



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza".

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

### REVISIÓN DEL FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE MICROAGLUTINACIÓN EN PLACA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LEPTOSPIRA INTERROGANS

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

PRESENTA:

MARÍA EVEN EZER ANGUAMEA FRAGA  
ESMERALDA RUIZ CARRILLO

NAVOJOA, SONORA

OCTUBRE DE 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



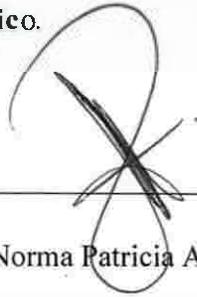
**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

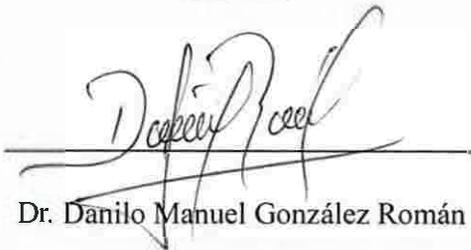
## APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignado para revisar la tesis profesional de **María Even Ezer Anguamea Fraga** y **Esmeralda Ruiz Carrillo**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



Dra. Norma Patricia Adan Bante

**Directora**



Dr. Danilo Manuel González Román

**Asesor**



Q.B. Martin Gustavo Echeverría Jacobo

**Asesor**



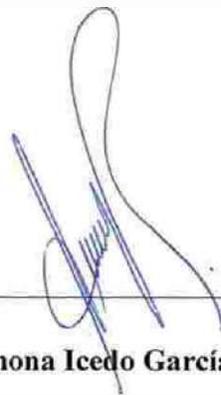
Dra. Guadalupe Gonzales Ochoa

**Asesor**

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

Se permite y agradece las citas breves del material contenido en este trabajo de Tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente al autor y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrito del manuscrito en cuestión del Director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'R' and 'G' intertwined, with a horizontal line crossing through the middle.

**M.C. Ramona Icedo García**

**Jefe de Departamento de Ciencias Químico Biológicas**

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

*Dedico y agradezco a Dios el presente trabajo por darme el privilegio de culminar este pedregano más en mi vida. Por poner en mi camino personas tan profesionales como lo son mis maestros de la Universidad De Sonora URS.*

*Agradezco a mi padre el Sr. Federico Anguamea Zamora por levantarse cada día muy temprano a ensuciar su ropa y sus manos siempre confiando que vendrán tiempos mejores para sus hijos, gracias por regalarme el esfuerzo de sus manos hasta la culminación de mi Licenciatura, por ser un padre ejemplar lleno de amor y palabras de sabiduría, por no dejarme caer nunca y acompañarme en este sueño hoy realizado. Gracias Papá*

*A mi madre la Sra. Carmen Fraga Rábago por siempre estar al pie del cañón procurando el bienestar para mi persona, por tener siempre esa paciencia para conmigo, por siempre confiar en mí que a pesar de muchas veces no regresar a mi casa desde tempranas horas de la mañana hasta altas horas de la noche por estar realizando mis actividades universitarias. Gracias Mamá*

*A Jonathán y Gineí por ser unos buenos hermanos, y porque en muchas ocasiones fueron la inspiración para salir adelante.*

*También agradezco a mi novio Manuel que ha sido mi compañero de la vida durante casi 9 años llenos de alegría y felicidad, gracias por apoyarme en todo lo que he realizado hasta el momento, por siempre impulsarme y hacerme sentir que soy capaz de lograr lo imposible.*

*Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Paty por regalarnos su tiempo que es lo más valioso que un ser humano pueda tener y que jamás regresa, por siempre tener una sonrisa para nosotras aunque su día sea muy difícil. Doctora estoy segura que usted es el orgullo de sus hijos y esposo. Gracias por su gran esfuerzo.*

*A mis sinodales que se tomaron el tiempo para revisar y dar observaciones muy importantes a mí el trabajo Dr. Danilo, Q. Echeverría y Dra. Lupita Gonzalez. Gracias maestros.*

