Way Cypress, CA -90630,USA Fax: +1 714 220 1683	Prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA), Código del producto: IH 100
Estados Unidos de América	PanBio InDx 1756 Sulphur Spring Road Baltimore, MD 21227,USA Tel +1 410 737 8500 Fax: +1 410 536 1212 Email: Carl_Stubbings@PanBio.com.au Sitio Web: http://www.indxdi.com	1.Leptospirosis IgM Dip-S-Tick -10 Test pack cat no. 5065M-02-10 -50 Test pack cat no.5065M-01-50 2.Leptospira Ig ELISA Test -Cat no.5065-03-96

Tabla A15.2 Medios de cultivo, sueros, anticuerpos monoclonales (AcMs) y cepas de *Leptospira*.

País	Compañía Manufacturera	Pruebas Comerciales
Bélgica	Sanofi-BioRad Begoniastraat 5, 9810 Nazareth, Belgium Tel: +32 9 385 6554 Fax: +32 9 385 5511	Medios de cultivo
India	Centro Nacional de Referencia Regional Medical Research Centre Indian Council of Medical Research Post Bag No.13 Port Blair 744101 Andaman and Nicobar Islands Tel: +91 3192 51158 / 51043 Fax: +91 3192 51163 / 33660 Email: lcmr@Cal3.vsnl.net.in	Medios de Cultivo , cepas de <i>Leptospira</i> y antisuero de conejo
Holanda	KIT Biomedical Research Meibergdreef 39 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands Tel: +31 20 566 5431 Fax: +31 20 697 1841 Email: lepto@kit.nl Sitio web: http://www.kit.nl	1. Medio EMJH, enriquecido y medio completo puede obtenerse a precio de costo. 2. Antisuero de conejo a precio de costo. 3. Anticuerpos monoclonales de diferentes especificidades de <i>Leptospira</i> a precios de costo. 4. Cepas de <i>Leptospira</i>, los costos de transporte deben ser cancelados por el destinatario.
Federación Rusa	WHO Collaborating Centre on the Epidemiology of Leptospirosis Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Gamaleya Street 18, 123098 Moscú, Federación Rusa Tel: +7 095 193 3001 Fax: +7 095 193 6183 Email: 1570.g23@g23.relcom.ru Contacto: Dr J.V. Ananyina	Cepas de referencia de <i>Leptospira</i>
Eslovaquia	FAO/WHO Collaborating Centre for the Epidemiology of Leptospirosis Institute For Epidemiology Medical Faculty of the Komensky University, Spitalska 24 81372 Bratislava, Eslovakia Tel: +421 7 59 357 489 / 496 / 491 Fax:: +421 7 59 357 506 Email: epidem@fmed.uniba.sk Sitio web: www.fmed.uniba.sk	Medio de Korthof y cepas de referencia de <i>Leptospira</i>

País	Compañía Manufacturera	Pruebas Comerciales
USA	Becton-Dickinson Biosciences / Difco 7 Lofton Circle Sparks, MD 21152-0999, USA Tel: +1 800 638 8663 Tel: +1 800 675 0908 (customer service) Sitio Web: http://www.bd.com/microbiology	Medio enriquecido y EMJH
USA	Intergen Company 2 Manhattanville Road The Centre at Purchase Purchase, NY 10577, USA Tel: +1 914 694 1700 Email: techinfo@intergenco.com Sitio web: http://intergenco.com	1.Bovuminar® Microbiological Media (PLM-5) Cat. No. 3412 2.Bovuminar® Microbiological 30% (Leptalb-7) Cat no. 3410 3.Bovuminar® Microbiological Grade pH7 Cat .no 3265 4.Bovuminar® Cohn Fraction V pH7 Powder Cat. No. 3225

ANEXO 16

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

A 16.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA EL CRECIMIENTO DE LAS LEPTOSPIRAS

