

LEPTOSPIRAS
Y
LEPTOPIROSIS
en Argentina

Linzitto Oscar
Stanchi Nestor

Con la colaboración de:
Bibiana Brihuela, Diego Passaro, Analía Soncini,
Mercedes Gatti, María del Luján Tunes,
Beatriz Del Curto, Lorena Martín

Linzitto, Oscar Roberto

Leptospiras y leptospirosis en Argentina. - 1a ed. - La Plata : el autor, 2014.
E-Book.

ISBN 978-987-33-5783-1

1. Microbiología. 2. Leptospirosis. I. Título
CDD 616.01

Fecha de catalogación: 12/08/2014

IMPRESO EN ARGENTINA
PRINTED IN ARGENTINA

Hecho el depósito que marca la ley 11.723

Todos los derechos reservados. Este libro o cualquiera de sus partes no podrá ser reproducido, copiado, ni archivado en sistemas recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por ningún medio, ya sean mecánicos o electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el permiso previo de los Editores.

Derechos Reservados de la tercera edición por:
©2013

Esta edición digital se terminó en el mes de Junio de 2013.

Diseño: Dr. Nestor Oscar Stanchi

Impreso en: Copiplat. 47 n 307 (B1900AJM) La Plata, Argentina.

Los editores no se hacen solidarios con los conceptos vertidos en este libro. Los nombres comerciales y marcas registradas así como sus dosis indicativas mencionadas en esta obra, no significan de ninguna manera recomendación por parte de los autores ni de los editores, sino que son sólo ejemplos para una mejor descripción de la información. Asimismo las prescripciones de drogas y dosificaciones de los fármacos han sido aconsejadas por la bibliografía científica pero no necesariamente cuentan con la autorización oficial para su uso terapéutico con que se indican en las distintas partes de la obra.

***LEPTOSPIRAS
Y
LEPTOPIROSIS
en Argentina***

Linzitto Oscar
Stanchi Nestor

Con la colaboración de:

Brihuega, Bibiana
Passaro, Diego
Soncini, Analia
Gatti, Mercedes
Tunes, María del Luján
Del Curto Beatriz
Martín Paula Lorena

PROLOGO

La leptospirosis como enfermedad zoonótica representa un desafío de muchos médicos y veterinarios en lograr un diagnóstico clínico. La mayoría de las veces sólo el diagnóstico de laboratorio es el que en definitiva define el caso. Sin embargo uno de los problemas de los clínicos es justamente encontrar laboratorios que realicen alguna de las pruebas que aporten datos para definir la clínica. Las leptospiras son microorganismos difíciles de cultivar, aislar y mantener en el laboratorio; además la técnica de referencia es de realización tediosa y cara, esto lleva a que numerosos intentos de brindar el servicio de diagnóstico de leptospirosis fallen a poco de comenzar.

Intentamos en este material poner alguno de los aspectos principales del diagnóstico de la leptospirosis tanto para humanos como para animales.

Oscar Linzitto

Nestor Stanchi

Editores

Leptospiras y Leptospirosis

Introducción

Generalidades

Etiología

Características Del Género

Aspectos Clínicos, Fisiopatología E Histopatología

Diagnóstico

Toma De Muestra

Métodos Diagnósticos

Epidemiología:

Introducción A La Bioseguridad

Vacunación

Antibioterapia Y Quimioprofilaxis

Bibliografía

Leptospiras y Leptospirosis

La leptospirosis, es una enfermedad bacteriana reemergente, de distribución mundial con características de zoonosis, que infecta animales domésticos, silvestres y al ser humano, siendo éste un hospedador accidental, que puede adquirir la infección por dos vías diferentes:

A) Directa

- 1) contacto directo con el animal infectado (roedores, perros, cerdos caballos, etc.);
- 2) por vía transplacentaria.
- 3) al tomar contacto con cultivos de *Leptospira* (laboratorios bacteriológicos);

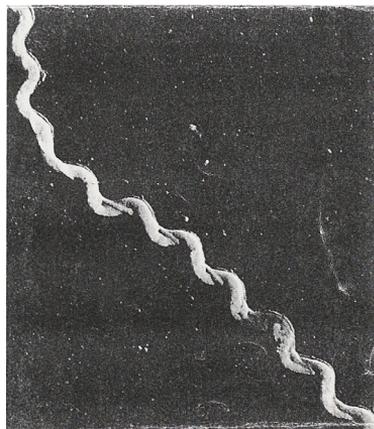
B) Indirecta

- 1) por ingestión de alimentos o agua de bebida contaminados, donde el microorganismo tiene como puerta de entrada el tubo digestivo
- 2) por penetración cutánea, de heridas o escoriaciones.
- 3) a través de mucosas (conjuntival, nasal, vaginal) a partir de lagunas, arroyos, piletas de natación (piscinas) contaminadas, estanques, pantanos, alcantarillas, barro, escombros contaminados con fluidos orgánicos del vector infectado, siendo la orina dentro de estos, el de mayor importancia epidemiológica.

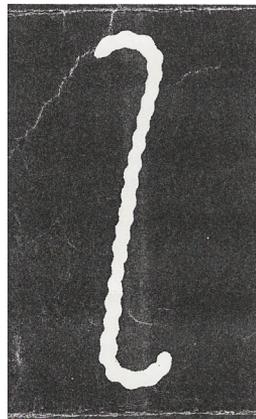
Posiblemente el médico francés Lacereaux en el año 1802, fue quien hizo la primera descripción clínica de la leptospirosis; en el año 1883 Landarouzi describe un caso de hemorragia e ictericia llamando a este cuadro tífus hepático; en 1886 Mathieu en Francia y Weil en Alemania describen síndromes hepato-renales. A comienzos del siglo XX, en 1914, dos médicos japoneses Inada e Ido, logran aislar una bacteria a partir de cobayos infectados con sangre de mineros que presentaban síndrome febril, compromiso hepático renal y hemorragias. Posteriormente los mismos investigadores, obtienen microorganismos similares utilizando sangre de roedores capturados en alcantarillas y desagües y proponen llamar a esta bacteria *Spirochaeta Icterohemorrágica*. En el año 1917, Noguchi propone la ubicación taxonómica de este microorganismo como perteneciente al género *Leptospira*, debido a su morfología espiralada, nomenclatura que hasta hoy conserva.

Generalidades

Si bien la leptospirosis es cosmopolita, la mayor incidencia de esta enfermedad, se produce en zonas cálidas o templadas, con preferencia durante la época lluviosa, afectando sobre todo la sección rural o suburbana, extendiéndose al ejido urbano en casos de inundaciones por la contaminación con aguas servidas, pudiendo producir brotes epidémicos agudos. Cuando no está presente este meteoro, los casos ciudadanos, se limitan en general, a exposición laboral, deportivo recreacional o contacto con animales domésticos y roedores.



Microscopía de leptospiras



La Leptospirosis es una enfermedad infecciosa que afecta al hombre y a los animales. Frecuentemente es transmitida a los humanos a través de agua o tierra contaminada, y por contacto directo con gran variedad de animales infectados.

Esta enfermedad es producida por bacterias (espiroquetas) pertenecientes al género *Leptospira* que comprende 2 especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa*. La primera es patógena para el hombre y los animales, y la segunda es de vida libre, se encuentra en aguas superficiales y raramente se asocia a infecciones en mamíferos. Dentro de las especies patógenas para el hombre existen 25 serogrupos y alrededor de 250 serovares.

Existe consenso generalizado que esta enfermedad es más frecuente en los hombres que en las mujeres, afecta con preferencia a los grupos etarios entre 20 y 45 años y que en los países periféricos, la población que pertenece a los estratos socio económicos bajos, es la más afectada.

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa de relevante importancia en la salud pública y es considerada la zoonosis de mayor distribución mundial producida por leptospiras. Esta enfermedad puede ser transmitida al hombre principalmente por alguna de estas causas: inadecuado manejo sanitario de desechos metabólicos de animales de producción, silvestres y mascotas y/o contaminación de efluentes por desechos animales como orina y heces. Por lo tanto, el punto de partida para la diseminación de la leptospirosis es la **presencia de un portador**.

Estos animales portadores, ya sean animales domésticos o silvestres, eliminan leptospiras con la orina en forma discontinua y por períodos de tiempo variables. De esta manera se efectiviza la infección directa a otros animales, de la misma u otras especies, como así también al hombre.

La leptospirosis es común en el ganado, en los animales de compañía y los animales silvestres. Está presente en los bovinos, búfalos, cabras, ovinos, porcinos, equinos y perros. Las consecuencias de una infección con leptospiras puede producir: nefritis, ictericia, desórdenes reproductivos, abortos, natimortos y debilidad en terneros. En equinos y en pequeños rumiantes puede producir: abortos, mastitis y en porcinos abortos y natimortos.

En el ganado lechero reduce la producción de leche produciendo mastitis, abortos y pariciones prematuras.

Por otro lado los animales domésticos por su contacto con el hombre, también generan brotes de leptospirosis por ende poseen un gran potencial zoonótico.

Desde el punto de vista taxonómico, *Leptospira* pertenece al orden de los Spirochaetales, constituida por dos familias: a) Spirochaetaceae, que incluye a los géneros *Treponema* y *Borrelia*, ambos patógenos para el hombre b) Leptospiraceae con tres géneros: *Leptonema*, *Turnerii* y *Leptospira*, este último con dos especies: *L. interrogans* patógena para el ser humano y animales con más de 200 serovariedades y *L. biflexa* saprófita de vida libre no patógena con más de 60 serovariedades (ver más adelante taxonomía).

La leptospira es un microorganismo delgado y flexible que tiene forma helicoidal, mide de 5 a 20 μm de longitud y 0,1 μm de diámetro. Se dispone al microscopio electrónico (ME) como un cilindro citoplasmático enrollado, revestido por una membrana y dos filamentos axiales independientes que se insertan en forma subterminal en los extremos opuestos del cilindro protoplasmático que no llegan a tocarse en su parte central (importancia taxonómica). Presenta un axostilo espiralado doble que se inserta en las extremidades del cuerpo citoplasmático; la estructura fibrilar está directamente implicada en los movimientos de rotación de la bacteria.

L. interrogans se caracteriza por presentar uno o ambos extremos doblados en forma de signo de interrogación cuando se cultiva en medios líquidos, si bien son poco frecuentes, aquellas formas que carecen del extremo curvado son inmóviles.

Estos microorganismos son catalasa y oxidasa positivos. Su principal fuente de carbono y energía la constituyen los ácidos grasos insaturados de cadena larga. El nitrógeno, también requerido, lo obtienen de las sales de amonio. Tienen la particularidad de no utilizar en forma importante aminoácidos ni hidratos de carbono. Su modo de división es por fisión binaria, por la formación de un tabique en la región central citoplasmática.

La manera más efectiva de visualizarlos es mediante la **microscopía óptica de campo oscuro**, pudiendo también emplearse técnicas de precipitación de sales metálicas o tinciones especiales fundamentalmente en cortes de tejidos. Alternativamente pueden observarse claramente con microscopía de fluorescencia.

El pH óptimo de crecimiento se ubica entre 7,2 a 7,4. Son muy sensibles a los medios ácidos, por este motivo se inactivan rápidamente en la orina ácida y dado que este fluido se puede utilizar para su aislamiento se debe tener la precaución de neutralizarla. Pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en agua dulce, hasta 6 meses, mientras que en agua salada mueren rápidamente. Tienen una sobrevida alta en los suelos húmedos ligeramente alcalinos, no siendo así en los secos. Son sensibles al calor y frío extremos, como así también a los antisépticos y desinfectantes utilizados comúnmente.

Clasificación:

Si bien la familia Leptospiraceae **serológicamente** se divide en dos especies, *L. interrogans* y *L. biflexa*, teniendo en cuenta características genéticas y utilizando técnicas de hibridación DNA-DNA, en la actualidad pueden reconocerse hasta 20 especies de leptospiras cuya significación patógena todavía está en estudio.

La unidad fenotípica de clasificación es la **serovariedad** o **serovar**, la cual toma como base la especificidad de los antígenos O superficiales (lipopolisacáridos de membrana externa) de la bacteria. Los **serovares** se pueden agrupar en serogrupos de acuerdo a su reactividad antigénica cruzada.

Síntomas:

Los síntomas que acompañan a la enfermedad son por lo general de aparición brusca y comienzan con fiebre, mialgias y cefaleas.

A pesar de la posibilidad de complicaciones severas la enfermedad es a menudo autolimitada y no fatal. En estos casos la respuesta inmuno-sistémica elimina al agente infeccioso sin dejar secuelas de la enfermedad.

En casos graves luego de atravesar la piel o mucosas, el microorganismo se multiplica en sangre llamándose a esta etapa **leptospiemia** (equivalente a septicemia), distribuyéndose por todo el organismo afectando principalmente hígado y riñón. En ocasiones el pulmón también se ve comprometido con una neumonía grave con sangrado pulmonar.

El cuadro clínico es muy variado, y por lo general, su diagnóstico tiende a confundirse con otras enfermedades infecciosas agudas como el dengue, la influenza, Hantavirus, Paludismo y las hepatitis víricas.

La OMS ante el nuevo panorama que presentan las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, propuso modificar el sistema de vigilancia internacional, introduciendo el concepto de vigilancia sindrómica, la cual se define como vigilancia de un número de enfermedades que tienen similitudes de signos y síntomas, fisiología común y etiología diferente.

El objetivo consiste en detectar rápidamente la presencia de brotes de estas enfermedades que pueden ocasionar daños en la salud pública.

ETIOLOGÍA

El término “leptospira” procede del griego *lepto* (fino) y *spira* (espiral). Las Leptospiras son espiroquetas aerobios obligados, flexibles, muy finos, helicoidalmente enrollados y de gran movilidad. Miden de 5 a 20 μm de largo por 0,1 a 0,5 μm de ancho. Los extremos son semicirculares y en forma de gancho. En ocasiones, uno de los extremos está doblado y el otro se mantiene recto, muy raramente puede tener ambos extremos rectos (generalmente inmóvil). Poseen un movimiento activo flexuoso de rotación, ondulatorio, que depende de dos flagelos periplasmáticos (filamento axial), los cuales están insertados en ambos extremos de la bacteria. Son agentes tan finos que pueden pasar filtros que retienen otras bacterias (0,2- 0,45 μm).

Las Leptospiras solo pueden ser visibles por microscopía de campo oscuro o pobremente en contraste de fase, pero no por microscopía de luz de campo brillante.

No se tiñen con facilidad con los colorantes de anilina aunque son **gramnegativos**. La gramnegatividad está determinada por poseer membrana de envoltura externa y por el doble anillo de inserción flagelar. Por otro lado pueden impregnarse por plata, teñirse por fluoresceína, peroxidasa conjugada más reactivos coloreados o por hibridación del ADN con reactivos biotina–avidina (DAB). Particularmente en leptospira se había descubierto la presencia de **plásmidos**, pero estudios posteriores indicaron que el mismo era un **segundo cromosoma** de menor tamaño ya que es indispensable para la sobrevivencia del microorganismo.

En medio de cultivo líquido, el movimiento de las Leptospiras es de rotación rápida sobre su eje longitudinal. En medios semisólidos, el movimiento es en serpentina y horadación y en medios sólidos, si bien crecen mal y no se usan en la práctica, reptan por la superficie.

Al microscopio electrónico se observa que están constituidas por: **una membrana externa** o envoltura (lípidos, proteínas, LPS), de gran importancia antigénica, que rodea la pared celular de peptidoglucano, dos **flagelos periplasmáticos** (filamentos axiales o endoflagelos) situados entre la membrana externa y la pared celular fijos en ambos extremos de la bacteria, cuyos extremos libres se extienden hacia la parte media y no se superponen, un **cilindro protoplasmático** de forma helicoidal con el contenido celular, material nuclear, ribosomas, mesosomas y cuerpos de inclusión celular. La capa de peptidoglucano está asociada con la membrana citoplasmática en vez de la membrana externa, algo que es único de las espiroquetas.