*A mis amigos Lupita y Julián por ser una ayuda excepcional durante mi carrera y mi amiga y compañera de tesis Esmeralda.*

**Q.B.C María Even Ezer Anguamea Fraga**

*El corazón del entendido adquiere sabiduría; el oído de los sabios busca la ciencia*

*Proverbios 18:15*

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a Dios, por permitirme terminar mi estudios como Q.B.C. y llegar a la realización de esta Tesis para así titularme y ser toda una profesionalista, gracias por cada una de las enseñanzas que me transmitieron cada una de las personas que puso en mi camino.*

*Dedico y agradezco a mi padre Felipe Ruiz Márquez, por estar conmigo en todo momento, por apoyarme en todo y llevarme de la mano a este momento tan importante en mi vida, doy gracias por no dejarme caer nunca y darme ánimos de continuar por mas difícil que fuera la situación, papá lo amo con todo mi corazón.*

*Dedico y agradezco, a mi madre Bertha Carrillo Edesa, por estar conmigo, por apoyarme en cada momento, por darme cada uno de sus consejos que me ha hecho crecer, por estar conmigo en cada etapa de mi vida, por hacerme fuerte y capaz de superar cualquier obstáculo que la vida me ha puesto, que sin su apoyo no hubiera salido adelante, gracias mamá la aprecio y amo con todo mi corazón.*

*Agradezco a mis hermanos, Felipe de Jesús, José Roberto y Daniel Alonso por estar al pendiente y darme todo su apoyo incondicional ante todo, y por sus consejos que me dan los tres, los aprecio y amo con todo mi corazón.*

*Agradezco y dedico con mucho amor a la Dra. Norma Patricia, por darme todo su apoyo, comprensión, enseñanzas y regaños como una mamá, muchas gracias porque sin usted simplemente no lo hubiera logrado, es usted una de mis mejores maestras a la cual aprecio mucho, mil gracias por regalarnos parte de su tiempo.*

*Le doy las gracias a una persona que fue muy importante para mí que siempre estuvo conmigo, deseando solo grandeza y lo mejor para mí, él quería verme realizada como una profesionalista, hoy yo le digo lo logré con todo cariño a mi abuelo †Raymundo Carrillo, que sé que siempre me mandó todo su apoyo.*

*Agradezco a mi novio Joel Everardo, por ser un gran apoyo para mí en todo momento, por ser mi amigo y compañero, y por inspirarme a ser alguien mejor cada día y darme sus palabras de aliento que yo podía salir adelante. Gracias.*

*Agradezco a mi compañera y amiga María de tesis, que aunque tuvimos algunas diferencias sacamos adelante el trabajo, y gracias por apoyarme en todo momento, Además a mis amigos por estar siempre conmigo, Lupita y Julián.*

*Gracias Dr. Danilo, por darme su apoyo y consejos durante toda la carrera de QBC, y por contarnos algunas de sus experiencias profesionales, para cuando estemos en situaciones parecidas saber qué hacer, gracias por cada una de sus enseñanzas, es un gran maestro siempre disponible para ayudar a sus alumnos.*

*Agradezco al Químico Echeverría, por su apoyo incondicional, por enseñarme lo que es un químico de verdad, y dejarme aprender con usted dándome sus enseñanzas, consejos y de mas en el medio laboral.*

*Agradezco a Dr. Lupita Gonzalez, por darme sus enseñanzas y consejos para seguirnos preparándonos para el día a día.*

*Gracias a cada uno de mis maestros que nos dieron cada uno de ellos sus enseñanzas y aprendizajes, para formarnos como buenos profesionistas.*

**Q.B.C. Esmeralda Ruiz Carrillo**

*Con cariño, admiración y amor para cada uno de ustedes.*

<b>APROBACION</b>	<b>II</b>
<b>DECLARACION INSTITUCIONAL</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>XII</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>XIII</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>XVI</b>