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

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

A 16.2 MEDIOS PARA EL CULTIVO DE LEPTOSPIRAS

Se ha descrito una amplia variedad de medios para el cultivo de leptospiiras. Estos pueden ser divididos en cinco grupos:

1. Medio tradicional conteniendo aproximadamente de 8 a 10% de suero de conejo (Stuart, Korthof, Fletcher, Vervoort, Schüffner). El suero de conejo contiene la más alta concentración de vitamina B12 ligada, la cuál es esencial para la multiplicación de las leptospiiras. El título de aglutininas anti leptospiiras en suero de conejo es usualmente bajo cuando comparado con el encontrado en otros animales pero, igualmente, los sueros deben ser revisados para determinar presencia de anticuerpos. Los medios de Schüffner y Korthof tienen la desventaja de contener fosfato el cuál puede precipitar, lo que no es deseable en la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
2. El medio Tween80/albumina sérica de bovino (BSA) o Ellinghausen & McCullough (1965a, 1965b, 1967) y su modificación por Johnson & Harris (EMJH). El componente más costoso de este medio es la BSA.
3. Medio bajo en proteína o medio libre de proteína, usualmente utilizado para la preparación de vacunas (Shenberg, 1967; Bey & Johnson, 1978).
4. Medio enriquecido. Empleado para intensificar el crecimiento de leptospiiras con requerimientos nutricionales complejos, tales como el serovar hardjo; los medios pueden enriquecerse agregando suero (p.ej. 1 - 4% de suero fetal bovino (FCS) y suero de conejo) u otros ingredientes tales como hidrolizado de lactoalbumina, superóxido dismutasa y piruvato (Ellis, 1986). El medio EMJH es frecuentemente enriquecido agregando 1% de suero de conejo y 1% de FCS.
5. Medio selectivo con 5-fluorouracil (y/u otro antimicrobiano como neomicina, ácido nalidixico, actidione, sulfadiazol, rafimpicina, anfotericina B). Estos aditivos pueden suprimir el crecimiento de bacterias contaminantes en muestras clínicas no estériles, sin afectar las leptospiiras, pero pueden causar una reducción en el crecimiento de las leptospiiras. Esto es particularmente cierto con el sulfadiazol.

A 16.3 FORMAS DE LOS MEDIOS

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

A 16.3.1 Forma líquida

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

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

A 16.3.2 Forma semisólida

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

A 16.3.3 Forma sólida

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

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

A 16.4 PREPARACIÓN DE MEDIO LÍQUIDO DE EMJH (ELLINGHAUSEN AND McCULLOUGH, MODIFICADO POR JOHNSON Y HARRIS).

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

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

A 16.4.1 Requerimientos

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

Reactivos químicos: Na_2HPO_4 , p.ej. Merck 1.06586.0500; KH_2PO_4 , p.ej. Merck 1.04873.1000; NaCl , p.ej. Merck 1.06404.1000; NH_4Cl , p.ej. Merck 1.01145.0500; Vitamina B1 (tiamina), p.ej. Merck 1.08181.0025; glicerol, p.ej. Merck 1.04093.1000; seroalbúmina bovina fracción V, p.ej. Sigma A9647; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.ej. Merck 1.02382.0500; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, p.ej., Merck 1.05833.0250; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, p.ej. Merck 1.03965.0100; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.ej. Merck 1.02790.0250; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, p.ej. Merck 1.08883.0100; Vitamina B 12 (cianocobalamina), p.ej., Merck 5.24950.0010; Tween 80, p.ej. Merck 8.22187.0500; Piruvato de sodio, p.ej. Merck 1.06619.0050.

Soluciones madre (stock): Estas soluciones se muestran en las Tablas A16.1 y A16.2. Las cantidades dadas son para 20 litros de medio EMJH.