Los cuerpos basales flagelares semejan los de las bacterias gramnegativas, con la excepción de *L. illini*, una especie de ubicación incierta (*incertae sedis*), los cuales son similares a los de las bacterias grampositivas. La denominación de esta especie está basada en que el cuerpo basal del flagelo periplasmático que es similar a los de las bacterias grampositivas y a que poseen un mechón de túbulos citoplasmáticos, presentes en *Treponema* pero no en *Borrelia*.

Estos agentes poseen actividad oxidasa, catalasa, peroxidasa y esterasa; en condiciones de laboratorio crecen en medios de cultivo simples a un pH de 7,2 - 7,6 y una temperatura de 15-18 °C utilizando los ácidos grasos de cadena larga (Tween o polisorbato) como fuente de carbono y las sales de amonio como fuente de aminoácidos, metabolizados por Beta oxidación. También estos medios son enriquecidos con vitaminas B1 y B12 que estimulan el crecimiento. Además, necesitan fósforo y algunos iones metálicos durante un período de incubación entre 4-14 días, aunque para determinadas cepas o serovares puede ser superior a cuatro semanas. El piruvato

puede estimular el inicio del crecimiento en el caso de algunas cepas fastidiosas.

Cultivo

Los medios de cultivo pueden presentarse de tres formas: líquido, semisólido y sólido; aunque este último es de muy poco uso.

Desde el punto de vista de su desarrollo *in vitro*, la leptospira se cultiva en medios artificiales como los de Fletcher, Korthoff, Schuffner y Tween 80 albúmina entre otros, siendo la base de éstos, suero de conejo, peptona, sales de sodio, amonio, potasio, calcio y magnesio, agar y caldos simples, ya sean semisólidos o líquidos. El tiempo de incubación es largo, ya que en algunos casos puede superar los 60 días. Como métodos de crecimiento y recuperación alternativos, se pueden utilizar huevos de gallina embrionados inoculados en membrana corioalantoidea o cultivos celulares de fibroblastos.

Los medios sólidos (Cox) son en general de uso mucho menos frecuente que los anteriores ya que normalmente no desarrollan bien con altas concentraciones de agar.

La mayoría de los medios líquidos (Korthoff, Stuart, Ellinghausen y McCullough, modificado por Johnson y Harris -EMJH-) son habitualmente utilizados para el mantenimiento de cepas utilizadas en las pruebas serológicas. El medio semisólido (Fletcher) resulta adecuado para el mantenimiento de cepas de referencia.

Las leptospiras patógenas de aislamientos recientes, son más cortas y compactas y sus movimientos más rápidos que aquellas leptospiras que ya han sido subcultivadas. Las leptospiras giran alrededor de su eje y progresan en ambas direcciones. Luego de varios subcultivos, las cepas patógenas suelen perder la patogenicidad.

Características del Género

- No crece en medios de cultivo comunes.
- Temperatura óptima de incubación: 28-30 °C.
- Aerobio estricto.
- Observación microscópica: con condensador de campo oscuro (160x) o microscopio de contraste de fase.
- Movimientos: rotación, flexión y traslación.
- Posee los tres caracteres comunes a todas las espiroquetas:
 - . movilidad debida a un aparato locomotor interno,
 - . flexibilidad,
 - . disposición helicoidal.

Requerimientos Nutricionales

Son únicos y simples: necesita ácidos grasos de cadena larga (18 C₂) como fuente de C₂; sales de amonio como fuente de N₂ y vitamina B₁ (tiamina) y B₁₂ (cianocobalamina).

NOMENCLATURA, TAXONOMIA Y CLASIFICACION

La leptospirosis es producida por bacterias que se agrupan dentro del Orden *Spirochaetales*, Familia *Leptospiraceae*, Género *Leptospira*.

Dentro de este género hay actualmente dos clasificaciones taxonómicas de las especies de leptospirosas basadas en sus diferencias o características fenotípicas o genómicas.

Especies del género *Leptospira*

A) Clasificación fenotípica:

Leptospira interrogans (patógena) *sensu lato*:

Leptospira biflexa (saprófita)

B) Clasificación genotípica:

17 genomoespecies diferentes

Según la clasificación serológica o fenotípica hay más de 225 serovares. Las pruebas de aglutinación microscópica y el test de absorción y aglutinación cruzada son usados para la clasificación de leptospirosas a nivel de serovariedad.

Los serovares serológicamente relacionados son agrupados funcionalmente en serogrupos y el taxón básico es el serovar.

Las especies del género *Leptospira* han sido reclasificadas tomando como base los estudios de ADN. Es por esto que la clasificación fenotípica de leptospirosas está siendo reemplazada por la genotípica, en la cual un número de genomoespecies incluyen todas las serovariedades de ambas, *L. interrogans* y *L. biflexa*, habiéndose demostrado heterogeneidad genética.

Las especies de leptospirosas aisladas de animales y humanos fueron diferenciadas en base a estudios del ADN llamándolas *L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. alexanderi*.

El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica (CDC) ha definido 16 genomoespecies de leptospirosas incluyendo aquellas descritas previamente y agregó cinco nuevas genomoespecies, una de las cuales fue llamada *L. alexanderi*. Fueron también descritas otras especies como *L. fainei* que contiene una nueva serovariedad: *hurstbridge*.

Las genomoespecies de *Leptospira* no corresponden a las dos especies previas (*L. interrogans* y *L. biflexa*).

En la tabla 1 vemos las especies o genomoespecies y la distribución de serogrupos.

*Han sido aceptadas tres genomoespecies de leptospirosas patógenas (1,4 y 5) y una de saprófitas (3) Reunión de la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS), Quito 2007
Estos grupos no tenían nombres en la publicación original de Brenner et al. , 1999.

Tabla 1. Clasificación de *Leptospira**

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

El Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* consideró que para no crear confusión en la literatura se debía regularizar el estatus taxonómico y propuso que las genomoespecies podrían llamarse:

Genomoespecie 1, cepa tipo 79601^T: *L. alstonii*

Genomoespecie 4, cepa tipo H 2^T: *L. terpstrae*

Genomoespecie 5, cepa tipo Sao Paulo^T: *L. yanagawae*

Genomoespecie 3, cepa de referencia Waz Holland^T (P438): *L. vanthielii* (Levett P. N., 2008).

La serovariedad Hardjo, perteneciente al serogrupo Sejroe fue analizada con endonucleasas de restricción y se apreciaron diferencias entre distintos aislamientos, sugiriéndose su diferenciación en dos genotipos: Hardjoprajitmo y Hardjobovis. Las cepas aisladas de humanos, ovinos y ciervos en Nueva Zelanda y de bovinos en Norteamérica presentaron patrones de ADN similares entre sí pero se diferencian de la cepa tipo original (Hardjoprajitmo). Estas cepas han sido designadas como genotipo Hardjobovis.

La clasificación genética refleja estas diferencias ya que el genotipo Hardjobovis se adscribe a la genomoespecie *L. borgpetersenii*, mientras que el genotipo Hardjoprajitmo se adscribe a la genomoespecie *L. interrogans*.

ASPECTOS CLÍNICOS, FISIOPATOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA

Desde el punto de vista clínico, la infección por leptospira en el humano, puede presentar un conjunto de signos y síntomas muy amplios, los cuales suelen ser comunes a otras enfermedades infecciosas, complicando a veces arribar a un diagnóstico certero, obligando a utilizar técnicas de rastreo serológico y cultivos bacteriológicos para lograr tal fin.

Como en toda enfermedad infecciosa, la importancia del cuadro clínico y su posterior evolución, va a depender de varios factores: funcionalidad del sistema inmunocompetente del hospedador, patogenicidad, virulencia y dosis infectiva mínima del agente etiológico.

La leptospirosis es una enfermedad con evolución monofásica o bifásica desde el punto de vista sintomático y fisiopatológico.

La **monofásica** es benigna y generalmente se manifiesta por un síndrome seudogripal que cede entre los 5 a 10 días. La presentación **bifásica** implica, además, la participación franca de otros parénquimas y es de curso más severo. Puede también presentarse en forma icterica o anictérica.

El periodo de incubación oscila entre 2 a 30 días, con una media de 7 a 13 días, luego del cual se inicia la primera fase llamada septicémica (leptospirémica) o invasiva que tiene una duración aproximada de 3 a 10 días produciéndose, en esta etapa, una bacteriemia y comienzo de colonización de los distintos parénquimas incluido en ocasiones el SNC. La presencia de la bacteria en sangre durante este periodo, lo hace ideal para el aislamiento del microorganismo hasta los 5/7 días de comenzados los primeros síntomas.

Cuando la evolución es bifásica, a veces tras un periodo de pseudo mejoría que dura entre 24 a 48 horas, o sin mediar éste, se hacen presentes los signos y síntomas predominantes de el o los órganos blanco. El final de la primera fase está marcado por la disminución cuantitativa en sangre periférica de la bacteria. El comienzo de la segunda fase, coincide con la aparición de las inmunoglobulinas específicas (primero la IgM y luego la IgG) y la presentación de la sintomatología propia de la disfunción de los parénquimas infectados. Esta segunda fase se llama inmunológica o sindrómica.

El comienzo de la enfermedad es brusco, indica el inicio de la primera fase, se caracteriza por presentar cefáleas, escalofríos, fiebre de 38 hasta 40 °C, dolores musculares en ocasiones intensos, dolor abdominal, náuseas, vómitos, astenia y malestar general. A veces puede existir congestión del tracto respiratorio superior, ligera disnea, tos improductiva, dolor torácico, hemoptisis -poco frecuente en este periodo- y procesos congestivos que afectan a la conjuntiva y esclerótica. Existe baja incidencia de poliadenopatias, rash y petequias. La fiebre, puede presentar oscilaciones diarias, pero nunca baja de los 38 °C. La cefalea es predominantemente orbitofrontal y en menor grado occipital o bitemporal.

Las mialgias pueden afectar la región cervical, cuello, paraespinal, abdominal y gemelar en pantorrillas, siendo este último síntoma bastante frecuente y detectable a

la simple presión. Los síntomas musculares, pueden estar acompañados de parestesia cutánea regional y coexistir artralgias.

Las manifestaciones oculares en esta fase son hemorragia sub conjuntival, eritema o hiperemia conjuntival y esclerótico, fotofobia y dolor biocular. Un hallazgo no poco frecuente es la uveítis pero de observación más tardía, a partir de la segunda fase de la enfermedad, pudiendo presentarse transcurridos varios meses, lo mismo que la neuritis óptica e iridociclitis.

También pueden existir, fenómenos hemorrágicos y petequias por capilaritis y trombocitopenia. La alteración estructural y funcional capilar parece ser un evento importante desde el punto de vista de la magnitud de la agresión en el hospedador ya que podría instaurarse un Síndrome de Coagulación Diseminado en los territorios de lesión capilar, con consumo de plaquetas y factores de coagulación a lo que se le podría adicionar, un déficit de producción por parte de un parénquima hepático afectado.

La hepatomegalia, ictericia, náuseas y vómitos, afectan hasta el 50 % de los infectados. El cuadro hepático, se caracteriza por una modificación fundamentalmente de la función excretora biliar, es decir un fenómeno del tipo obstructivo intrahepático, debido a una alteración en la captación, conjugación y excreción de la bilirrubina, lo que provocaría como manifestación primordial, la ictericia que a veces suele ser intensa. Estaríamos entonces frente a una disfunción hepatocelular que involucra a su vez, a las células intracanaliculares de Von Kupffer en su función fagocítica.

Las nefropatías pueden alcanzar porcentajes que rondan el 55 % con un grado de agresión parenquimatosa que va desde lesiones leves del intersticio, con discreta disminución en la actividad renal, hasta cuadros importantes de insuficiencia aguda capaces de producir la muerte.

Una de las causas más importantes, sería la paulatina insuficiencia renal por daño tisular, debido a lesiones endoteliales de glomérulos y túbulos que producirían fenómenos hipóxicos. No se descarta la acción directa del microorganismo (¿efecto citotóxico?), ya que es factible visualizarlo en el interior de las células tubulares, intersticio y glomérulos. En los casos de glomerulonefritis graves, se detecta la presencia de inmunocomplejos circulantes (IgG/IgM) y depósitos de componentes del Complemento (beta C1). Se concluye que por acción bacteriana directa o alteración en la microcirculación, asociada a una reacción inflamatoria, se desencadenarían los eventos patogénicos.

Existe una entidad clínica denominada **Síndrome de Weil**, que se caracteriza por una forma grave de disfunción hepática-renal con una mortalidad que puede alcanzar el 10 %. Se la asoció con la serovar *Icterohaemorrhagiae*, pero luego se comprobó que también pueden producirla otros serovares de leptospiras. Existe un importante compromiso hepático que se manifiesta por marcado dolor en el cuadrante sub costal derecho, acompañado de franca ictericia con el aumento de bilirrubina a expensas de conjugada, transaminasas elevadas hasta seis veces el valor normal, hepatomegalia, esplenomegalia, síntomas gastrointestinales y hemorragias con colapso vascular. El riñón muestra una marcada insuficiencia funcional con indicadores como urea y creatinina elevados. Esta sintomatología puede observarse ya a partir de 4° al 6° día del comienzo de los síntomas, es decir, tienen una expresión temprana.

Cerca del 50 % de los infectados tienen manifestaciones respiratorias que pueden interesar el tracto respiratorio superior o inferior, evolucionando desde una rinitis congestiva o faringitis y tos seca, hasta neumonía con esputo mucoso

hemoptoico, alveolitis difusa, edema, distres respiratorio, con un patrón evolutivo similar a las neumonías atípicas de grave pronóstico. Estas lesiones preferentemente se asientan en zona periférica y bases del pulmón por ser ricas en capilares y presentar activos movimientos durante la función ventilatoria. Es importante señalar que las manifestaciones respiratorias son muy frecuentes de observarlas ya en la fase invasiva.

Alrededor de un 15 % de los infectados presentan síndrome meníngeo a líquido claro, similar a las meningitis de etiología virósica, con pleocitosis discreta y proteinorraquia ligeramente aumentada. La cefalea, síntoma que se presenta ya en la primera fase de la enfermedad, puede llegar a ser muy intensa, guardando relación en estos casos con la injuria meníngea.

El sistema cardiovascular puede verse afectado por procesos inflamatorios que interesan a las coronarias, pericardio, endocardio y miocardio, manifestándose a veces por alteraciones simples en el trazado electrocardiográfico hasta cuadros de suma gravedad. La presencia de la leptospira tendría un papel importante, ya que se han encontrados antígenos de ésta a nivel de las lesiones vasculares y miocárdicas.

Los estados anémicos de intensidad variable, son consecuencia del fenómeno toxémico, hemorragias de intensidad variable y afecciones del riñón e hígado.

Se han descrito, también, compromiso de otros órganos como el cerebro, páncreas y adrenales, de baja incidencia casuística.

Fisiopatología

La fisiopatología de la leptospirosis no está totalmente dilucidada en la actualidad, no obstante puede ser consecuencia de la interacción de eventos como la presencia física del microorganismo por acción directa, la liberación de exo o endo toxinas ya sea por exocitosis o lisis del mismo, que actúen sobre las distintas células blanco, junto con fenómenos de tipo inflamatorio, los cuales serían los responsables de los disturbios funcionales y/o muerte de las células afectadas.