## **INDICE**

<b>CAPITULO I <i>LEPTOSPIRA</i></b>	<b>1</b>
<b>Estructura de las espiroquetas</b>	<b>1</b>
Movilidad de las espiroquetas	2
Clasificación de las espiroquetas	2
<i>Leptospira interrogans</i>	4
Estructura antigénica	8

<b>Patología</b>	<b>10</b>
<b>Diagnostico diferencial</b>	<b>13</b>
Datos de laboratorio clínico	14
Epidemiología	16
<b>Serovares</b>	<b>19</b>
Características de los serovares	19
Transmisión	21
Vectores de especies y su relación con los serovares	23
Bovinos	24
Cerdo	25
Ovino y Caprino	26
Caninos y Felinos	27
Equino	27
Humano	28
<b><i>CAPITULO II RESPUESTA INMUNOLÓGICA</i></b>	<b>29</b>
<b>Inmunoglobulinas</b>	<b>31</b>
<b>Estructura</b>	<b>31</b>
<b>Tipos de inmunoglobulinas</b>	<b>32</b>
Inmunoglobulina G	34

Inmunoglobulina M	36
<b>PRUEBA DE MICROAGLUTINACION EN PLACA (MAT)</b>	<b>38</b>
<b>Métodos para el diagnóstico de <i>Leptospira interrogans</i></b>	<b>38</b>
Cultivo	38
Microscopía	39
Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)	40
Inmunofluorescencia directa e indirecta	40
Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)	40
Electroforesis de campo pulsado (ECP)	41
Técnica de Auidot	41
<b>Microaglutinación en placa (MAT)</b>	<b>42</b>
Fundamento	42
Requerimientos de la muestra	43
Títulos de MAT	44
Recolección de muestra	45
Antígenos	46
Principales técnicas de microaglutinación en placa (MAT)	47
Preparación de Antígenos	52

Determinación de la identidad	52
Preparación de la muestra	53
Interpretación de resultados	55
Titulación	56
Diagrama de flujo general de MAT	58
<b>Bioseguridad en el Laboratorio</b>	<b>60</b>
<b>Prevención y control</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>63</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

No		PÁGINAS
1	Espiroquetas observadas en microscopio	2
2	Morfología de las espiroquetas	3
3	Estructura de <i>Leptospira</i>	7
4	Modelo de estructura antigénica de <i>Leptospira</i>	9
5	Prevalencia de leptospirosis en México del 2000 al 2010	18
6	Serovares de importancia clínica en México	20
7	Mecanismos de transmisión de la <i>Leptospira</i>	22
8	Presencia de serovares en bovinos	24
9	Presencia de serovares en cerdo	25
10	Presencia de serovares en ovino-caprino	26
11	Manifestaciones clínicas de leptospirosis en caninos	27
12	Manifestaciones clínicas en equinos	27
13	Manifestaciones subclínica en el humano	28
14	Estructura general de la inmunoglobulina	33
15	Títulos de anticuerpos IgG e IgM por fase de la enfermedad	35
16	Estructura de la inmunoglobulina G	35
17	Pentámero de la inmunoglobulina M	37
18	Placa de microelisa de las muestras y controles	53
19	Interpretación microscópica de campo oscuro de la aglutinación en placa	56
20	Diagrama de flujo de la prueba MAT	59
21	Laboratorio de bioseguridad nivel 2	61

## LISTA DE TABLAS

No		PÁGINAS
1	Principales patologías causadas por <i>Leptospira</i>	12
2	Criterio del diagnóstico clínico de leptospirosis	15
3	Componentes y características del sistema inmune	30
4	Títulos de MAT y su cuadro clínico	44
5	Principales serovares identificados por pruebas de MAT	48
6	Serogrupos recomendados como antígenos	54
7	Formas de reportar los resultados de aglutinación de MAT	56

## JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por espiroquetas del género *Leptospira*, que afecta a diversas especies de animales salvajes y domésticos que constituyen el reservorio y la fuente de infección para el hombre. El hombre se infecta al entrar en contacto directo con animales o con sus fluidos y al estar en contacto con el medio ambiente contaminado (tierra, paja, aguas estancadas entre otros). En el hombre puede producir un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde un cuadro clínico inespecífico y banal, hasta graves procesos con daño multiorgánico, diversos autores han catalogado a esta enfermedad como un problema de salud pública reemergente.