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

Reactivos	Cantidades (g) por 100 ml de agua estéril	Volumen	Temperatura de almacenamiento
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 (cada uno)	30 ml	-20 °C
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	20 ml	- 20 °C
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,3	2ml	+4 °C
Vitamina B 12	0,02	20 ml	- 20 °C
Tween 80	10,0	250 ml	-20 °C
Glicerol	10,0	20 ml	-20 °C

Tabla A16.2. Soluciones madre de medio base

Reactivos	Cantidades (g) por 100 ml de agua estéril	Volumen	Temperatura de almacenamiento
NH_4Cl	25,0	20 ml	-20 °C
Vitamina B1 (tiamina)	0,5	20 ml	-20 °C

A 16.4.2 Método

Suplemento de ácidos grasos y albúmina (2 litros)

Se prepara como sigue:

- Disolver 200 g de seroalbúmina bovina (BSA) en 1200 ml de agua destilada estéril, agitando suavemente con una barra magnética (evitando hacer espuma). Puede llevar varias horas disolver la albúmina dependiendo del lote de BSA.
- Retirar todas las soluciones madre fuera del congelador.
- Agregar 30 ml de la solución madre de cloruro de calcio/cloruro de magnesio; 20 ml de solución madre de sulfato de zinc; 2 ml de la solución madre de sulfato de cobre; 1 g de sulfato ferroso; 0,8 g de piruvato de sodio; 20 ml de solución madre de vitamina B 12; 20 ml de la solución madre de glicerol; 250 ml de la solución madre de Tween 80.
- Agregar agua destilada estéril hasta 2 litros.
- Ajustar el pH a 7,4 - 7,6 con 1N de NaOH usando papel de pH de rango corto o un potenciómetro. (Tenga cuidado de lavar el electrodo del potenciómetro solamente con agua

destilada estéril (autoclavada) para evitar una posible contaminación con leptospiros saprofitas del agua).

Medio basal (20 litros)

- Disolver 20 g de Na_2HPO_4 ; 6 g de KH_2HPO_4 , 20 g NaCl en 2 litros de agua destilada (Use un frasco de 5 litros)
- Agregar 20 ml de solución madre de cloruro de amonio (NH_4Cl) y 20 ml de solución madre de vitamina B1 (tiamina).
- Agregar agua destilada para un volumen total de 4 litros
- Transferir 1 litro a cada uno de los 4 frascos de 5 litros
- Agregar 4 litros de agua destilada a cada uno de los cuatro frascos.
- Ajustar el pH a 7,4 con 1N NaOH en el anterior.
- Autoclavar por 30 minutos a 121 °C.

Medio completo: Consiste en 18 litros de medio basal y 2 litros de suplemento de albúmina ácido graso (AFAS), dando un total de 20 litros.

Filtración: Se usa un filtro Millipore o Seitz (0,22µm). Por ejemplo, se puede usar un soporte de filtro tipo 316 de Millipore, diámetro 142 mm, en combinación con un vaso regulador de presión de 20 litros.

Coloque un filtro Millipore de 0,22 µm tipo GSWP 14200 (la parte brillante del filtro hacia arriba) seguido por una gasa tipo AP 3212400 y un filtro Millipore de 0,45 µm tipo HAWP 14200 en la base del soporte. Dos prefiltros de fibra de vidrio se colocan arriba de este filtro. Todos los filtros se empapan con agua destilada y el sistema de filtro se esteriliza por autoclavado. La elección final de los filtros dependerá del medio y de la cantidad a ser filtrada.

Enriquecimiento: Agregar, asépticamente, suero de conejo y/o suero fetal bovino al medio de EMJH para obtener una concentración final de 1 - 4% (v/v).

Medio selectivo: Agregue 5-fluorouracil asépticamente al medio EMJH para una concentración final de 0,01 - 0,04%

Control de calidad

Se lleva a cabo como sigue:

- Revisar la ausencia de leptospiros saprofitas y otros contaminantes. El medio se deja por una semana a 30 °C, una semana a 37 °C y dos semanas a temperatura ambiente. Si el medio se pone turbio, revisar microscópicamente y descartarlo si se encuentra contaminado.
- Control positivo: Inocular una alícuota de medio a 1:10 v/v con cultivo de *Leptospira*, incubar y revisar crecimiento después de una semana.
- Si se agrega suero de conejo o suero fetal bovino para enriquecer el medio, éstos deben ser revisados por MAT para detectar anticuerpos contra leptospiros. Los sueros deben resultar negativos.