Cuando la leptospira penetra en el organismo por las vías ya mencionadas, invade el torrente circulatorio produciendo una bacteriemia. Existe una rápida división y posterior invasión de distintos órganos y barrera hematoencefalica. Una de las sustancias que sintetiza es la hialuronidasa que junto con la movilidad de la bacteria, le permite atravesar rápidamente distintos tejidos por despolimerización de la sustancia intercelular. No se conoce aún la causa por la cual algunos serovares tienen una especial predilección por las células de determinados parénquimas (riñón, pulmón, hígado). Las células endoteliales de los precapilares y capilares, son también unas de las más afectadas.

La lesión celular se produciría en dos etapas: a) interacción, en la cual existiría una unión específica de la bacteria con la membrana plasmática de la célula target y b) posterior penetración y agresión celular, produciendo alteraciones funcionales de distinta magnitud, que llevarían en algunos casos a la muerte de la célula. En esta etapa, sería importante la carga bacteriana que actúa sobre cada célula. Las toxinas, podrían ser liberadas por el microorganismo vivo o durante su lisis.

Podría tener una marcada importancia en la génesis de los eventos disfuncionales, la estimulación por parte de la leptospira, en cuanto a la liberación de citoquinas, compuestos vasoactivos y de acción citotrófica, que forman parte de los mediadores de fase aguda para algunos tipos de respuesta inflamatoria.

Se sabe que esta bacteria presenta un polisacárido de membrana llamado L-LPS, el cual por mecanismos no del todo dilucidados, sería capaz de desencadenar un **fenómeno tipo Jarisch-Herxheimer**, caracterizado por la presencia de Interleuquinas 1 y 6 (IL 1-IL 6), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y células de respuesta inflamatoria. A la luz de lo antes mencionado, podrían describirse los acontecimientos resultantes de la acción deletérea de la leptospira sobre el organismo. Por un lado, existiría una reacción inflamatoria intersticial, que precede a una extensa capilaritis sistémica (¿pancapilaritis?) que produciría disfunción, lesión y muerte de la célula endotelial con procesos de extravasación. Debe tenerse en cuenta que la primera estructura afectada es la capilar. Por otro lado y como resultado de lo anterior, los parénquimas y tejidos, se verían afectados en su normal aporte e intercambio, primero con un cuadro de hipoxia y luego por la instauración de anoxia y necrosis regional, manifestándose por distintos tipos de trastornos funcionales, según el órgano afectado, cuya magnitud va a depender de variables orgánicas del hospedador y del microorganismo, como son, tipo de serovariedad de la *Leptospira*, patogenicidad de cepa, dosis infectiva, calidad de la respuesta inmunológica del hospedador, órgano afectado, entre otras.

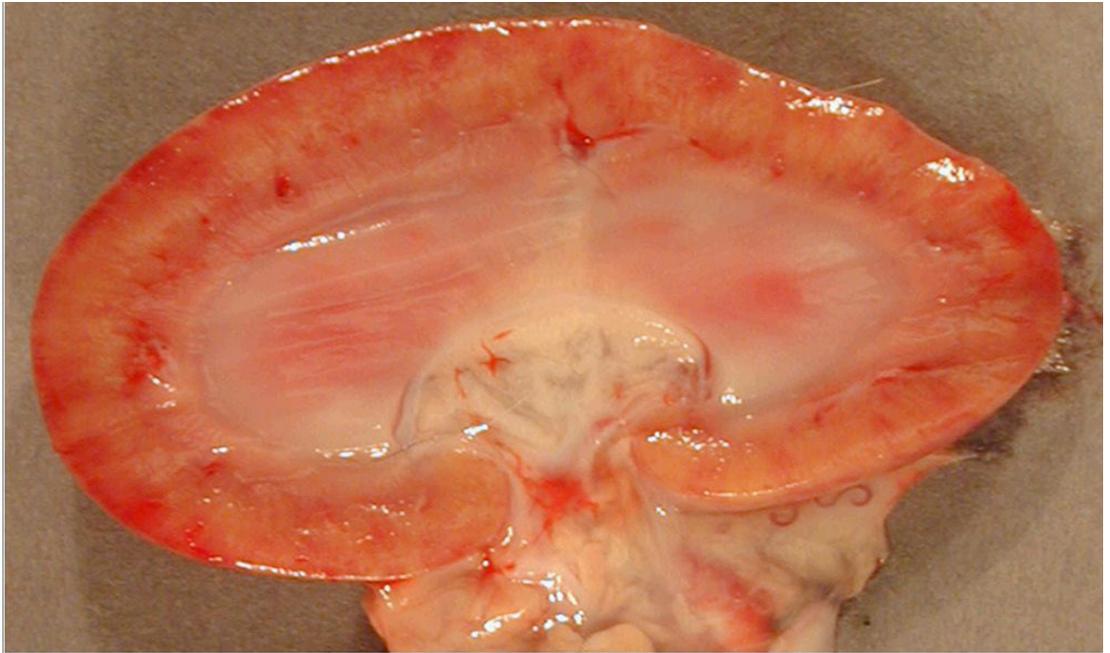
Reacción de Jarisch-Herxheimer

Reacción febril aguda que aparece 2 a 12 h pos tratamiento acompañada por escalofríos, fiebre, malestar general, náuseas, dolor de cabeza, mialgias y artralgias. Esta reacción se debería a la destrucción por parte de los antibióticos de las espiroquetas; al romperse las espiroquetas, liberan su material (LPS) en el organismo y esto provoca esta reacción.

Histopatología

Una de las células afectadas con mayor intensidad por la presencia de *Leptospira* es la de los endotelios capilares, donde es posible ver, utilizando el microscopio electrónico, alteraciones en el sistema vacuolar citoplasmático y mitocondrias, caracterizadas por vacuolización, edema y una disminución de la longitud de las crestas mitocondriales. El microscopio óptico mostraría núcleos redondeados y marcadamente hipercrómicos. Estos eventos indican claramente un déficit energético que se verá representado por una marcada alteración funcional y estructural: modificaciones en la permeabilidad y discontinuidad en las uniones intercelulares que culminarían con la ruptura y necrosis capilar. Esto pone de manifiesto que a nivel del lecho microvascular, existe una clara relación microorganismo-vaso capilar-proceso inflamatorio (endotelitis) y disfunción con daño variable.

El riñón es uno de los órganos que, en la mayoría de los casos, está comprometido. La histopatología estará representada por una nefritis intersticial aguda, muy marcada en la zona córtico medular y médula, necrosis tubular y congestión glomerular. Macroscópicamente el riñón está aumentado de volumen, tenso por debajo de la cápsula y sobresale al cortar la misma. Al corte se observa una cortical gruesa moderadamente congestiva que contrasta con una médula muy congestionada con estrías hemorrágicas y una pelvis que presenta petequias. La lesión intersticial focal está representada por acúmulos de linfocitos, macrófagos, escasos eosinófilos, vasodilatación, edema y tumefacción de la célula endotelial. La necrosis tubular focal a predominio de túbulos contorneados distales, presenta dilatación de éstos y un revestimiento de células bajas con citoplasma basófilo y alteraciones nucleares; en la luz tubular pueden verse cilindros hialinos, celulares y leptospiras. Posiblemente,



Riñón de un canino con nefritis tubulo intersticial.

la lesión más precoz, estaría dada por la nefritis intersticial a la que le sucederían alteraciones funcionales, estructurales y necrosis de los túbulos contorneados.

El cuadro hepático de la leptospirosis, se caracteriza por una colestasis intra hepática con escasa necrosis del hepatocito. Al microscopio óptico, pueden verse lesiones en la zona centrolobulillar como dilatación del árbol biliar, colestasis, trombos biliares, alteración de la estructura sinusoidal y proliferación de células de Von Kupffer. La ultramicroscopía, pone de manifiesto edema intramitocondrial, del sistema vacuolar y modificaciones en la microvellosidades de los polos sinusoidal y biliar. Las células de von Kupffer, están hipertróficas, hiperplásicas y con activa fagocitosis pigmentaria biliar.

A nivel pulmonar, las lesiones tendrían lugar en el amplio lecho vascular capilar del órgano y los septos inter alveolares, los cuales presentarían una capilaritis con lesión y destrucción endotelial, hemorragia y edema inter e intra alveolar, con disfunción respiratoria en ocasiones de suma gravedad. No se ha podido aislar ni visualizar el microorganismo en el esputo.

El tejido muscular es uno de los más afectados ya que las mialgias son muy frecuentes durante la fase invasiva de la leptospirosis. Las lesiones serían provocadas por una capilaritis seguida de necrosis zonal, con presencia de fase aguda inflamatoria: mononucleares y neutrófilos. Se constatan amplias zonas de microhemorragias. También existen depósitos de complejos inmunes y autoanticuerpos en los tejidos musculares estriados y cardiacos.

Diagnóstico

Si bien al considerar el diagnóstico en la leptospirosis, se deben tener presente aspectos referidos a la epidemiología, sintomatología y signología, no cabe duda que en la actualidad, el laboratorio es el que brinda la posibilidad de arribar a una conclusión certera y definitiva, teniendo en cuenta que esta patología, presenta síntomas y signos comunes a otras enfermedades infecciosas. El conocimiento de la dinámica de la leptospirosis es de vital importancia al momento de decidir que técnica o método se va a utilizar para demostrar la presencia de esta bacteria.

Por un lado tenemos los analitos que permiten evaluar funciones orgánicas: perfiles renales, hepáticos, sanguíneos, de LCR, de coagulación, etc. Por otro lado están aquellos que si nos posibilitar un diagnóstico acertado como son: estudios inmunológicos y aislamiento bacteriano.

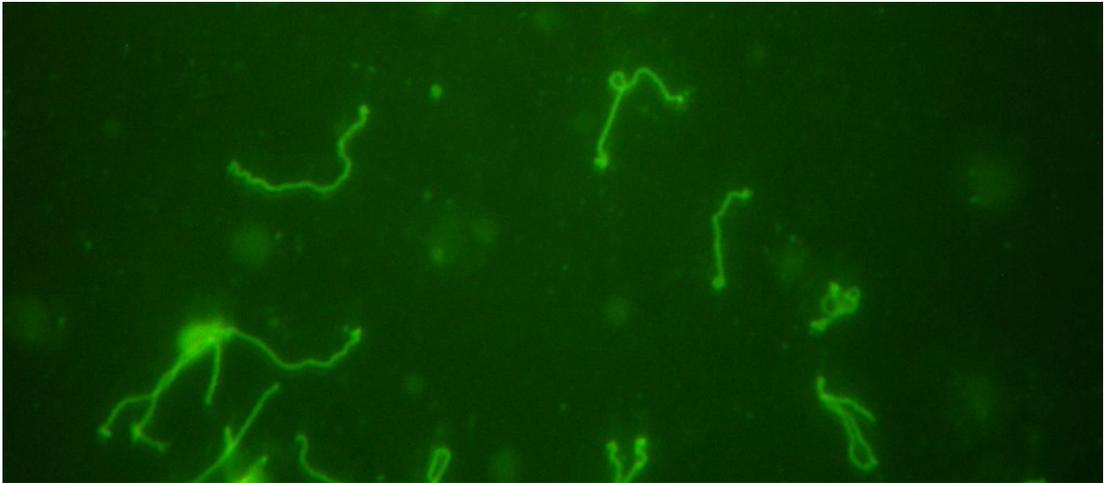
En el inmunoanálisis, se ponen de manifiesto, las inmunoglobulinas que hacen su aparición entre el 5 y 10 días de comenzada la fase invasiva, siendo las mismas en primer lugar del tipo IgM y posteriormente, a partir del *shunt* o disminución reactiva serológica, las IgG. Las primeras, pueden detectarse hasta 3 meses de comenzada la enfermedad, las segundas, son factibles de cuantificar hasta 2 años después, lo que nos permite hacer estudios horizontales retrospectivos con el fin de reconocer pacientes infectados asintomáticos o que padecieron sintomatología leve. Sin embargo esta permanencia por largos períodos suele confundir el diagnóstico del profesional inexperto, la sero reactividad indicaría sólo el contacto con leptospiras pero no el diagnóstico de la responsabilidad del cuadro clínico. Por este motivo es más adecuado hablar de sero reactividad (suero reactivo) en lugar de sero positividad (suero positivo). La respuesta mediada por anticuerpos es rápida e importante desde el punto de vista cuantitativo.

Dentro de las reacciones específicas de género, se incluyen:

a) **Prueba de aglutinación macroscópica en placa (TR)** que es una determinación muy fácil de realizar, de bajo costo, que no requiere entrenamiento previo y confiable en medicina humana. Se utiliza una suspensión densa de *Leptospiras* no patógenas (*L. biflexa*), tratadas con calor (TR “termo resistente”), a la cual se enfrenta suero del paciente y se observa la presencia de aglutinación. Este método es útil para realizar *screening*, sin embargo ante la presencia de un suero reactivo, debe confirmarse con otra prueba referencial.

b) **Contrainmunolectroforesis (CIE)**: técnica permite el manejo de gran cantidad de muestras en forma simultánea y ofrece un diagnóstico bastante rápido 2 a 3 horas. Se utilizan soportes de agarosa, a los que se le hacen pocillos de 2 mm de diámetro en dos hileras enfrentadas en los cuales se colocan en una el suero problema y en la otra la suspensión de antígenos preparada, se introducen en una cuba electroforética y se realiza la corrida en dos etapas. Las reacciones positivas se caracterizan por dar bandas de precipitación las cuales pueden ser coloreadas. Quienes lleven a cabo este tipo de diagnóstico deben poseer entrenamiento previo.

c) **Inmunofluorescencia indirecta**: para llevar a cabo esta técnica es necesario contar con un microscopio preparado para captar emisión fluorescente originada al utilizarse luz ultravioleta como fuente de iluminación; se requiere suero del paciente en varias diluciones, antígenos y conjugados que deben ser preparados en laboratorios especializados. Esta técnica tiene buena sensibilidad, pero requiere de equipos e insumos caros y personal capacitado.



Leptospiras por Inmunofluorescencia.

d) **Pruebas de ELISA:** utilizan los anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del paciente infectado, los cuales se combinan con antígenos de *Leptospira* fijados en la superficie de micropocillos de poliestireno, luego se agrega conjugado de anticuerpos IgG o IgM más una enzima, procediendo después a adicionar un sustrato y un cromógeno, al hidrolizarse el sustrato por la enzima, se produce una coloración característica. Existe también el ELISA DOT BLOT que es similar al anterior diferenciándose por presentar un soporte en forma de peine y el tiempo de realización es menor. En la actualidad, hay kits comerciales para diagnóstico en algunos países, pero no en Argentina.

e) **DIPSTICK,** consiste en una prueba de inmuno oro para el diagnóstico serológico de la leptospirosis canina y humana, con una correlación superior al 95 % con la prueba de MAT.

Se debe recordar que todos estos métodos de diagnóstico, son específicos de género. Solamente nos informan la presencia de anticuerpos anti *Leptospiras*, sin especificar a que serovariedad pertenecen aconsejándose utilizarlos durante el fin de la primera fase y comienzo de la segunda.

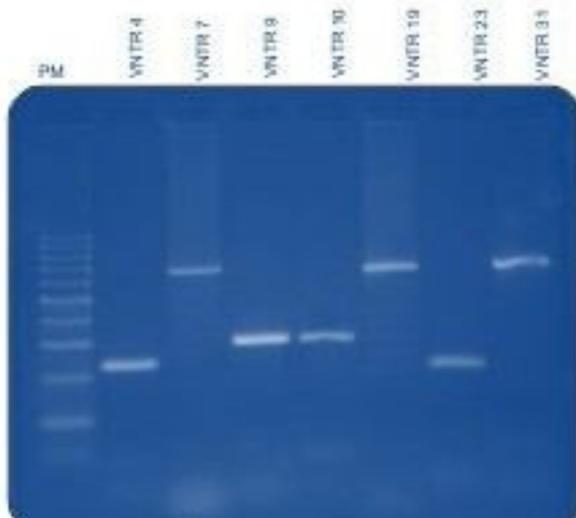
Prueba de Aglutinación Microscópica

La reacción específica de especie o serovariedad es el Test de Microaglutinación (MAT de su sigla en inglés *Microscopic Agglutination Test*) creado por Martín y Petit, actualmente es un método de referencia internacional (*gold standard*) para el diagnóstico de leptospirosis basado en la cinética de los anticuerpos aglutinantes enfrentados con antígenos vivos.