Para el diagnóstico de una leptospirosis es imprescindible que exista una sospecha clínica, sin embargo, por su polimorfismo clínico es difícil su diagnóstico definitivo, para ello, se debe tener antecedente epidemiológico, clínico y de laboratorio clínico. La confirmación diagnóstica depende de las pruebas serológicas, aislamiento microbiano y una detección de DNA específico.

Las pruebas serológicas pueden detectar antígenos o anticuerpos. Los antígenos de *Leptospira* se detectan mediante técnicas de ELISA o radioinmunoensayo, sin embargo, presentan reacciones cruzadas con otras bacterias, por lo cual, se debe utilizar otras pruebas confirmatorias. La detección de anticuerpos mediante microaglutinación en placa (MAT) es una prueba cuya sensibilidad es elevada y determina una amplia gama de serovares, considerada la prueba de oro por la Organización Mundial de la Salud, por ello, es importante conocer su fundamento.

## **OBJETIVO GENERAL**

Describir el fundamento de la prueba de microaglutinación en placa (MAT) para detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans*

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Reunir y organizar información de las características de *Leptospira interrogans*
- Realizar una revisión teórica de los serovares de interés clínico
- Detallar las características de la prueba de Microaglutinación en placa (MAT)

## RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por espiroquetas del género *Leptospira*, que afecta a diversas especies de animales salvajes y domésticos que constituyen el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Esta enfermedad presenta un amplio espectro de signos y síntomas clínicos, por lo cual, es difícil su diagnóstico. De acuerdo a diversas investigaciones, los métodos de laboratorio empleados para su identificación son microscopia de campo oscuro, cultivo y serología, las cuales, determinan de forma directa e indirecta la presencia de la *Leptospira interrogans*, pero sin determinar el serogrupo y/o serovares. Los métodos empleados para determinar estos serogrupos son reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prueba de microaglutinación en placa (MAT). La PCR es una prueba de alto costo tanto en equipo como reactivos, por ello, los laboratorios de rutina restringen su uso.

Por su parte la prueba de MAT es eficaz para detectar las seroVariedades de *Leptospiras*, presentando una alta sensibilidad y especificidad. La detección de anticuerpos mediante microaglutinación en placa (MAT) es una prueba cuya sensibilidad es elevada y determina una amplia gama de serovares, la cual, puede permitir determinar el vector responsable. La reacción consiste en una prueba cruzada con los sueros del pacientes y los antígenos de cada serovariedad a estudiar, como resultado, de la interacción se presenta aglutinación la cual determina el título de la muestra. Mediante muestras pareadas se obtiene una seroconversión mayor o igual a 4 veces el título inicial. En muestra única al observar títulos  $\geq 1:1280$  para cualquier serovariedad de *L. interrogans*.

El diagnóstico de leptospirosis requiere de técnicas especiales que permitan evidenciar la presencia de la bacteria de forma directa e indirecta, entre ellas, la prueba de microaglutinación en placa (MAT).

## INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica infecto-contagiosa de distribución universal causada por la espiroqueta *Leptospira interrogans*, el reservorio más habitual son los roedores, principalmente las ratas las cuales infectan a los animales domésticos, siendo el humano un huésped accidental. (Brooks y cols., 2012)

La forma de contacto accidental para el hombre es a través de heridas cutáneas e incluso de la mucosa intacta, una vez dentro del huésped puede pasar a torrente sanguíneo y replicarse. La espiroqueta puede manifestarse con diferentes signos clínicos como: cuadro seudogripal agudo con fiebre, escalofríos cefalea, vómito y náuseas, así mismo, el síndrome de Weil es la forma más grave de leptospirosis la cual se caracteriza por ictericia, disfunción renal, diátesis hemorrágica y una mortalidad de 5 a 15%. (García y cols., 2010)

Por lo anteriormente expuesto, es de gran importancia realizar el diagnóstico clínico, bacteriológico, molecular y serológico. Actualmente se han desarrollado diferentes métodos de laboratorio para su diagnóstico, entre ellos, la prueba de Microaglutinación (MAT), considerada como la prueba de referencia (Gold standard) (OMS., 2008). Cuyo objetivo es confirmar el serovar causante de la enfermedad. Por tal motivo es importante describir las características de esta prueba con la finalidad de conocer las ventajas y desventajas del método (Leveett, 2001; Acha y Szyfres 2001).

## LEPTOSPIRA

### Estructura de las espiroquetas

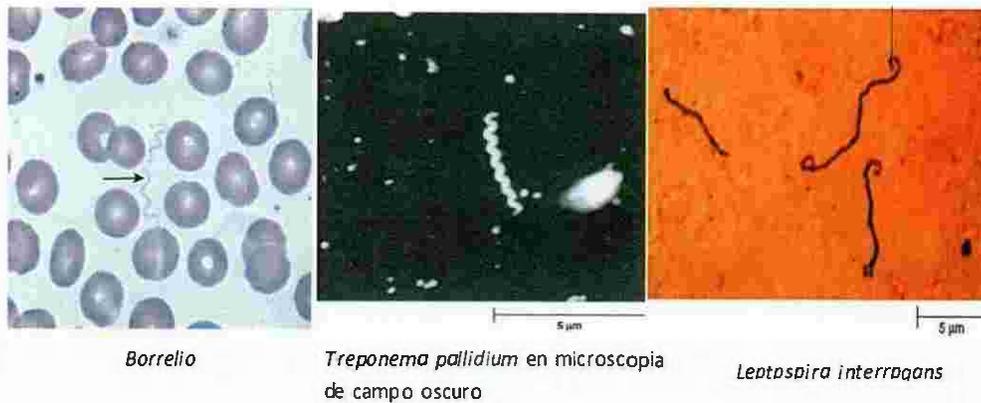
Son bacilos gram negativos, largos, finos, helicoidales, espirales o a manera de “sacacorchos” (Brooks y cols., 2010; Ahmad y cols., 2011). Los bacilos de este orden poseen una vaina externa o una cubierta de glucosaminoglucanos. La membrana celular externa está compuesta por proteínas, lípidos y lipopolisacáridos (LPS); gran variedad de antígenos están asociados con los LPS entre ellos, LipL21, LipL32, LipL36 y LipL41, los cuales se encuentran asociados con la virulencia. En el interior de la cubierta está la membrana externa que contiene peptidoglucano y que conserva la integridad estructural del microorganismo (Brooks y cols., 2010). La morfología espiral de las espiroquetas (Figura 2) es consecuencia de una pared celular flexible de peptidoglucanos alrededor de la cual se encuentran varias fibrillas axiales (Ahmad y cols., 2011).

Las fibrillas axiales o endoflagelos son organelos a manera de flagelos en el espacio periplásmico, rodeados por la membrana externa. Los endoflagelos comienzan en cada extremo del microorganismo y describen una curva a su alrededor que se extiende hasta un punto medio y lo cubren, estos retienen varios antígenos y contienen ácido murámico. La función es mantener la estructura y forma. En el interior de los endoflagelos en la membrana interna (citoplásmica) que confiere estabilidad osmótica, y cubre el cilindro protoplásmico. La *Leptospira* tienen dos flagelos al final de la inserción a través del peptidoglucano, cuando la célula se divide, se forma un nuevo flagelo (Brooks y cols., 2010; Ahmad y cols., 2011).