A 16.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO FLETCHER

Este es un medio semisólido, apropiado para cultivar *Leptospira* y mantenerlas viables por un período largo de tiempo sin subcultivar. Este medio se prepara agregando suero de conejo al medio base de Fletcher.

A 16.5.1 Requerimientos

Reactivos químicos: Se requiere lo siguiente: Na_2HPO_4 , p.ej. Merck 1.06586.0500; KH_2PO_4 , p.ej. Merck 1.04873.1000; NaCl, p.ej. Merck 1.06404.1000; Bacto Peptona, p.ej. Difco 0118; Extracto de carne, p.ej. Difco 0126; Agar Noble, p.ej. Difco 0142.

Solución madre: Se requieren dos soluciones madre, a saber: (1) solución de fosfato A: disolver 11.876 g de Na_2HPO_4 , en 1 litro de agua destilada; y (2) solución de fosfato B: disolver 9.078 g de KH_2PO_4 en 1 litro de agua destilada. Las dos soluciones tampón se autoclavan por 30 minutos a 121 °C y pueden ser almacenadas a 4 °C por varios meses.

Suero de conejo: Este debe ser revisado con la MAT para la presencia de anticuerpos antileptospiras. El resultado de la MAT debe ser negativo.

A 16.5.2 Método

Medio base de Fletcher

Se prepara como sigue:

- Disolver los siguientes reactivos en 820 ml de agua destilada: 0,3 g de Bacto Peptona; 0,5 g de NaCl; 0,2 g de Extracto de carne; 1,5 g de Agar Noble.
- Agregar 80,8 ml de solución madre de solución de fosfato A y 19,2 ml de solución madre de solución de fosfato B.
- Mezclar minuciosamente.
- Ajustar a pH 7,6 - 8,0 usando 1N NaOH.
- Autoclavar
- Después de autoclavar, pero antes que el medio se enfríe, agitar vigorosamente la botella. Es necesario prevenir que el agar se asiente en el fondo de la botella.
- Guardar a 4 °C o fraccionar en tubos cuando aún está a 50 °C.

Preparación del medio final

El procedimiento es como sigue:

- Recoger el suero de conejo preferiblemente con muy pocos glóbulos rojos. Alternativamente, se puede usar suero de conejo comercial, sin células sanguíneas lisadas.
- Inactivar el suero por 30 minutos a 56 °C en baño María
- Cuando el medio base de Fletcher ha sido guardado a 4 °C, calentar a 50 °C.
- Agregar 80 ml de suero de conejo a 920 ml de medio
- Fraccionar el medio de Fletcher en tubos en volúmenes de 4-5 ml.
- Guardar el medio a 4 °C hasta usarlo.

Control de calidad: Incube una alícuota de medio Fletcher con un cultivo de *Leptospira* y revise el crecimiento después de una semana de incubación a 30 °C.

A 16.6 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE KORTHOFF-BABUDIERI

Este es un medio líquido apropiado para el cultivo de *Leptospira*. Su formulación es una modificación del medio original de Korthof. Se prepara agregando suero de conejo al medio basal de Korthof-Babudieri, siendo utilizado en el Centro Nacional de Leptospirosis en Roma para mantener la colección de las cepas de *Leptospira*. Su formulación requiere Peptona Proteose No. 3- Difco (en lugar de Peptona Witte) y vitamina B3 (nicotinamida) en lugar de vitamina B1, pero no requiere CaCl_2 .

Es esencial usar agua destilada estéril (autoclavada), porque la preparación final puede sólo ser filtrada y las leptospiras, incluyendo las saprofitas contaminantes, pueden pasar a través del filtro.