En esta técnica se utilizan cultivos frescos (de 7 a 10 días de repicados), de las serovariedades reconocidas por el Subcomité de Taxonomía (Bratislava, Pyrogenes, Icterohemorragiae, Pomona, Hardjo, Canicola, Gripotyphosa, Ballum, Wolfi y otras) junto con las que se encuentran comúnmente en la zona, ya sean aisladas de humanos o animales, las cuales se enfrentan con el suero del paciente diluido convenientemente, incubándose luego a temperatura y tiempo variable de acuerdo a las distintas posibilidades que ofrece la técnica existente, procediéndose luego a la lectura del test, la cual se realiza por microscopía de campo oscuro donde se evalúa el porcentaje de bacterias libres y aglutinadas (complejos), comparándolas con testigos positivos para cada uno de los serovares utilizados. Los sueros reactivos deben corroborarse con los métodos de aislamiento bacteriano existentes. El MAT, requiere de personal altamente capacitado ya que la interpretación la realiza el operador por medio de la observación microscópica, debiéndose tener en cuenta además, que se manipulan como testigos, cepas con capacidad patogénica, lo que requiere un estricto conocimiento y aplicación de las normas de bioseguridad.

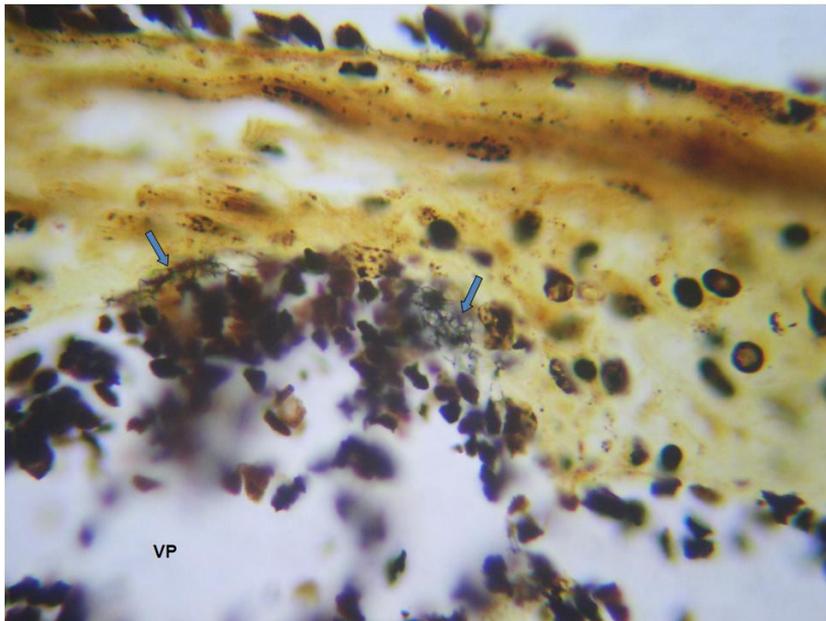
Métodos moleculares

Actualmente existen dentro de los denominados métodos de diagnóstico “de avanzada”, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación ADN/ADN (HAN), ambos específicos de especie (interrogans/biflexa), es decir no identifican serovariedades. La PCR, utiliza cebadores específicos (Lep 1/ Lep 2), para amplificar un fragmento de pares de bases (630 pb) correspondientes a un gen ribosomal (16s) de la bacteria. En la HAN, el producto amplificado es identificado a través de una sonda de DNA (lin 2) complementaria de la región V 2 del gen ribosomal 16s. Todas estas técnicas, requieren aparatología especial, personal muy entrenado, son de alto costo y en nuestro país no se utilizan corrientemente como métodos de diagnóstico estándar, solamente se emplean en algunos servicios donde se llevan a cabo paralelamente tareas de investigación.



Marcadores moleculares de diferentes especies de leptospiras.

Dentro de los métodos de diagnóstico, también están los de observación microscópica directa u observación previa coloración. En el primer caso se usa microscopio de campo oscuro, sin embargo no se aconseja para un diagnóstico definitivo, ya que existen artefactos de técnica ej.: filamentos de fibrina en orina hematórica, que pueden ser confundidos con la bacteria por la morfología de la misma. La observación por coloración, utiliza algunas técnicas de complejidad variable como por ejemplo: Levaditti, Giemsa, sales de plata, May Grudwald, Rojo congo, Gram, etc. Los resultados que se obtienen son variables debido a que en general no existe gran cantidad de leptospiras en los fluidos orgánicos o materiales utilizados, además es importante mencionar, el escaso poder de adherencia de la bacteria sobre el vidrio de los portaobjetos, lo que facilita el desprendimiento durante las maniobras de lavado del colorante. Para la observación previa tinción, se usa el microscopio óptico. La inmunofluorescencia directa puede dar buenos resultados.



Inmuno histoquímica de leptospiras.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

MÉTODOS DE DEMOSTRACIÓN DE LEPTOSPIRAS

EXAMENES DE CAMPO OSCURO

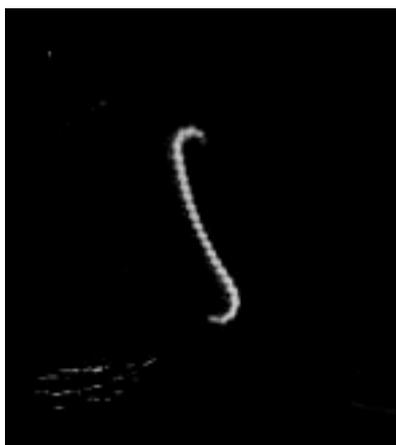
Es posible realizarla a partir de sangre, orina, leche y suspensiones de órganos.

Se realiza por observación en microscopio de campo oscuro y es el único método para visualizar *Leptospiras* vivas.

Se pueden detectar en sangre durante la leptospiremia (primera semana - período febril) y en orina después de la primera semana durante la leptospiuria.

Debido al escaso número y a su aparición intermitente en fluidos y materiales clínicos, solo en el 10 % de los positivos es posible visualizarlas. Es importante tener en cuenta de no confundirlas con restos celulares o fibrina que pueden llevar a interpretaciones erróneas.

Esta prueba debe tomarse como complementaria al diagnóstico.



Leptospira sp. en campo oscuro

AISLAMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO

Las *Leptospiras* pueden cultivarse en medios especiales, pero requiere determinadas condiciones de temperatura, pH y aerobiosis. No siempre se obtiene desarrollo bacteriano, esto se puede deber a diferentes causas. Cuando un cultivo es negativo, no se puede descartar la existencia de la enfermedad, pues pueden ocurrir varias cosas:

- * Que haya escaso número de microorganismos en la muestra.
- * Que las bacterias no se adapten al medio de cultivo
- * Que en las muestras sembradas existan sustancias inhibitoras como antibióticos u otras.

En el caso de urocultivos, debemos tener en cuenta que la leptospiruria es intermitente, por lo tanto, nuestra toma de muestra pudo no haber coincidido con la fase de leptospiruria.

1. SANGRE

1.1 CULTIVOS

Se realizan por duplicado, en dos medios de cultivo diferentes (Kortoff y Stuart, EMJH y Fletcher por ej.) los cuales poseen básicamente una fuente de proteínas, una solución de sales, una solución buffer, suero de conejo normal en la proporción de 5 – 10 %, vitamina B₁₂ y hemoglobina (ver anexo Medios de cultivo).



Desarrollo de Leptospiras en medio semisólido (anillos de Dinger).

PROCEDIMIENTOS

La sangre debe ser sangre fresca heparinizada o con EDTA (no utilizar citrato de sodio), de un paciente que no haya recibido terapia antibiótica y que no tenga más de 7 días desde la aparición de los síntomas característicos. Se siembra en series de cuatro tubos con medio de cultivo, colocando **una gota** de sangre en el primer tubo, dos en el segundo, tres en el tercero y cuatro en el cuarto. Se procede así para evitar la acción de sustancias inhibitoras (anticuerpos) generalmente presentes en los tejidos exudados, trasudados y humores en general. Esto permite diluirlos sin disminuir la cantidad total de inóculo en el conjunto de los tubos.

Una vez sembrados, los tubos se incuban durante 45 a 90 días a 29 °C con observación periódica con microscopio de fondo oscuro; la positividad en los cultivos primarios se pone en evidencia solamente a través de la observación microscópica; se debe buscar la presencia de *Leptospiras* que se presentan como elementos filamentosos delgados de tipo helicoidal, flexuosos, con sus extremos terminados en gancho. Al cabo de este tiempo (3 meses) se descartan los tubos que no presenten desarrollo.

1. 2 OBSERVACIÓN EN FRESCO

Se toma una gota de sangre entre porta y cubreobjetos y se observa al microscopio de fondo oscuro, teniendo la precaución de no confundir las leptospiras con artefactos presentes en sangre, tales como restos de fibrina o restos de membranas de eritrocitos.

Las *Leptospiras* poseen un eje rígido con los extremos terminales en gancho y se desplazan con movimientos activos de rotación y traslación. Los artefactos poseen solo movimiento browniano.

2. LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El procedimiento para visualización en fresco como el cultivo y la inoculación de animales de laboratorio es exactamente igual al descrito para sangre (Ver puntos 1.1, 1.2).

3. ORINA

A partir de la segunda o tercera semana de evolución de la enfermedad se puede hacer la visualización y el aislamiento de las *Leptospiras* en este espécimen clínico.

Se recoge orina en forma estéril, recolectándola en un recipiente estéril teniendo la precaución de que ésta posea un pH de alrededor de 7,2 - 7,4 o la neutralidad. Si el pH fuese ácido (humanos, caninos u otros) se puede suministrar al paciente un tratamiento alcalino previo, para obtener un pH urinario adecuado. La muestra debe ser remitida inmediatamente después de haber sido extraída la misma. Una opción es administrar a los animales un diurético como la furosemida en animales y promover la evacuación urinaria, lo que ha dado buenos resultados.

3.1 CULTIVOS

La orina debe someterse a doble centrifugación, la primera a 2.500 rpm durante 15 minutos, con el sobrenadante se centrifuga refrigerada a 10.000 rpm por espacio de 20 a 30 minutos. Se tira el sobrenadante y con el culot se procede de igual forma que en el punto 1.1.

AISLAMIENTO POR INOCULACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

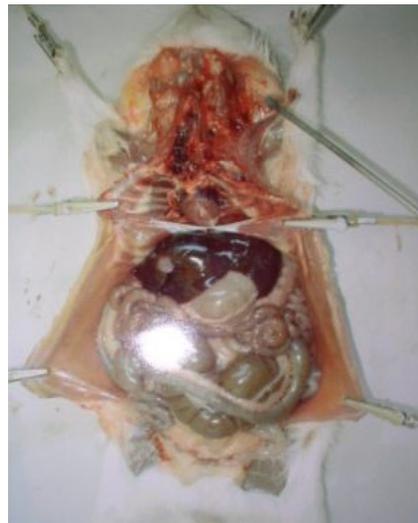
Se pueden emplear cobayos recién destetados de 150 a 200 g de peso. Se inoculan dos de ellos con 0,5 ml de sangre, uno por vía subcutánea y el otro por vía intraperitoneal. A partir del cuarto día, se toma la temperatura rectal, diariamente, de mañana y de tarde, hasta el noveno día. Cuando la temperatura se eleva por encima de los 39 °C, se hace una extracción de sangre por vía cardíaca y se siembra en dos series de tubos, cada una con un medio de cultivo distinto, colocando una, dos, tres, y cuatro gotas de sangre respectivamente.

La incubación es a 28 °C durante 60 días. Esto está justificado por el posible fracaso de los cultivos, el conocido resguardo que brindan los pasajes ciegos.

Con esta sangre febril, se reinoculan dos cobayos del mismo modo, con idénticos controles y procedimientos. Los cultivos se examinan en microscopía de fondo oscuro, semanalmente durante 45 a 90 días. Esta técnica de inoculación de animales debería dejarse exclusivamente para los casos estrictamente necesarios y siempre según las reglamentaciones del uso de los animales de experimentación de cada país.



Cobayo utilizado para la inoculación experimental.



Necropsia de un animal de laboratorio.

SEROLOGÍA

El estudio serológico para leptospirosis se emplea para diagnosticar los casos de animales domésticos y salvajes como así también en humanos.

También se usa para estudios epidemiológicos. El propósito de las pruebas serológicas es demostrar la presencia de anticuerpos antileptospiras. La existencia de los mismos, en sujetos no inmunizados, indica que han estado en contacto con leptospiras. Así como ocurre con otras enfermedades infecciosas, las reacciones serológicas tienen sus desventajas e inconvenientes:

1° Los anticuerpos no pueden ser detectados antes de la segunda semana de la enfermedad;

2° Los títulos de los anticuerpos pueden aparecer más tardíamente o ser bajos, cuando el individuo o animal ha sido tratado con antibióticos;

3° Una reacción con resultado positivo no prueba que la enfermedad haya sido leptospirosis, ya que los anticuerpos encontrados pueden ser el resultado de una inmunización activa o pasiva.

La investigación de anticuerpos aglutinantes, se puede realizar por distintos procedimientos. El más sensible es el método de aglutinación microscópica con antígenos vivos (MAT); la reacción microscópica con antígenos formolados es menos sensible.

Los anticuerpos aparecen alrededor del día 7 u 8 después del comienzo de la infección elevándose rápidamente el título, alcanzando su nivel máximo a los 15 o más días y se mantiene durante un período que varía desde meses a años, según la cepa infectante y la especie animal.

Para realizar las reacciones serológicas, se extrae sangre y se deja coagular en un tubo, luego se despega el coágulo y se retira el suero dejando retraer unos minutos más. Este suero límpido y sin hemolizar, se enfrenta con los distintos antígenos.

REACCIÓN DE MICROAGLUTINACIÓN CON ANTÍGENOS VIVOS

Esta técnica descrita por Martin y Pettit, es la más sensible conocida hasta el momento y se la considera como prueba de referencia.

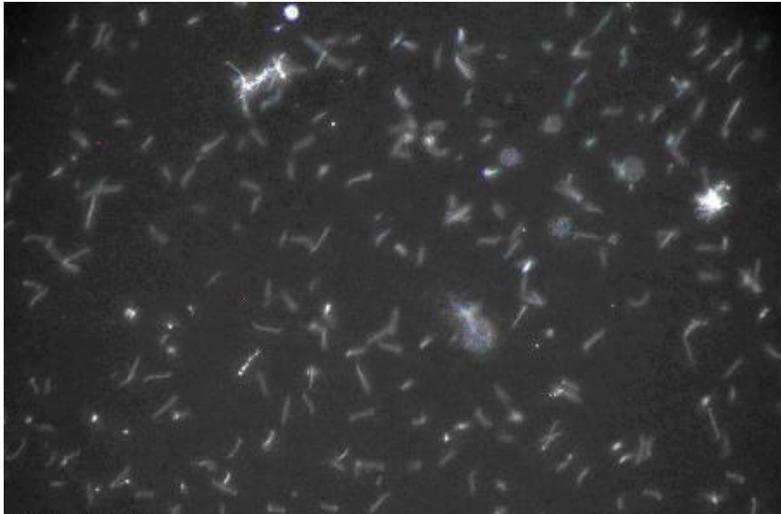
Para realizarla deben utilizarse antígenos de no más de 7 a 10 días, desarrollados en medios líquidos, no aglutinados ni contaminados y con un número aproximado de 200 microorganismos por campo, vistos a 200 aumentos aproximadamente. Se emplea un antígeno por cada serogrupo de leptospiras actualmente aceptadas por O.M.S. / F.A.O. De esta manera, se cubre todo el aspecto antigénico de las leptospiras. Si bien se recomiendan métodos de estandarización mediante conteo en cámara o nefelométricos, usualmente se basa en la experiencia del técnico en valorar la cantidad de microorganismos en el cultivo.