### Movilidad de las espiroquetas

Las espiroquetas se diferencian significativamente de las otras bacterias por su motilidad y forma helicoidal (como un sacacorchos), estos microorganismos muestran movimiento rotatorio y flexión, se cree que dicha motilidad es consecuencia del movimiento de los filamentos axiles, aunque el mecanismo no es claro (Llop y cols., 2001; Ahmad y cols., 2011).

Las espiroquetas tienen la capacidad única de aumentar su velocidad en medios viscosos, tales como geles (medio con metilcelulosa) o tejido conjuntivo. Esta motilidad puede ser observada mediante microscopia de campo oscuro. En las micrografías electrónicas se identifica un fino filamento axil y una membrana delicada (Guerra y Berlanga., 2005; Brooks y cols.2010).

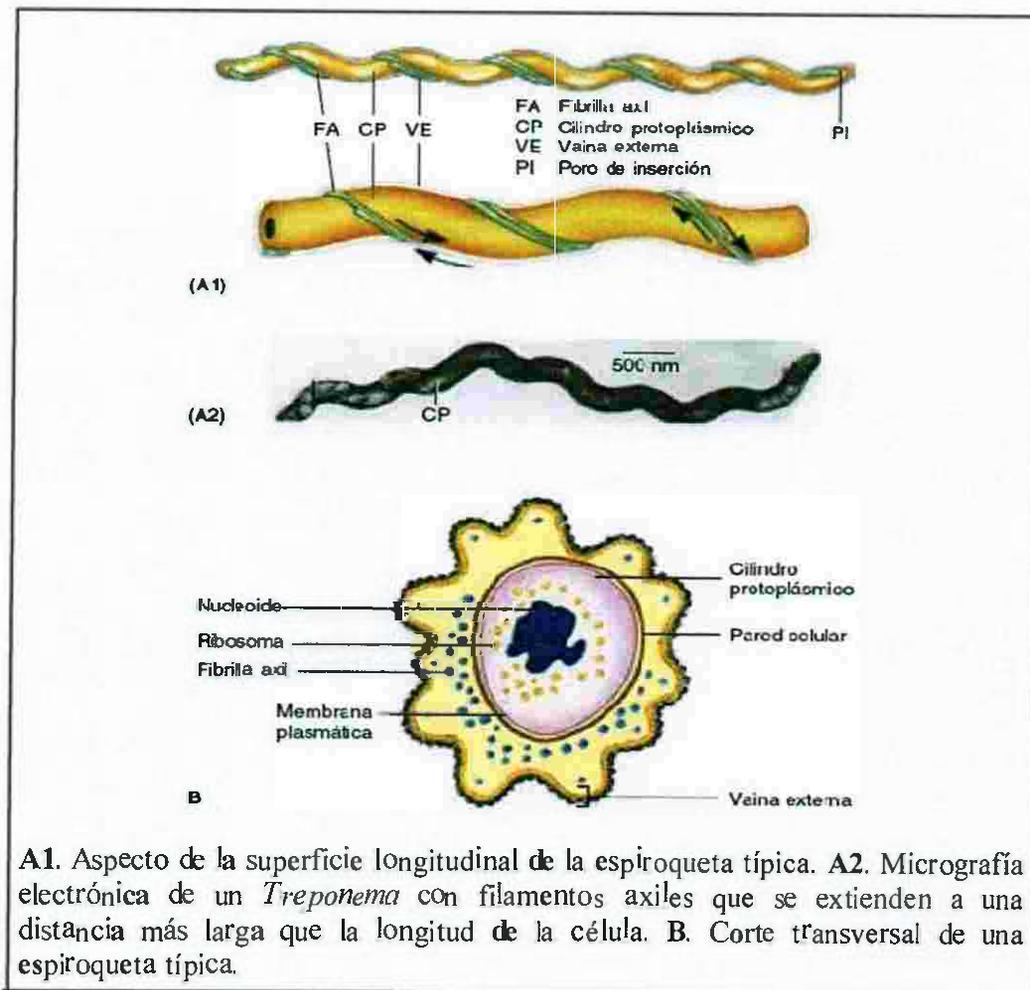


Fuente: Ahmad y cols., 2011; Brooks y cols.2010

**Figura 1:** Espiroquetas observadas en microscopio

## Clasificación de las espiroquetas

La familia Spirochaetales comprende cuatro géneros que son patógenos para el ser humano y para algunos animales: *Borrelia*, que causa la fiebre recurrente y la enfermedad de Lyme; *Brachyspira*, que origina infecciones intestinales; *Treponema*, que ocasiona las enfermedades llamadas treponemosis y *Leptospira*, que induce leptospirosis, que comprende dos especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa* (Longo y cols., 2013)



Fuente: Ahmad y cols., 2011.

Figura 2. Morfología de las espiroquetas.

### *Leptospira interrogans*

*Leptospira* (del griego *leptos*, delgado, y del latín *spira*, espiral) es un género de bacterias del orden de los espiroquetales. La *Leptospira* se observó por primera vez en 1907, en el tejido del riñón de un paciente que se creía que había fallecido víctima de la fiebre amarilla. Aunque la infección se ha descrito desde tiempos pasados en la literatura médica y no médica, haciendo referencia a granjeros que sufrían fiebre e ictericia, la publicación del internista alemán Adolf Weil en 1886 constituye la primera descripción detallada de la infección, y de ahí que la forma icterica de la enfermedad lleve su nombre (Scott y Coleman, 2003; Stone 2004).