A 16.6.1 Requerimientos

Se requiere lo siguiente:

Material: Frascos de 3 litros (x2); frasco de 250 ml (x1); probeta de medición de 1 litro (x1); probeta de medición de 100 ml (x1); embudo (x1); pipetas de 5 ml; pipetas de 1 ml; tubos; filtros Millipore (0,22 µm); papeles de filtro (Whatman No.1 o equivalente); balanza analítica; centrífuga; incubadora (30°C), baño María; pH metro.

El electrodo del pH debe ser enjuagado con agua destilada estéril (autoclavada) para evitar posibles contaminaciones con leptospiras saprofitas.

Reactivos: Peptona Proteasa No. 3, Difco; NaCl; NaHCO₃; KCl; KH₂PO₄; Na₂HPO₄; Na₂HPO₄·2H₂O; Vitamina B3 (nicotinamida); suero de conejo; células de sangre lisadas; vitamina B12 (cianocobalamina).

A 16.6.2 Método

Medio basal de Korthof

Se prepara como sigue:

- Disolver los siguientes componentes en 900 ml de agua destilada estéril (use un frasco de 3 litros):
 - 0,80 g peptona proteasa No. 3 (Difco); 1,40 g NaCl; 0,02 g NaHCO₃; 0,04 g KCl;
 - 0,18 g KH₂PO₄; 0,96 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0.001 g de vitamina B3 (nicotinamida).
- Mezclar lo anterior y agregar agua destilada estéril hasta 1 litro.
- Autoclavar por 20 minutos a 121 °C.
- Enfriar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Pasar por papel de filtro (Whatman No.1 o su equivalente).
- Verificar el pH (el pH final del medio debe estar en el rango de 7,2 – 7,4).
- Autoclavar por 30 minutos a 116 °C.

Suero de conejo

- Recoger el suero de conejo (puede usar suero comercial de conejo). Debido a que puede existir variación de un animal a otro, se recomienda usar una mezcla de sueros de conejos (obtenidos de animales con una dieta libre de antibióticos).
- Revisar por MAT la presencia de anticuerpos contra leptospiras. Los resultados de la MAT deben ser negativos.
- Inactivar el suero por 120 minutos a 56 °C en baño María.
- Centrifugar a alta velocidad (22 000 g por 30 minutos) para remover residuos celulares.
- Esterilizar el sobrenadante por filtración usando un filtro Millipore de 0,22 µm.
- Fraccionar el suero de conejo en volúmenes de 30 ml en tubos; guarde a -70 °C hasta su uso.

Células sanguíneas lisadas

- Recoger 5 ml de sangre de conejo (de un animal seronegativo y libre de dietas con antibióticos) en un frasco de 250 ml conteniendo esferas de vidrio.
- Mezclar agitando suavemente por 10 - 15 minutos para remover la fibrina.

- Agregar 10 ml de agua destilada estéril, mezclar y dejar toda la noche a 4 °C.
- Centrifugar a alta velocidad (22 000 g por 30 minutos) para remover residuos celulares.
- Esterilizar el sobrenadante por filtración usando un filtro Millipore de 0,22 µm.
- Reparta el sobrenadante en volúmenes de 2 ml en tubos; guarde a -70 °C hasta su uso.

Vitamina B12

- Disolver 100 mg de vitamina B 12 en 10 ml de agua destilada pH 4,5 (usar agua destilada estéril y ajustar su pH a 4,5 con 1N HCl).
- Esterilizar por filtración con un filtro Millipore de 0,22 µm.

Preparación del medio final

- Agregar al medio basa de Korthof lo siguiente: 60 ml de suero de conejo estéril e inactivado por calor; 2 ml de células sanguíneas lisadas estériles e inactivadas por calor; 0,1 ml de solución madre de B12 estéril.
- Esterilizar por filtración con un filtro Millipore de 0,22 µm.
- Repartir el medio Korthof en volúmenes de 4-5 ml en tubos.
- Tindalizar por tres veces de 60 minutos a 56 °C.
- Almacene el medio a 4°C hasta su uso.