Los antígenos muy densos, son muy poco sensibles, los poco densos son muy sensibles, y éstos, por lo tanto, darán títulos más elevados.

La prueba se realiza de la siguiente manera:

Se preparan diluciones del suero a testear: 1/50, 1/100, etc. con P.B.S. (solución salina buferada).

Se colocan 0,2 ml en una serie de tantos tubos de hemólisis (o 25 o 50 µl si se utilizan microplacas de 96 pocillos de cada una de las diluciones), como antígenos se empleen para hacer la reacción.



Serología de MAT en fondo oscuro, se pueden visualizar algunos grumos de aglutinación.

Se agrega 0,2 ml de antígeno a cada una de las series de tubos de hemólisis que contienen las diluciones del suero problema (o 25 o 50 μ l si se utilizan microplacas de 96 pocillos de cada uno de los antígenos a testear).

Se prepara una serie de tubos testigo, compuesto cada uno por 0,2 ml de antígeno y 0,2 ml de PBS (o 25 o 50 μ l de antígeno y 0,25 o 50 μ l de P.B.S. en el caso de utilizar las microplacas).

Todos los tubos o microplacas con mezcla se agitan (con precaución) y se llevan a incubación durante 2 horas, en estufa a 28-30 °C o 1 hora en estufa de 37 °C.

La observación de la aglutinación de las leptospiras se realiza en microscopio de fondo oscuro a 100 a 250 x de aumento.

DILUCIÓN INICIAL DE TRABAJO SEGÚN ESPECIE

| DILUCIÓN | | PBS | SUERO |
|----------|-------|--------|--------|
| humano: | 1/50 | 2,4 ml | 0,1 ml |
| canino | | | |
| porcino | 1/100 | 4,9 ml | 0,1 ml |
| equino | | | |
| bovinos | 1/200 | 9,9 ml | 0,1 ml |

Para interpretar los resultados de esta reacción, se debe tener en cuenta la aparición de leptospiras aglutinadas con respecto al tubo testigo. Estos microorganismos se aglutinan formando “*clumps*” semejando estrellas o soles refringentes, a veces como pequeños puntitos o comas.

Todas estas formaciones presentan movimientos de rotación y a veces de traslación; utilizando el tornillo micrométrico se pueden visualizar las leptospiras unidas entre sí.

Un 50 % o más de microorganismos aglutinados, indicará la presencia de anticuerpos antileptospiras para ese antígeno (reactivo); se considera el resultado “no reactivo” cuando el aspecto de la mezcla suero - antígeno es similar al testigo. El título del suero corresponderá a la inversa de la mayor dilución en la que se observa por lo menos un 50 % de aglutinación de leptospiras.

Serovariedades utilizadas en MAT en muestras Humanas

| | <i>genomoespecie</i> | serogrupo | Serovar | cepa |
|----|--------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | <i>L. borgpetersenii</i> | Ballum | Castellonis | Castellón 3 |
| 2 | <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | H. Utrecht IV |
| 3 | <i>L. kirchsnieri</i> | Grippothyphosa | Grippothyphosa | Moskva V |
| 4 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Copenhageni | M20 |
| 5 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | RGa |
| 6 | <i>L. interrogans</i> * | Pomona | Pomona | Pomona |
| 7 | <i>L. interrogans</i> | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem |
| 8 | <i>L. borgpetersenii</i> | Tarassovi | Tarassovi | Perepelitsin |
| 9 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Wolffi | 3705 |
| 10 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno |
| 11 | <i>L. interrogans</i> | Bataviae | Bataviae | Swart |
| 12 | <i>L. biflexa</i> | Semarang | Patoc | Patoc 1 |
| 13 | <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis | Ballico |
| 14 | <i>L. interrogans</i> | Autumnalis | Autumnalis | Akiyami A |
| 15 | <i>L. kirschneri</i> | Cynopteri | Cynopteri | 3522 C |
| 16 | <i>L. interrogans</i> | Hebdomadis | Hebdomadis | Hebdomadis |
| 17 | <i>L. borgpetersenii</i> | Javanica | Javanica | Veldrat Batavia 46 |
| 18 | <i>L. noguchii</i> | Panama | Panama | CZ 214K |
| 19 | <i>L. borgpetersenii</i> | Sejroe | Sejroe | M 84 |

Serovariedades utilizadas en MAT en muestras de origen animal en Argentina

MAT en Caninos:(-)

| | | | |
|--------------------------|---------------------|-------------|---------------|
| <i>L. borgpetersenii</i> | Ballum | Castellonis | Castellón 3 |
| <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | H. Utrecht IV |
| <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Copenhageni | M20 |
| <i>L. interrogans</i> * | Pomona | Pomona | Pomona |
| <i>L. interrogans</i> | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem |

MAT en Cerdos (-)

| | <i>genomoespecie</i> | serogrupo | serovar | cepa |
|----|--------------------------|---------------------|----------------|----------------|
| 1 | <i>L. borgpetersenii</i> | Ballum | Castellonis | Castellón 3 |
| 2 | <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | H. Utrecht IV |
| 3 | <i>L. kirchsnieri</i> | Grippothyphosa | Grippothyphosa | Moskva V |
| 4 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Copenhageni | M20 |
| 6 | <i>L. interrogans</i> * | Pomona | Pomona | Pomona |
| 7 | <i>L. interrogans</i> | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem |
| 8 | <i>L. borgpetersenii</i> | Tarassovi | Tarassovi | Perepelitsin |
| 9 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Wolffi | 3705 |
| 10 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno |

MAT en Bovinos, caprinos, ovinos y equinos (-)

| | <i>genomoespecie</i> | serogrupo | serovar | cepa |
|----|--------------------------|---------------------|----------------|----------------|
| 1 | <i>L. borgpetersenii</i> | Ballum | Castellonis | Castellón 3 |
| 2 | <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | H. Utrecht IV |
| 3 | <i>L. kirchshneri</i> | Grippothyphosa | Grippothyphosa | Moskva V |
| 4 | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Copenhageni | M20 |
| 6 | <i>L. interrogans*</i> | Pomona | Pomona | Pomona |
| 8 | <i>L. borgpetersenii</i> | Tarassovi | Tarassovi | Perepelitsin |
| 9 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Wolffi | 3705 |
| 10 | <i>L. interrogans</i> | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno |

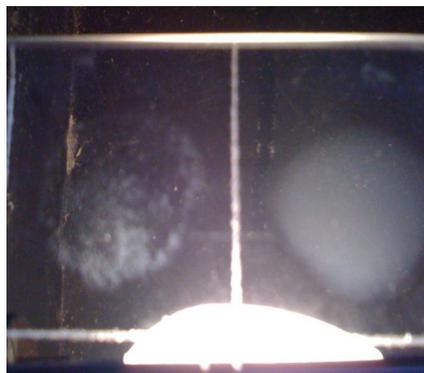
(-) Según lo sugerido por la Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis y de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD, 1994).

La elección de los antígenos pueden variar, se pueden incorporar otros antígenos utilizados en otras regiones geográficas (hasta 25).

REACCIÓN DE MACROAGLUTINACIÓN CON ANTÍGENO TERMORRESISTENTE

El antígeno TR es la fracción termorresistente de una concentración de leptospiras tratadas por procedimientos físicos (calor). Este antígeno se utiliza como prueba tamiz o *screening* de diagnóstico de leptospirosis humana y canina aguda. La prueba de aglutinación macroscópica es de fácil realización, económica y con resultados inmediatos (aunque siempre debe ser complementada con el test de referencia internacional de microaglutinación -MAT-). Es una técnica que detecta inmunoglobulinas M para Leptospiras.

Tiene utilidad en los diagnósticos individuales o ante un brote de Leptospirosis, pero no tiene valor en encuestas epidemiológicas o estudios de prevalencia. El antígeno obtenido es estable durante un tiempo prolongado.



Visualización del Antígeno TR en placa

Preparación

Se cultivan 10 tubos de ensayo con tapa a rosca con 10 ml con medio EMJH cada uno con 1 ml (10 %) de la cepa de referencia *L. biflexa* patoc 1 o cualquier serovariedad de *Leptospira interrogans*. Se cultivan los mismos a 28-30 °C 7-10 días.

Luego se examinan los cultivos al microscopio de campo oscuro para observar la homogeneidad, la densidad (un antígeno satisfactorio debe contener entre 100 y 200 organismos por campo con ocular 10x objetivo de 45x) la ausencia de *clumps* de autoaglutinación y la ausencia de contaminación. Esos mismos cultivos se trasvasan de a 2 a 5 envases de 250 ml con 200 ml cada uno de medio de cultivo similar al de los tubos mencionados anteriormente (EMJH). Se incuban 7-10 días a 28-32 °C, luego se observan nuevamente los cultivos al microscopio de campo oscuro para observar la homogeneidad, la densidad, la ausencia de *clumps* de autoaglutinación y la ausencia de contaminación. Si los cultivos de los 5 frascos son satisfactorios, se agrega una solución de formaldehído a una concentración final de 0,5 % y se deja a temperatura ambiente durante 2 h o si se desea durante toda la noche.

Los antígenos inactivados se centrifugan en tubos durante 10 min a 1500 gravedades para eliminar todo material extraño. Se observa nuevamente al microscopio para evaluar ausencia de autoaglutinaciones y se usan solamente los cultivos lisos, sin grumos.

El sobrenadante de los tubos se transfiere a tubos plásticos de 50 ml y se centrifuga en una centrifuga refrigerada, de cabezal angular, durante 30 min a 13000 veces gravedad a 10 °C para obtener un sedimento de leptospiras. El sobrenadante se vierte cuidadosamente y los tubos se dejan escurrir en posición oblicua. Las células sedimentadas se resuspenden con 1,5 a 2 ml por cada tubo de una solución de 0,5 % de formol en PBS.

El antígeno se mezcla unas 15 a 20 veces con una pipeta Pasteur de plástico descartable de 3 ml o con una jeringa con aguja calibre 16/18, y se hace un *pool* de todos los envases plásticos originales en frascos de 250 ml; luego se vuelven a centrifugar en una centrifuga refrigerada, de cabezal angular, durante 30 min a 13000 veces gravedad a 10 °C para obtener un sedimento de Leptospiras. El sobrenadante se vierte cuidadosamente y los tubos se dejan escurrir en posición oblicua. Si las células no permiten una resuspensión completa, al observar la suspensión en microscopio de fondo oscuro, los grumos se sacan por centrifugación durante 10 min a 1500 gravedades.

Esta suspensión se trasvasa a un envase de base chata de unos 60 ml con perlas de vidrio y se coloca a 4 °C durante 24 h, preferentemente con agitaciones periódicas intermitentes, para asegurar una suspensión uniforme.

Una vez cumplido el lapso indicado se coloca la suspensión en un tubo de vidrio con tapa a rosca y se pone el mismo en un recipiente con agua caliente en punto de hervor (baño de María) durante 30 min en agitación permanente.

Una vez obtenida la suspensión adecuada para estandarizar la densidad de la misma, los antígenos se ajustan por adición de PBS a pH 7,2 al 25-27 % de transmisión de luz en un colorímetro fotoeléctrico Lumetron con filtro N° M-550 y una placa de reducción n° 6, o al 45-48 % de transmisión de luz por el aparato Coleman Jrs., o se lleva la misma hasta equipararla con un tubo N° 10 de la escala de Mac Farland.

Los antígenos inactivados se centrifugan en tubos durante 10 min a 1500 veces gravedad para eliminar todo material extraño y coloca en heladera a 4 °C (se puede agitar periódicamente) y se deja varios días antes de probar el antígeno.

Modo de uso del antígeno

Material necesario:

Portaobjetos limpio y desengrasado o placas de vidrio marcadas con cuadrados de 3,5 cm de lado o círculos del mismo diámetro.

Goteros para antígenos y para suero calibrados de tal manera que distribuya 0,03 ml por gota (se puede utilizar pipeta automática con *tips* descartables).

Mezcladores de madera o plástico descartables (en el caso de utilizar *tips* descartables pueden utilizarse como mezcladores).

Técnica:

Antes de utilizarse, los sueros y los antígenos deben llevarse a temperatura ambiente, homogeneizar y dejar reposar durante 1 hora.

Colocar una gota de 0,03 ml del suero problema con el gotero calibrado o pipeta automática sobre la lámina de vidrio.

Agregar una gota de 0,03 ml de antígeno TR con otro gotero calibrado (o cambiar el *tip* en el caso de utilizar pipeta automática).

Mezclar con el mezclador elegido o con el *tip* utilizado para dispensar el antígeno abarcando un área de aproximadamente 20 mm de diámetro.

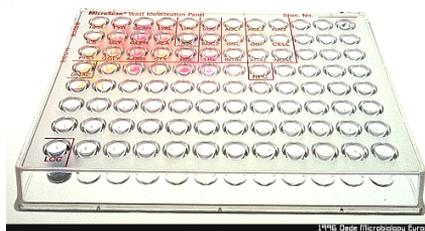
Homogeneizar las muestras con movimientos rotatorios suaves de la lámina de vidrio durante 5 minutos, evitando la dispersión de la gota.

Leer bajo la incidencia de luz de lámpara inclinando ligeramente la lámina de vidrio de un lado a otro para permitir que la mezcla fluya.

Una reacción positiva es aquella en la se observan grumos blanquecinos que no se desintegran en el líquido claro del fondo de la mezcla suero-antígeno.

Una reacción negativa es aquella en que la muestra suero-antígeno luego de la agitación, no evidencia la presencia de grumos, ni la suspensión aparece clara sino con la misma y leve tonalidad blanquecina que tenía al comenzar la reacción.

La reacción se realiza paralelamente con dos controles, enfrentando el antígeno a un suero positivo (control positivo) y a un suero negativo o solución fisiológica (control negativo).



Prueba de ELISA para Leptospira.

TOMA DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO

Aislamiento bacteriano: la muestra más utilizada para realizar el cultivo es la de sangre del paciente hasta los 5 a 7 días del comienzo de los síntomas, es decir durante el período febril por excelencia, en la primera fase de la enfermedad (invasiva). El hemocultivo se debe llevar a cabo en medios específicos, 2 a 3 muestras por día e inmediatamente de extraída la sangre (al pie de la cama) y ser mantenido a temperatura ambiente hasta el envío al laboratorio especializado. La sangre debe ser anticoagulada con heparina u oxalato de sodio; nunca se utiliza como anticoagulante citrato de sodio porque inhibe el metabolismo bacteriano. Un dato importante para tener en cuenta es que el paciente no debe haber recibido tratamiento con antibióticos previamente a la extracción ya que se reduce la posibilidad de recuperación. Los cultivos, si bien son la metodología más calificada para diagnosticar leptospiremia, tienen como desventaja el tiempo de incubación, el cual se puede extender en algunos casos hasta 90 días incluso hasta los 180 días. Se han descrito casos de aislamiento a partir de muestras tomadas para hemocultivo en el cual, si bien no se reproducen, se mantienen vivas para lograr el aislamiento.