Control de calidad

- Verificar la ausencia de leptospiras saprofitas. El medio se deja 1 semana a 30 °C y 2 semanas a temperatura ambiente. Si el medio muestra turbidez, revise microscópicamente y, si se encuentra contaminación, se debe desechar.
- Control positivo: inocular e incubar (30 °C) una alícuota de medio Korthof 1:10 con un cultivo de *Leptospira* y revisar el crecimiento después de una semana.

REFERENCIAS

Bey, R.F. Johnson Research coordinator. Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infection and immunity*, 19:562-259, 1978.

Ellinghausen, H.C., McCullough, W.G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: A serum-free medium employing oleic albumin complex. *American Journal of Veterinary Research*, 26:39-44, 1965 (a).

Ellinghausen, H.C., McCullough, W.G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *American Journal of Veterinary Research*, 26:45-51, 1965 (b).

Ellinghausen, H.C., McCullough, W.G. Albumin fatty acid broth for *Leptospira*, modified by Johnson and Harris. *Journal of Bacteriology*, 94:27-31, 1967.

Ellis, W.A., Little, T.W.A., Eds. The present state of leptospirosis diagnosis and control. Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff publishers, 1986.

Shenberg, E. Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *Journal of Bacteriology*, 93:1598-1606, 1967.

Bibliografia

Babudieri, B. Growth of pathogenic leptospirosis. In: *Trattato di malattie infettive*. Napoli, Edizioni Scientifiche Italiane, Vol. 3: 785-856, 1952.

Babudieri, B. Proposed standardization of the agglutination- adsorption test for *Leptospira*. *Bulletin of the World Health Organization*, 44:795-810, 1971.

Ellinghausen, H.C. Some observations on cultural and biochemical characteristics of *Leptospira Pomona*. *Journal of Infectious Diseases*, 106:237-244, 1960.

Faine, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No. 67, 1982.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, MedSci, 1999.

Korthof, G. Experimentelles Schlammfieber beim Menschen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und infectionskrankheiten*. I. Abteilung Originale, 125:429-434, 1932.

Levett, P.H. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326, 2001.

Staneck, J.L., Henneberry, R.C., Cox, D. Growth requirements of pathogenic leptospires. *Infections and Immunity*, 7:886-897, 1973.

Thiermann, A.B. Use of solid medium for isolation of leptospires of the Hebdomadis serogroup from bovine milk and urine. *American Journal of Veterinary Research*, 42:2143-2145, 1981.

Turner, L.H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, 64:623-646, 1970.

Vaneseltine, W.P., Staples, S.A. Nutritional requirements of leptospires. I. Studies on oleic acid as a growth factor for a strain of *Leptospira Pomona*. *Journal of Infectious Diseases*, 108:262-269, 1961.

Wolf, J. The laboratory diagnosis of leptospirosis. Springfield, IL, Charles C. Thomas, 1954.

Wood, J., Johnson, R.C., Palin, K. Surface colonies of *Leptospira interrogans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13:102-105, 1981.

ANEXO 17

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para trabajar con leptospiras se requieren los procedimientos estándar 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 cuál 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.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Existe una vasta literatura sobre leptospirosis. Se sugieren algunas literaturas generales sobre leptospirosis. Hay muchas referencias y bibliografías en los Anexos con temas especiales, pero la lista no es exhaustiva.

Ellis, W.A., Little, T.W.A., Eds. *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff, 1986.

Everard, J.D., Everard, C.O.R. Leptospirosis in the Caribbean. *Reviews in Medical Microbiology*, 4:114-122, 1993.

Faine, S. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No.67), 1982.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, MediSci, 1999.

Leptospirosis worldwide *Weekly Epidemiological Record*, 74(29): 237-242, 1999.

Levett, P.N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326, 2001.