Otro fluido para aislamiento es la orina, no se aconseja la toma de muestra muy temprana, se debe recolectar a partir de los 7 a 10 días de comenzados los síntomas y se puede extenderse hasta 90 días del inicio. Se debe alcalinizar levemente la orina (pH 7,2/7,4) ya que la acidez que generalmente presenta la misma, inactiva rápidamente al microorganismo, para ello se le puede agregar PBS a la muestra obtenida o administrar al paciente 0,5 g de bicarbonato de sodio 3 veces al día 24 horas antes. Hay que tener en cuenta que la leptospiruria es intermitente, por ello se deben obtener varias muestras espaciadas en el tiempo.

El LCR también puede ser usado para aislar *Leptospiras*, debido a que esta bacteria elabora hialuronidasa, puede atravesar la barrera hematoencefálica con relativa facilidad. No obstante es poco común lograr resultados positivos ya que este fluido orgánico, presenta en general poca carga bacteriana. Se deben extraer 0,25 a 0,50 ml en forma aséptica, sin conservantes y si no se siembra en forma inmediata puede mantenerse solamente refrigerada hasta su envío. Debido a que la llegada de la bacteria al SNC es coincidente con la bacteriemia, la muestra se debe obtener durante la fase invasiva.

Serología

En Argentina, se utilizan comúnmente las pruebas de TR y el MAT, siendo esta última la de referencia. Las muestras de sangre para las distintas reacciones serológicas de diagnóstico, se debe realizar a partir de los 5 a 10 días del comienzo de los síntomas ya que antes difícilmente se obtengan resultados positivos. El suero debe ser separado rápidamente del coágulo y refrigerado hasta su utilización; puede ser congelado a -12 °C para conservarlo por largos periodos de tiempo, sin embargo la congelación/descongelación repetida baja los títulos de anticuerpos.

Las IgM, primeros anticuerpos que aparecen, como respuesta inmunológica, persisten hasta 3 meses, las IgG pueden mantener títulos positivos hasta 2 o 3 años (dependiendo de la especie). Las extracciones siempre deben ser pareadas, con un intervalo de tiempo de 15 a 20 días entre la primera y segunda toma de muestra, de

esta manera se puede apreciar el incremento del título serológico. Un primer título de 1/100 o más es considerado reactivo. Un primer título de 1/50 se considera positivo si la muestra pareada presenta un incremento de 4 veces o más el título del primer estudio.

Definición de caso

Caso probable: paciente con comienzo brusco de síntomas que presenta: escalofríos, fiebre de 38 °C o más, cefaleas, astenia, adinamia, dolores musculares y malestar general, sin síntomas en vías aéreas superiores, seguido o no de náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, ictericia, nefropatía, neumopatía, hemorragias, inyección conjuntival, síndrome meníngeo o artralgias, con antecedentes de exposición de riesgo.

Caso confirmado: todo caso probable confirmado por cultivo bacteriano o serología positiva para leptospirosis.

NORMATIZACIÓN DE TOMA, ENVÍO Y TRASLADO DE MUESTRAS

TOMA DE MUESTRA

Materiales aptos para el aislamiento y momento de toma de muestra

| Material | Días de enfermedad |
|-----------------|---------------------------|
| Sangre | hasta 5 días |
| LCR | hasta 7 días |
| Orina | a partir de 7 días |
| Humor acuoso | a partir de 7 días |

El laboratorio provee medio de transporte de muestras para cultivo, humanas y animales.

Medio de transporte:

Medio Fletcher, en frascos de 5 ml, con tapa con virola. En caso de no contar con el mismo, las condiciones para el envío serán:

Sangre: sangre entera y estéril 5 a 10 ml con 15 a 20 U.I. de heparina (lo ideal es remitir en medio de transporte provisto por el laboratorio de leptospirosis).

Orina: chorro medio obtenido en forma y envase estéril (lo ideal es que sea remitido en medio de transporte provisto por el laboratorio de leptospirosis).

Humor acuoso y LCR: deberán ser tomados en forma estéril, y enviados en tubo o envase con tapa a rosca.

Test de Microaglutinación: Suero sanguíneo.

Toda muestra de suero sanguíneo hemolizada, contaminada o sin el protocolo correspondiente es rechazada.

Se solicitan muestras pareadas. Estas se resuelven juntas, de ser posible.

Paciente con ayuno de 8 h.

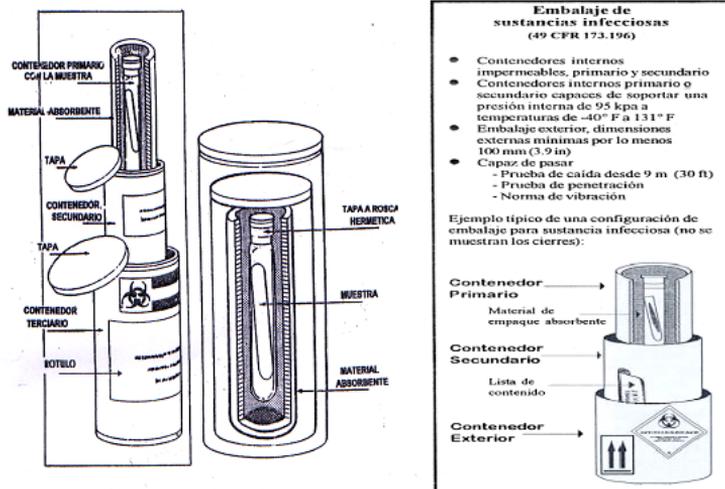
La extracción debe realizarse con material descartable.

Separar el suero sobrenadante con *tips* descartables y envasar en recipiente de cierre hermético, preferentemente de plástico con rótulo identificatorio y fecha de extracción concordante con los datos registrados en la ficha epidemiológica.

Si la muestra de suero se procesa dentro de las 48 h, conservar en heladera a temperatura de 2 a 8 °C. En caso de ser derivado congelar.

Enviar no menos de 2 ml de suero.

Excluir sueros lipémicos o con intensa hemólisis.



Forma correcta de envío de muestras al laboratorio

ENVASE PARA ENVÍO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Identificar la muestra (rotular) con número y datos del paciente que concuerden con los de la ficha.

Colocar la muestra en el envase primario (preferentemente de polipropileno), con tapa a rosca.

Recipiente Primario: es el tubo que contiene la muestra, debe ser hermético y a prueba de fugas de líquidos.

Envolver él o los envases primarios con material absorbente.

Introducir en el envase secundario: Se ubican los recipientes primarios en posición vertical.

Agregar material absorbente para impedir cualquier movimiento durante el traslado.

Cerrar la tapa a rosca del envase secundario de plástico.

Introducir el envase secundario en el envase terciario. En él se coloca el recipiente secundario y refrigerantes en cantidad suficiente para mantener la temperatura.

Sobre la tapa del envase secundario. Incluir la información sobre la muestra (ficha) con n° y datos del paciente que concuerden con los del rotulo del envase primario.

Cerrar el envase terciario.

Adherir la etiqueta autoadhesiva, identificando el contenido como material infeccioso y/o perecedero.

Asegurar el cierre con cinta transparente de embalaje.

En la parte exterior de la caja:

Nombre, Apellido, dirección y Tel del remitente

Nombre, Apellido, dirección y Tel del receptor.

Una flecha que indique la posición de la caja.

Un rótulo que indique: “Envío con Sustancia Infecciosa - Riesgo Biológico-Despacho Urgente y Preferencial”

RECEPCION Y REGISTRO DE MUESTRAS

OBJETIVO: Recepción del material y acondicionamiento necesario del mismo para realizar las pruebas diagnósticas de laboratorio. Registrar los datos del paciente, el organismo estatal o privado que deriva la muestra y los epidemiológicos, bioquímicos, u otros datos de interés.

DESARROLLO: ORGANIGRAMA DE TRABAJO

MATERIAL RECIBIDO PARA DIAGNÓSTICO HUMANO O ANIMAL

Estudios Serológicos

Cultivos (sangre, orina, LCR, humor vítreo)

Todo material recibido debe tener su rotulo, con los datos del paciente adherido y con la correspondiente planilla coincidente en un todo con los datos del rotulo. La ficha de salud debe estar firmada por el médico actuante.

REGISTRO DE MUESTRAS: ORDENAMIENTO DE DATOS

Una vez comprobada la integridad de la muestra, y su conformidad, coincidiendo con los datos de la ficha asignar un número del LCSP interno correlativo:

Para aislamientos: aclarar medio utilizado y cantidad de tubos usados.

En caso de recibir suero y sangre u orina del mismo paciente deben llevar 2 números de muestras diferentes).

A) DATOS VOLCADOS EN LIBRO DE REGISTRO

*Fecha

*N° de muestra:

*Nombre de paciente, edad

*Días de evolución de la enfermedad.

*Muestras humanas: rótulo rojo

*Muestras de origen animal: rótulo verde

*Nombre del establecimiento, hospital o institución que deriva.

*Datos del médico interviniente

*En caso de tratarse de 2° o 3° muestra, n° de muestra anterior.

*Resultado de la prueba.

Debe anotarse al margen del libro del acta cualquier dato de interés para los analistas, como por ejemplo el hecho de haber recibido terapia antibiótica previamente a la realización de la toma de muestra.

B) ORDENAMIENTO DE PLANILLAS

Las fichas epidemiológicas enviadas por los organismos o establecimientos de Salud que corresponden a los estudios previos de laboratorios bioquímicos y otros datos de interés epidemiológicos se almacenan en la carpeta rotulada: “Ficha de muestras epidemiológicas”, correspondientes al año: solicitud de DIAGNÓSTICO y con el número correspondiente.

ENTRADA A SEROTECA

Si luego de realizar el análisis de los sueros recibidos, queda remanente, el mismo puede ser almacenado en la seroteca. Si el envase que contiene el suero no es el adecuado colocar el suero en crioviales de 2ml debidamente rotulados con el número correspondiente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE LOS CULTIVOS

Las leptospiras pueden cultivarse *in vitro*, en medios de cultivo especiales, pero requieren determinadas condiciones relacionadas con la temperatura, el pH y la aerobiosis de los medios de cultivo. No siempre se logra el desarrollo, debido, entre otras cosas, al escaso número en que pueden estar presentes.

Cuando un cultivo es negativo, no se descarta la inexistencia de la enfermedad, pues pueden ocurrir varias cosas:

- que haya escaso número de microorganismos en la muestra.
- que los mismos estén presentes pero que no se adapten al medio de cultivo.
- que existan sustancias inhibitoras en los tejidos.

Por eso es que la técnica de cultivo hay que interpretarla, teniendo en cuenta estos factores y no descartar la presencia de leptospirosis ante un resultado negativo. Por otro lado un aislamiento de leptospiras, no significa necesariamente que el microorganismo sea la causa de la signología/sintomatología sea la responsable de la enfermedad, debido a los largos períodos de eliminación del microorganismo por orina (1 mes a años). Un aislamiento a partir de sangre, sí se relaciona con la enfermedad.

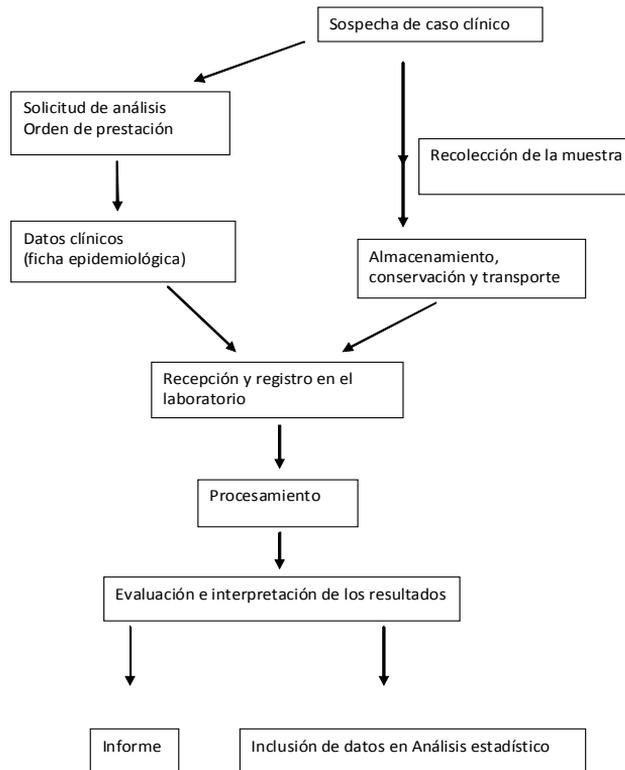
Pautas básicas de la interpretación del aislamiento de leptospiras en animales.

1. Demostración de leptospiras en sangre de animales sospechosos de padecer la enfermedad debe ser considerado diagnóstico.

2. Demostración de infección generalizada en numerosos órganos en la necropsia también debe ser considerado diagnóstico.

3. Demostración de leptospiras en el tracto genital, riñones u orina, sólo debe interpretarse junto con los signos clínicos, de lo contrario sólo puede hablarse de “portador”.

FLUJOGRAMA DIAGNOSTICO



4. La falla en demostrar leptospiras en la orina de los animales NO elimina la posibilidad de que esos animales no sean portadores, sólo indica que “en ese momento” no estaba eliminando por orina un número detectable de microorganismos.

5. Si 3 búsquedas consecutivas (1 por semana) a partir de orina es NEGATIVO, entonces consideramos al animal como que NO está excretando leptospiras.

B - INTERPRETACIÓN DE LA OBSERVACIÓN EN FRESCO

Es posible hacerla a partir de sangre, orina, leche y suspensiones de órganos. Se realiza con microscopio de fondo oscuro y es el único método apto para visualizar las leptospiras vivas. La búsqueda requiere mucho tiempo, a causa del escaso número de leptospiras que frecuentemente hay en algunos materiales destinados al diagnóstico. Además, por la aparición intermitente de estos microorganismos en sangre, orina y otros materiales, está demostrado que en menos del 10 % de los casos probadamente positivos se llegan a visualizar las leptospiras en sangre.

C - INTERPRETACIÓN DE LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS

Es muy importante tener en cuenta que:

En la leptospirosis, los anticuerpos aparecen a partir de la segunda semana de la enfermedad, aumentando rápidamente, hasta alcanzar títulos máximos alrededor del mes de iniciado el cuadro.

Se deben examinar por lo menos dos muestras de suero, una después de la primera semana y la otra a los diez días, para comprobar la conversión del título.

Las pruebas serológicas sirven para confirmar una infección leptospirósica pasada o actual, el serovar que ha producido la infección sólo se confirma a través del aislamiento.

No debe descartarse que una temprana administración de antibióticos, puede detener el desarrollo de los anticuerpos, los que pueden aparecer más tarde, después de haber realizado la prueba serológica con resultado negativo, pueden aumentar el título en forma muy baja e incluso no aparecer.

Ocasionalmente aparecen iguales títulos de anticuerpos para dos o más antígenos, simultáneamente (co aglutinación). Esto puede deberse a que el paciente esté al comienzo de la enfermedad. En estos casos, la serovariedad causante no ha producido una respuesta específica en el escaso tiempo transcurrido, porque solo han actuado antígenos comunes a varias serovariedades (IgM). La repetición de la prueba una semana después, podrá determinar la elevación de los anticuerpos específicos (IgG).

MEDIOS DE CULTIVO PARA LEPTOSPIRAS

MEDIO DE KORTHOFF

| | |
|------------------------------------------|---------|
| Peptona | 0,8 g |
| Cloruro de sodio | 1,4 g |
| Fosfato ácido de sodio 2H ₂ O | 0,88 g |
| Fosfato monopotásico | 0,24 g |
| Carbonato de sodio | 0,02 g |
| Cloruro de calcio | 0,04 g |
| Cloruro de potasio | 0,04 g |
| Agua destilada c.s.p. | 1000 ml |

Se calienta 20 minutos a ebullición suave. Se deja en reposo hasta el día siguiente para favorecer la precipitación. Se filtra por papel de filtro (Watman N° 1 o similar), se ajusta el volumen a 1000 ml y se calienta a 100 °C durante 20 minutos en dos días sucesivos.