Office International des Epizooties. *Manual of standards for diagnostic test and vaccines*. 3rd ed., Paris, Office International des Epizooties:198-206, 1996.

Postic, D., Merien, F., Perolat, P., Baranton, G. *Diagnostic biologique leptospirose – borréliose de Lyme [Biological diagnosis leptospirosis- Lyme borreliosis]*. 2nd ed. Paris, Institut Pasteur, Collection des Laboratoires de Référence et d'Expertise, 2000.

Schönberg, A., Muller, F., Weber, A., Fingscheidt, E., Brem, S., Seeliger, H., Schaal, E. Diagnostik bei Leptospirosen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A258:480-491, 1984.

Sehgal, S.C. Leptospirosis on the horizon. *National medical Journal of India*, 13(5): 228-230, 2000.

World Health Organization *Report of the WHO Consultation on the Development of National Programmes for the Prevention and Control of Leptospirosis, Sapporo, Japan, July 15-16, 1984*. Geneva (unpublished document WHO/CDS/VPH/86.62, 1986. Available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva, Switzerland).

World Health Organization *Report of Discussions of the WHO Working Group on Leptospirosis Vaccine Development and Vaccinology, Nagoya, Japan, March 26-27, 1993*. Geneva (unpublished document VPH/93.122, 1993. Available from: department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva, Switzerland).

LISTA DE COLABORADORES

Autor Principal

Dr. W.J. Terpstra, WHO/FAO Collaborating Centre For Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

Colaboradores

Prof. B. Adler, Bacterial Pathogenesis Research Group, Department of Microbiology, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia.

Dr. J. Ananyina, Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology-RAMS, Gamaleya Street 18, 123098, Moscow, The Russian Federation.

Prof. G. André-Fontaine, Unité Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospire, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, B.P. 40706, F-44307 Nantes cedex 03, France

Dr. V. Ansdell, Kaiser Medical Center, 3288 Moanalua Road, Honolulu, HI 96819, USA

Dr. D.A. Ashford, Chief Zoonoses Unit, Meningitis and Special Pathogens Branch, DBMD, CDC, MS-C09, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA.

Prof. P. Bakos, Medical Faculty Comenius University, Faculty of Epidemiology, Spitalska 24, 81108 Bratislava, Slovakia.

Dr. G. Baranton, Institut Pasteur, Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, 28 rue du Dr Roux, F-75724 Paris cedex 15, France.

Dr. A. Barnea Department of Epidemiology, Israel Institute for Biological research (IIBR), P.O. Box 19, Ness Ziona 70450, Israel.

Dr. C.A. Bolin, Animal Health Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, A3A Veterinary Medical Center, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.

Dr. L. Ciceroni, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Centro Nazionale per le Leptosirosi (National Centre for Leptospirosis), Viale Regina Elena 299, I-00161 Rome Italy.

Dr. M. Cinco, Dipartimento Scienze Biomediche, Università degli Studi di Trieste, Via Fleming 22, I-34127 Trieste, Italy

Dr. T.J. Coleman, Director, Public health Laboratory Service, Leptospira Reference Unit, County Hospital, GB-Hereford HR 12ER, United Kingdom.

Dr. M. Collares Pereira, Unidade de Leptospire e Borreliose de Lyme, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira 96, P-1349-008 Lisboa, Portugal.

Dr. C. Edwards, Gastro-enterologist, Department of medicine, Queen Elizabeth Hospital, St-Michael, Barbados.

Prof. W.A. Ellis, Department of Agriculture and Rural Development Northern Ireland, Veterinary Sciences Division, Stoney Road, Stormont, Belfast, Northern Ireland BT43SD, United Kingdom.

Prof. S.B. Feresu, University of Zimbabwe, department of Biological Sciences, Mount Pleasant, P.O. box mp 167, Harare Zimbabwe.

Dr. Takao Fujikura, 15-10, 7-Chome, Tokiwa, Urawa-City, Saitama 336, Japan.