El pH de esta solución límpida es de 7,2 aproximadamente. Se agrega 5 a 10 % de suero de conejo estéril. Se recomienda el uso de un pool de sueros de 20 conejos por lo menos, en la preparación de los medios. Si no es estéril, se lo debe esterilizar por filtro o membrana. Además del suero, se agrega 0,8 % de hemoglobina, o de otra forma, se puede utilizar suero levemente hemolizado de conejo. Se puede adicionar vitamina B₁₂ en una concentración final de 1 µg por ml de medio. Se controla el pH de 7,2 a 7,4, se distribuye en forma estéril en tubos, se calienta en baño María a 56 °C durante 30 minutos, dos días sucesivos, se incuba durante 4 días a 28 °C para el control de esterilidad.

MEDIO DE STUART

| | |
|----------------------|----------|
| Asparagina | 0,132 g |
| Cloruro de Amonio | 0,268 g |
| Cloruro de Magnesio | 0,406 g |
| Cloruro de Sodio | 1,80 g |
| Fosfato disódico | 0,660 g |
| Fosfato monopotásico | 0,087 g |
| Rojo de fenol | 0,010 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
| Suero de conejo | 8 a 10 % |
| Glicerina | 5 ml |

Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a menos de 50 °C y agregar en forma estéril el suero de conejo preparado de igual forma que el medio de Korthoff. Llevar el pH a 7,2 - 7,4, distribuir en tubos estériles, controlar en estufas a 28 - 30° C, durante 4 días.

MEDIO DE FLETCHER

| | |
|-------------------|--------|
| Peptona | 0,3 g |
| Extracto de carne | 0,2 g |
| Cloruro de sodio | 0,5 g |
| Agar | 1,5 g |
| Agua destilada | 920 ml |
| Suero de conejo | 80 ml |

Calentar el medio base hasta disolver el agar. Esterilizar autoclavando a 120 °C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C o menos y agregar un pool de sueros de 20 conejos por lo menos, en una concentración final de 8 a 10 % en forma estéril. Mezclar para obtener una solución uniforme. Distribuir asépticamente e inactivar el medio total a 56 °C por una hora ese día y otra el día siguiente. El pH de este medio debe ser 7,8 - 8,0.

MEDIO DE ELLINHAUSEN (de mayor uso mundialmente en la actualidad)

A - Con el agregado de albúmina y Tween 80.

| | |
|----------------------------------------|---------|
| Cloruro de amonio | 2,5 g |
| Sulfato de Zinc 7 H ₂ O | 0,4 g |
| Cloruro de calcio 2 H ₂ O | 1,0 g |
| Cloruro de magnesio 6 H ₂ O | 1,0 g |
| Sulfato de hierro 7 H ₂ O | 0,5 g |
| Sulfato de cobre 5 H ₂ O | 0,3 g |
| Glicerol | 10 ml |
| Tween 80 | 12,5 ml |
| Tiamina | 0,5 g |
| Bitamina B12 | 0,02 g |
| L - aspargina | 3 g |

Se hacen soluciones stock, diluyendo en 100 ml de agua destilada, cada uno de las siguientes drogas por separado:

No es necesario ajustar el pH en las soluciones de stock.

Preparación del medio base:

| | |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Fosfato ácido de sodio (Na ₂ HPO ₄) | 1 g |
| Fosfato ácido de potasio (KH ₂ PO ₄) | 0,3 g |
| Cloruro de sodio | 1 g |
| Cloruro de amonio | 1 ml de la solución de stock |
| Piruvato de sodio | 1 ml de la solución de stock |
| Tiamina | 1 ml de la solución de stock |
| Glicerol | 1 ml de la solución de stock |
| Agua destilada c.s.p | 900 ml |

Esterilizar por calor a 120 °C durante 20 minutos.

Suplemento de albúmina

| | |
|--------------------------------|---------|
| Fracción V de albúmina bovina | 10 g |
| Cloruro de calcio sol. Stock | 1 ml |
| Cloruro de magnesio sol. Stock | 1 ml |
| Sulfato de Zinc sol. Stock | 1 ml |
| Vitamina B12 sol stock | 1 ml |
| Sulfato de cobre sol. Stock | 0,1 ml |
| Sulfato de hierro sol. Stock | 10 ml |
| Tween 80 sol stock | 12,5 ml |
| Agua destilada c.s.p. | 100 ml |

Se recomienda mezclar en 100 ml de agua destilada, la albúmina bovina y luego agregar lentamente, al tiempo que se agitan los demás componentes (se puede utilizar agitador magnético para acelerar el proceso). Finalmente, completar el volumen hasta 200 ml con agua destilada y ajustar el pH 7,4. Se esteriliza por filtración. El medio de albúmina y Tween 80 completo se prepara tomando 1 volumen del suplemento de albúmina Tween 80 más 9 volúmenes de medio base (de ahí que las soluciones bases y el suplemento contengan esos volúmenes finales).

B - Con el agregado de suero de conejo

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Solución de stock de L-asparagina | 5 ml |
| Cloruro de calcio | 1 ml |
| Cloruro de magnesio | 1 ml |
| Suero de conejo | 100 ml |

Ajustar a pH 7,4

Se esteriliza por filtración. Luego se incuba a 37 °C durante 18 horas; mezclar 1 volumen de suero de conejo, más 9 volúmenes de medio base.

SOLUCIÓN FISIOLÓGICA BUFFERADA (P.B.S.)

Solución Sorensen

a) Solución de fosfato disódico anhidro: 8,33 g

b) Solución de fosfato monopotásico: 1,09 g

Disolver a) y b) en 1000 ml. de agua destilada.

Solución fisiológica

Disolver 8,5 g de ClNa en 1000 ml de agua destilada.

Para la preparar solución fisiológica bufferada (PBS) disolver:

| | |
|----------------------|--------|
| Solución fisiológica | 920 ml |
| Solución Sorensen | 80 ml |

Control de medios de cultivo

1.-Controlar el pH de cada lote de cada medio preparado luego que se haya enfriado a temperatura ambiente. Para hacerlo en medios líquidos se pueden utilizar tiras reactivas para medición de pH o utilizar un electrodo de inmersión según instrucciones del peachimetro. Si se utilizan medios semisólidos permitir que se solidifique el agar alrededor del peachimetro.

2.-Apariencia de los medios: se debe controlar que los tubos con el medio no presenten volumen insuficiente, presencia de partículas visibles al agitar el tubo con movimientos rotatorios suaves, o presencia de colorantes.

3.- Control de esterilidad: Para verificar la esterilidad del medio, tome una muestra equivalente al 5-10 % del total del lote producido, incube en estufa de 30 °C durante 48 h.

A) Posteriormente se observa al microscopio la presencia/ausencia de microorganismos viables.

B) De los mismos tubos controlados se realiza un repique en:

* agar tripticasa de soya en placas de petri y se ponen a incubar a 30 °C durante 48 h.

* caldo tioglicolato en tubos con anillo superior de vaselina incubar a 30 °C 5 días.

Descartar el lote completo si el nivel de contaminación es significativo (>10 %).

En una carpeta especialmente diseñada se deben anotar la fecha de preparación del medio, las drogas junto al peso y/o volumen de las mismas utilizadas, el stock remanente de las mismas (si es posible fechas con vencimiento) y el control de calidad realizado sobre dicho medio.

Recuperación y prevención de cepas contaminadas

Método físico:

Filtración: las bacterias son retenidas en los filtros, mientras que las leptospiras, por su fino espesor, atraviesan los poros de las membranas filtrantes.

Se pasa el cultivo por un filtro de membrana de 0,22 µm y se siembra el filtrado, directamente en un medio especial para leptospiras. Este método solo sirve, cuando hay muchas leptospiras en el cultivo. Se pueden utilizar filtros estériles para jeringas individuales o filtros de membrana de 45 mm de diámetro en con portafiltros reesterilizables o descartables cuando el volumen supere los 10 ml.

Método químico:

a) Con 5-fluorouracilo

Solución I: 20 ml de solución buffer de fosfatos 1M, pH 7,4

1 ampolla de 5 ml = 250 mg de 5-fluorouracilo

Solución II: 27 ml de solución buffer de fosfatos 1M, pH 7,4 + 3 ml de la Solución I.

Siembra: 0,5 ml de Solución II, más 4,5 de medio de cultivo líquido para leptospiras. Se agrega 0,1 ml de cultivo contaminado de leptospiras como inóculo.

b) Con neomicina

El uso de sulfato de neomicina es un recurso apropiado para la mayoría de los laboratorios, por el fácil acceso a la droga.

Si se emplea el Medio Fletcher (semisólido), debe agregarse una concentración final entre 5 y 25 µg/ml de dicha droga.

Si se usa el Medio de Ellinhausen (líquido), la concentración final puede aumentarse hasta 300 µg/ml de neomicina.

Método biológico:

Inoculación en cobayos:

Se siembra y se procede de la siguiente manera:

Se emplean cobayos recién destetados de 150 a 200 g de peso.

Se inoculan dos de ellos con 0,5 ml del cultivo contaminado, a uno por vía subcutánea y el otro por vía intraperitoneal. A partir del cuarto día, se toma la temperatura rectal, diariamente, de mañana y de tarde, hasta el noveno día. Cuando la temperatura se eleva por encima de los 39 °C, se hace una extracción de sangre por vía intracardiaca a los 10 y a los 20 min y se siembra en dos series de tubos, cada una con un medio de cultivo distinto, colocando una, dos, tres y cuatro gotas de sangre respectivamente (Ver punto 1.1).

La incubación es a 28 °C durante 60 días. Esto está justificado por el posible fracaso de los cultivos, el conocido resguardo que brindan los pasajes ciegos.

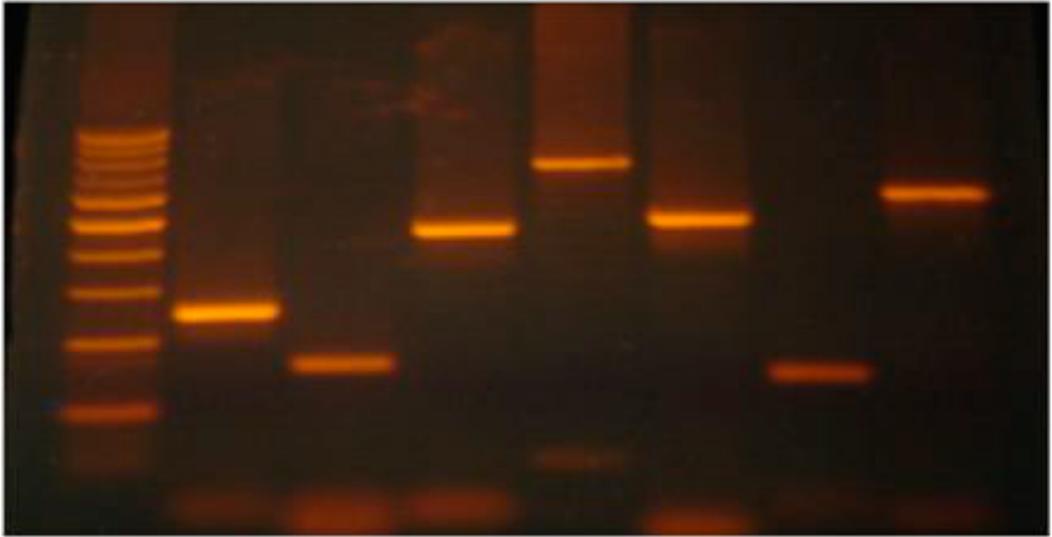
Con esta sangre febril, se reinoculan dos cobayos del mismo modo, con idénticos controles y procedimientos.

Los cultivos se examinan en microscopía de fondo oscuro, semanalmente durante 45 a 60 días.

Todas estas técnicas se emplean para la purificación de los cultivos contaminados.

Detección molecular de Leptospiras

Actualmente el desarrollo de técnicas moleculares tales como hibridación *in situ* o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten un diagnóstico sensible y precoz de muchas enfermedades infecciosas, especialmente cuando el agente etiológico es difícil de aislar o de lento desarrollo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) corresponde a una técnica de diagnóstico molecular, basada en la amplificación de un determinado fragmento específico de ADN en una mezcla de material genético, obtenido desde la muestra en estudio. Para ello se requiere el conocimiento de la secuencia a amplificar, que recibe el nombre de ADN blanco o target ADN, la que permite la identificación específica del organismo de interés.



Identificación de leptospiras por biología molecular.

Dos puntos fundamentales deben tenerse en cuenta al momento de elegir un diagnóstico basado en PCR. Por un lado el origen de la muestra (sangre, orina, semen, tejidos) y método de extracción del ADN ya que muchos factores podrían actuar como inhibidores de la enzima polimerasa dando resultados falsos negativos. Mientras que otro punto crítico es la elección de la secuencia blanco o target que otorgará mayor o menor especificidad a la prueba.

Varios protocolos de PCR se han publicados para el diagnóstico de leptospirosis a partir de diversas muestras clínicas tanto en humanos como en animales. Sin embargo sólo dos se han sometido a una extensa evaluación clínica. El protocolo de Merien et al. (1995) es un ensayo genero específico ya que los cebadores están dirigidos a una secuencia del gen *rrs* del ARNr la cual amplifica especies patógenas y no patógenas. Por el otro lado el ensayo descrito por Gravekamp et al. (1993) utiliza dos pares de cebadores a fin de amplificar todas las especies patógenas. En las últimas décadas se han descrito nuevos protocolos dirigidos a genes que codifican proteínas de la membrana externa como *lipL32*, *secY*, *ligA*, *ligB* altamente conservados y presentes sólo en las especies patógenas.

Con relación a la leptospirosis las técnicas basadas en PCR constituyen una herramienta fundamental cuando el aislamiento está comprometido por la falta de viabilidad del agente, baja intensidad de excreción, material clínico contaminado o sometido a conservación inadecuada. Al igual que con el cultivo, el tratamiento con antimicrobianos puede ocasionar resultados falsos negativos sin embargo se requieren múltiples dosis de antibióticos para obtener un resultado negativo con la técnica de PCR ya que detecta tanto leptospiras viables como no viables.

Introducción a la Bioseguridad

Los errores humanos y las técnicas incorrectas pueden poner en peligro incluso las mejores medidas destinadas a proteger al personal de laboratorio. Por esta razón, el elemento clave para prevenir las infecciones adquiridas, los incidentes y los accidentes en el laboratorio es un personal preocupado por la seguridad y bien informado sobre la manera de reconocer y combatir los peligros que entraña su trabajo en ese entorno. En consecuencia, la formación continua en el servicio acerca de las medidas de seguridad es primordial.

Los errores humanos, las técnicas de laboratorio incorrectas y el mal uso del equipo

Son la causa de la mayoría de los accidentes de laboratorio y las infecciones conexas.

1. Riesgo de inhalación (es decir, formación de aerosoles): uso de ansas, siembra de placas de agar, pipeteo, preparación de frotis, apertura de recipientes de cultivo, toma de muestras de sangre/suero, centrifugación, entre otros.
2. Riesgo de ingestión al manipular muestras, frotis y cultivos.
3. Riesgo de inoculación cutánea al emplear jeringuillas y agujas.
4. Riesgo de mordeduras y arañazos en la manipulación de animales.
5. Manipulación de sangre y otros materiales patológicos potencialmente peligrosos.
6. Descontaminación y eliminación de material infeccioso.

Normas generales de seguridad para los laboratorios de la Leptospirosis

Recomendaciones de seguridad

Mantenga el área de laboratorio y la administración tan distantes como sea posible.