Dr. L. Gonzalez – Salas, National Reference center for Virology and Leptospirosis, National Institute for Investigation in Nutrition and Health, Inciensa, Ministry of Health, Apartado 4-2250 Tres Rios, Costa Rica.

Dr. R.A. Hartskeerl, Head WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

Mr. H. Korver (Q.E.P.D.) WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

Prof. P.N. Levett, WHO Collaborating Center on Leptospirosis, Center for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases, 1600 Clifton Road NE, Atlanta GA 30333, USA.

Dr. T. Masuzawa, Department of Microbiology, University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences, 52-1 Yada, Shizuoka-Ken 422-8526, Japan.

Prof. M.A. Muthusethupathi, Department of Nephrology, Madras Medical College of Tamilnadu, Government General Hospital, 14 First Street, North Gopalapuram, Chennai 600086 Tamilnadu, India.

Dr. M.M. Pereira, Senior Researcher, Head of the Bacteriology Department, National Reference Center for Leptospirosis, Department of Bacteriology, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, CEP 21045-900-Manguinhos Rio de Janeiro, Brazil.

Dr. P. Perolat, Director, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, Leptospira Laboratory, B.P. 61, 9-11 Paul Doumer Street, 98845 Noumea cedex, New Caledonia.

Dr. I. Saint-Girons, Vice-President for Scientific Assesement, Vice-President for Teaching, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, F-75724 Paris cedex 15, France.

Dr. D.M. Sasaki, Zoonoses Section, State of Hawaii, Department of Health, Epidemiology branch, P.O. Box 3378, Honolulu HI 96801, USA.

Dr. A. Schönberg, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Diedersdorfer Weg 1, Postfach 480447, D- 12277 Berlin, Germany.

Prof. S.C. Sehgal, National Leptospirosis reference Center, Regional Medical Research Centre, Indian Council of Medical Research, P.O. Bag No. 13, Port Blair 744101, Andaman and Nicobar Islands, India.

Prof. Manhua Shi (Q.E.P.D.) Department of Leptospirosis, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, P.O. Box 5, Changping, Beijing 102206, China.

Dr. H.L Smits, Molecular Biologist, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NI-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

Dr. S.P. Smits, WHO/FAO Collaborating centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NI-1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

Dr. L.D. Smythe, Supervising Scientist, WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Western Pacific region, Queensland Health Scientific Services, 39 Kessels Road, Coopers Palms, Queensland 4108, Australia.

Dr. R.A. Spiegel (Q.E.P.D.), Program for Appropriate Technology in Health (PATH/CVP), Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program, 4 Nickerson Street Seattle, WA 98109-1699, USA.

Prof. Xiguao Jiang, Head of department of Leptospirosis, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, P.O. Box 5, Changping, Beijing 102226, China.

Prof. Yasutake Yanagihara, Emeritus Professor of University of Shizuoka 7-18-15 Sena, Shizuoka-Shi 420-0911, Japan.

Dr. R.L. Zuerner, Lead Scientist, Spirochete Diseases, National Leptospirosis Reference Center, U.S. Department of Agriculture / ARS, National Animal Disease Center, Zoonotic Diseases Research Unit, P.O. Box 70, Ames, IA 50010, USA.

Secretariado

Dr. P. Braam, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

Dr. O. Cosivi, (Secretaría del grupo), Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

Traducción al español

Dra. Claudia M. E. Romero Vivas, Grupo de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Departamento de Medicina, Universidad del Norte, K. 5 Vía Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia

Dra. Bibiana N. Vanasco, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Emilio Coni", Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS); Blas Parera. 8260, Santa Fe, Argentina.

Dra. Piedad Agudelo Flórez, Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Carrera 43 A # 52 Sur-99, Sabaneta, Colombia

Dra. Saskia Hendrickx, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

Dr. Alejandro López Inzaurrealde, Unidad de Salud Pública Veterinaria, Organización Panamericana de la Salud, Av. Pres. Kennedy 7778, Duque de Caxias, RJ, Brasil.