Asegúrese que el lugar de trabajo este ordenado y posea una superficie de fácil limpieza. Mantenga los bancos y los lugares de trabajo con la menor cantidad de objetos como sea posible.

No sentarse en áreas de Trabajo. Los lugares de trabajo y piso deben mantenerse ordenados.

Zonas de trabajo del laboratorio

1. El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
2. Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.

3. Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar.
4. El embalaje y el transporte de material deberán seguir la reglamentación nacional o internacional aplicable.
5. Las ventanas que puedan abrirse estarán equipadas con rejillas que impidan el paso de artrópodos.

Protección personal

1. Se usarán en todo momento uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
2. Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
3. El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
5. Estará prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo en cantinas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal y baños.
6. En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
7. Estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.

Procedimientos

1. Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
2. No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.
3. Todos los procedimientos técnicos se practicarán de manera que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles y gotículas.
4. Se limitará el uso de jeringas y agujas hipodérmicas, que no se utilizarán en lugar de dispositivos de pipeteo ni con ningún fin distinto de las inyecciones por vía parenteral o la aspiración de líquidos de los animales de laboratorio.
5. Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio. Se mantendrá un registro escrito de esos accidentes e incidentes.
6. Es aconsejable la medicación profiláctica en caso de accidentes del personal. Se deben tomar precauciones mientras se manipula material fresco, suero o sangre de pacientes sospechosos.

7. Se elaborará y seguirá un procedimiento escrito para la limpieza de todos los derrames.

8. Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos) antes de eliminarlos por el colector de saneamiento. Puede ser necesario un sistema de tratamiento de efluentes, según lo que indique la evaluación de riesgos del agente con el que se esté trabajando.

Vacunación

Cuando nos referimos a la inmunización en la población humana, debemos tener perfectamente claro cuál es el nivel real de la cohorte poblacional considerada en riesgo, ya sea desde el punto de vista profesional, laboral o recreacional, los beneficios que se obtendrán con la misma y además su factibilidad teniendo en cuenta las ecuaciones costo/beneficio/efectividad. Las experiencias con respecto a la vacunación contra la leptospirosis, se remontan a la segunda década del siglo XX, a partir de vacunas elaboradas con bacterias muertas por formol o calor, cuando Ydo y Wani inocularon obreros de las minas de carbón en Japón. A partir de estas primeras experiencias en algunos países como Italia, España, Polonia, Israel y en las últimas décadas Australia, Francia, Japón, Cuba se han abocado a la estandarización y producción de vacunas a gérmenes muertos por formol coadyuvadas con hidróxido de aluminio.

Últimamente, se está tratando de obtener en forma purificada, los antígenos de envoltura (ej. Lip32), de naturaleza glucolipídica, responsables de la respuesta inmune.

La manera de administrar la vacuna en medicina humana, es por vía sub cutánea, en dos dosis espaciadas en 15 días y con refuerzos a los 6 meses, 2 años y 4 años, manteniéndose de esta manera buenos títulos de anticuerpos. En nuestro país se han comenzado en la provincia de Santa Fe, con los primeros ensayos de vacunación en humanos sin resultados evaluables hasta el presente. Siendo sí frecuente su uso en medicina veterinaria.

Antibioterapia y quimioprofilaxis

El tratamiento con antibióticos, en general reduce la fiebre y las complicaciones a nivel de los órganos afectados, acortando el periodo de evolución. El antibiótico de elección es la doxicilina, pudiéndose utilizar también, eritromicina; en otros antibióticos como la penicilina, ampicilina o amoxicilina tienen algunas dudas sobre su efectividad por estudios realizados en doble ciego. La quimioprofilaxis, se aconseja implementarla solamente en convivientes con infectados o en aquellos que ingresen a zonas con 5 % o más de incidencia de la enfermedad mediante doxicilina.

Bibliografía

- Arias D, Bartolucci E, Stanchi N., Desarrollo de la técnica de enzimo inmuno ensayo para el diagnóstico de la leptospirosis canina. II Encuentro Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 30 marzo, 1993
- Arias D, Arauz S, Stornelli A, Stanchi N. Prevalencia serológica a tres cepas de *Leptospiras* en caninos de La Plata, Berisso y Ensenada. Segundas Jornadas Hospitalarias de Medicina Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Buenos Aires. 1997
- Arias, D, Arauz S, Stornelli A, Stanchi N, Renner E, Martino P, Gatti M. Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología por ensayo inmuno enzimático (ELISA) en leptospirosis canina. *Revista Biomédica (México)* 10:167-172, 1999.
- Barbosa W. Leptospirose, epidemiologia e fisiopatologia. *Revista de Patología Tropical / Brasil* 1 (1) 5 – 27. 1972.
- Bollin CA, Koellner P, Human to human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J. Infect. Dis.* 158: 246 – 247. 1988.
- Caminoa R. Leptospirosis: epidemiología, clínica y diagnóstico. *Boletín Departamento de Zoonosis Rurales de Azul.* Marzo 1993.
- Centro Panamericano de Zoonosis. Métodos de laboratorio para leptospirosis. Nota técnica No 9. Abril 1968.
- Centro Panamericano de Zoonosis. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio. Leptospirosis. Nota Técnica No 30. 1985.
- CDC. Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlons. Wisconsin and Illinois. *MMWR* 47: 585 – 588. 1998
- Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis. Manual de Leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Avellaneda 1994.
- Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis. Manual de Leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Avellaneda 1996.
- Correa M, Veronesi R, De Brito T. Leptospiroses. Veronesi Doencas, infecciosas e parasitarias. Ed. Guanabara – séptima Edic. 573 – 592. 1987.
- International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae Minutes of the closed meeting, 20 September 2011, Mérida, México.
- De Brito T. Patogénesis of de hepatic and renal lesión in leptospirosis. *Revista Instituto de Medicina Tropical. Brasil* 1 (1) 5 – 27. 1972.
- Edwards CH, Nicholson G. Thrombocytopenia in Leptospirosis, the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *A.J. of Tropical Med. And Hyg.* 35 (2): 352 – 354. 1973.
- Edwards CH, Nicholson G. Penicillin therapy icteric Leptospirosis. *A. Jour. Of Trop. Med. And Hyg.* 39: 388 – 390. 1988.
- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No. 67). 171pp. (1982).
- Farrar EW. Especies de *Leptospira*. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, cuarta edición; 2396 – 2400. 1995.
- Friedland JS, Warrel DA. The Jarish Herxheimer reaction in leptospirosis. Possible pathogenesis and review. *Rev. Infect. Dis.* 13 : 207- 210. 1991
- Fundacao Nacional de Saude. Manual de Leptospirose. Ministerio de Saude. CENEPY – Centro de Cordenacao de Zonosis e Animais Peconheptos. Brasilia, 1997.
- Gatti M, Arias D, Rosetti C, Selva S, Copes J, Laplace R, Martino P, Stanchi N. Aislamiento de *Leptospira biflexa* a partir de aguas del lago del zoológico de La Plata, Argentina. *Analecta Veterinaria* 24 (1): 18-20, 2004.
- Gravecamp C, Van de Kemp H, Franzem M. Detection on seven species of pathogenyc leptospire by PCR, using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1691 - 1700. 1993
- Gusenhouen GL, van der Hoorn M, Goris MC, Terpstra WD, Hartkeerl PA, Moll BM. Dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immuno globulin M antibodies in humman sera. *J. Clin. Microbiol.* 35: 92 – 97. 1997
- Hookey JB. Detection of leptospirosis by amplification of 16s ribosomal DNA. *Microbiol. Lett.* 90: 267 – 274. 1992
- Jackson LA., Kaufmann AF., Adams WG. et al.. Outbreak of leptorpirosis associated with swimming. *Pediatr. Infect. Dis.* 12: 48 – 54. 1993
- Jawetz E, Melnick J, Adelnerg E. Espiroquetas y otros organismos espirilares. Manual de Microbiología Médica. Novena Edic. 244 – 251. 1983.
- Levett PN, Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 14: 296 - 326. 2001.
- Liceras J, Valdivia S, Higuchy E. Leptospirosis en el Peru. *Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria, Ministerio de Salud, OPS, CONCYTEC, Lima:* 7 - 19. 1989.
- Macedo V, Figueredo J, Carvalho E., Barbosa. Coagulacao intravascular disseminada na leptospirose. *Revista de*

Patología Tropical, 3 (2) 363 – 366.1973

Mac Calain JB, Ballou WR, Harrison SM. Doxyciline therapy for Leptospirosis. An Intern. Med. 100: 696 – 698. 1988

Martino P, Stanchi N. La cría de animales pelíferos y las zoonosis. World Animal Review/FAO 72, 3:34-36, 1993

Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparisson of polymerase chain reaction with microagglutination test and cultural diagnosis of leptospirosis. J. Infect. Dis. 172: 281 – 285. 1995

Orellana JS, Pascual IL. Leptospirosis en el Partido de Brandsen. Comunicación. 1° Congreso Zoonosis de la Provincia de Buenos Aires. Acta Bioquim. Clin. Agosto 2003.

Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3a ed.2005 Ginebra , Suiza 210 pp.

Pereira S. Leptospirosis. Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Universidad de la República. Uruguay 1999.

Sandow K, Ramírez W. Leptospirosis. Centro de Estudios Prevención y Mitigación de Desastres Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de Granma. Carretera de Manzanillo km.17 1/2, Paralejo, Bayamo. Granma Cuba <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/zavtor>.

Sanford JP. Leptospirosis, Harrison's Principles of Internal Medicine; Branwald, Isselbacher, Petesdorf, Wilson, Fauci. 11 ed.. Mac Graw-Hill Book Company 652 – 655.1987.

Seijo A. Manual de Leptospirosis. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Comisión Científica Permanente sobre leptospirosis.1996.

Seijo A. Vacunas y vacunaciones en leptospirosis. 2° Congreso Argentino de Zoonosis. 1998.

Stanchi N. Leptospirosis. Un problema de nuestra ganadería. Rev. INTA Traslasierra 5:27 29,1983

Stanchi N, Martino P, Martino J, Calvo J. Leptospirosis en animales silvestres y en animales de piel. Rev.Med. Vet.(Bs.As.) 68, 2:80 85, 1987

Stanchi N, Grisolia C, Martino P, Peluso F. Presencia de anticuerpos anti Leptospiras en ofidios de Argentina. Rev.Arg.Microbiol. 18, 3/4:127 130, 1987

Stanchi N, Anticuerpos antileptospiras en secreción láctea de bovinos y su relación con el estado sanitario mamario. Vet.Arg. 5, 49:762 766, 1988

Stanchi N, Martino J. Aglutinación microscópica para Leptospiras en suero de leche y su relación con valores en suero sanguíneo. Rev.Asoc.Colombiana Med.Vet. y Zoot. 13, 1:8 12, 1989

Stanchi N, Francini F, Peluso F, Grisolia C. Investigación de Leptospirosis en *Bufo arenarum*. VI Reunión de Comunicaciones Herpetológicas. Río Cuarto. 1989

Stanchi N. Estudio serológico de Leptospirosis en Bovinos de la Provincia de Buenos Aires. Vet.Arg. 6, 56:384 387, 1989

Stanchi N, Pennimpede E, Gomez C. Serología de la Leptospirosis experimental en cobayos (*Cavia porcellus*). Fenómeno de zona. Acta Bioq. Clin. Latin. 25, 1,:29 31 ,1991

Stanchi N., Francini F., Peluso F., Grisolia C., *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri* aislada de sapos (*Bufo arenarum*) de Argentina. Comunicación Previa. Therios 17, 84:198 201, 1991 Resumen en Bol.Asoc.Herpetol. Arg. 5, 3:1,1989

Stanchi N. Pennimpede E, Cerda R. Estudio serológico y bacteriológico de Leptospirosis bovina en planta frigorífica faenadora de Argentina. Comunicación Previa. Therios 18, 86:13 15, 1991

Stanchi N, Martino P. Evaluación clinicopatológica de la Leptospirosis experimental con *Leptospira interrogans* serovar *pomona* en sarigüeyas (*Didelphys albiventris*). Avances en Cs.Vet.(Chile) 6, 2:180 184, 1991

Stanchi N.O., Arias D.O., Consideraciones de la leptospirosis en Argentina. Rev. Avances en Medicina Veterinaria (Argentina). 1,1:20-21, 1997

Stanchi N, Martino P. Estudio serológico de Leptospirosis experimental en Nutrias (*Myocastor coypus*). Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes. 3 (1): 5-8, 2005.

Stanchi N. El diagnóstico de la Leptospirosis. Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes. Vol 4 (2): 46-47, 2009.

Stanchi N, Giboin G, La Malfa J, Pracca G, Frigerio P, Fiocchi L, Becerra V, Bacigalupe D, Larsen A. Estudio exploratorio de la Toxoplasmosis y Leptospirosis en pequeños rumiantes y animales de granja en el departamento de La Capital, San Luis. Vet. Cuyana. Año 5: 55-57; 2010.

Stanchi N, Brihuega B, Gatti M. Leptospiras. p. 189-195 Microbiología Veterinaria. 2006 (ISBN 950-9715-38-7 2da. edición)

Stanchi N. Leptospiras y borrelias. Microbiología Biomédica. Basualdo-Coto-de Torres- Editores. Editorial Atlante, 2° edición. ISBN 950-9539-47-3 Cap. 45 p. 502-508, 2006

Stornelli A, Arauz S, Arias D, Stanchi N, Renner E. Leptospirosis canina. Revisión Médica. Selecciones Veterinarias (Argentina). 7,5: 544-547,1999

Swiader L, Disdier P, Retornaz F, Pauzier F, Hacle JR, Weiller PJ. Reaction of Jarish Herxheimer curse d' una leptospire. Press Med. 24 (37) 1753. 1995

Trebejo RT, Rigau Perez JG, Ashford DA. Epidemic Leptospirosis, associated with pullmonary hemorrhage. Nicaragua. J. Infect. Dis. 178: 1457 – 1463.1988.

- Viana Martin ES, Castineira TM, Leptospirase Doencas Infeeciosas, conducta diagnostica e terapeutica . Ed. Guanabara: 94 – 104. 1998.
- World Health Organization. ILS Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Malta. 105 pp
- World Health Organization Country office for India. Leptospirosis, Laboratory manual. Indian Council of Medical Research. V. Ramalingaswami Bhawan, Ansari Nagar, Post Box 4911, New Delhi. 2007 70 pp.
- Zaki ZR., Shieh WJ., Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage. Nicaragua. Lancet 347: 535 – 536. 1996
- Zinnser W. Microbiologia. Ed. Panamericana 20 edic.: 909 – 915. 1997.
- Vaughan C, Cronin CC, Walsh EK, Whelton M. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis. Postgrad Med J. 1994 February; 70 (820): 118–121.
- Zuerner RL, Herrmann JL, Saint Girons I. Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. J Bacteriol. 1993 September; 175 (17): 5445–5451.

La leptospirosis como enfermedad zoonótica representa un desafío de muchos médicos y veterinarios en lograr un diagnóstico clínico. La mayoría de las veces sólo el diagnóstico de laboratorio es el que en definitiva define el caso. Sin embargo uno de los problemas de los clínicos es justamente encontrar laboratorios que realicen alguna de las pruebas que aporten datos para definir la clínica. Las leptospiras son microorganismos difíciles de cultivar, aislar y mantener en el laboratorio; además la técnica de referencia es de realización tediosa y cara, esto lleva a que numerosos intentos de brindar el servicio de diagnóstico de leptospirosis fallen a poco de comenzar.

Intentamos en este material poner alguno de los aspectos principales del diagnóstico de la leptospirosis tanto para humanos como para animales.

Oscar Linzitto-Nestor Stanchi
Editores

ISBN 978-987-33-5783-1



9 789873 357831