*Leptospira* es una espiroqueta flexible y helicoidal de 0,1 µm de diámetro y de 6-20 µm de longitud, con dos flagelos en los extremos que le dan motilidad. Característicamente presentan tinción de Gram débil, ya que tienen la típica estructura de pared de bacteria gramnegativa y se visualiza mejor en campo oscuro. Su pared celular está rodeada por una envoltura externa rica en lipopolisacáridos, cuya variación determina los distintos serovares y la producción de distintos anticuerpos por parte del huésped. Clásicamente comprendía dos especies *L. interrogans* y *L. biflexa*, siendo la primera patógena y la segunda saprofita, cada una con distintos serogrupos y estos con distintos serovares. Sin embargo, estudios más recientes de ADN aún en desarrollo, han establecido algunos cambios taxonómicos con respecto a esta clasificación, de modo que el género *Leptospira* comprende tres especies no patógenas: *L. biflexa*, *L. meyerii*, *L. wolbachii*; tres especies intermedias u oportunistas: *L. inadai*, *L. fainei* y *L. broomii* y al menos siete patógenas: *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii*, distribuidas en 24 serogrupos y 237 serovares. No obstante *L. interrogans* sigue siendo la especie patógena más prevalente (Plank y Dean, 2000).

La capacidad patogénica de *Leptospira* se relaciona con su motilidad, con el efecto de sus toxinas y/o enzimas del tipo fosfolipasas o con la glucoproteína bacteriana que actuaría como endotoxina perforando la membrana celular y causando la muerte celular (Otras características diferenciadas de las *L. biflexa* y las *L. interrogans* además de su poder patógeno son la resistencia a la 8-azaguanina, resistencia al NaCl (1M), crecimiento a baja temperatura (13 °C), presencia de lipasa, resistencia a los iones Cu, resistencia al NaHCO<sub>3</sub> (1 mg/ml) y su crecimiento en presencia de colorantes inhibidores como el verde de malaquita, fucsina básica (Rosafio y cols., 2012).

En la reunión del año 2002 del Comité de Taxonomía de *Leptospira* de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas, aprobaron la siguiente nomenclatura de *Leptospira*: el género y la especie deben ser escritas en cursiva, con el nombre del serotipo sin cursiva y la primera letra en mayúscula y el serovar en letra itálica (por ejemplo, *Leptospira interrogans* serotipo Australis serotipo Icterohaemorrhagiae serovar *icterohaemorrhagiae*) (Tappero y cols., 2000).

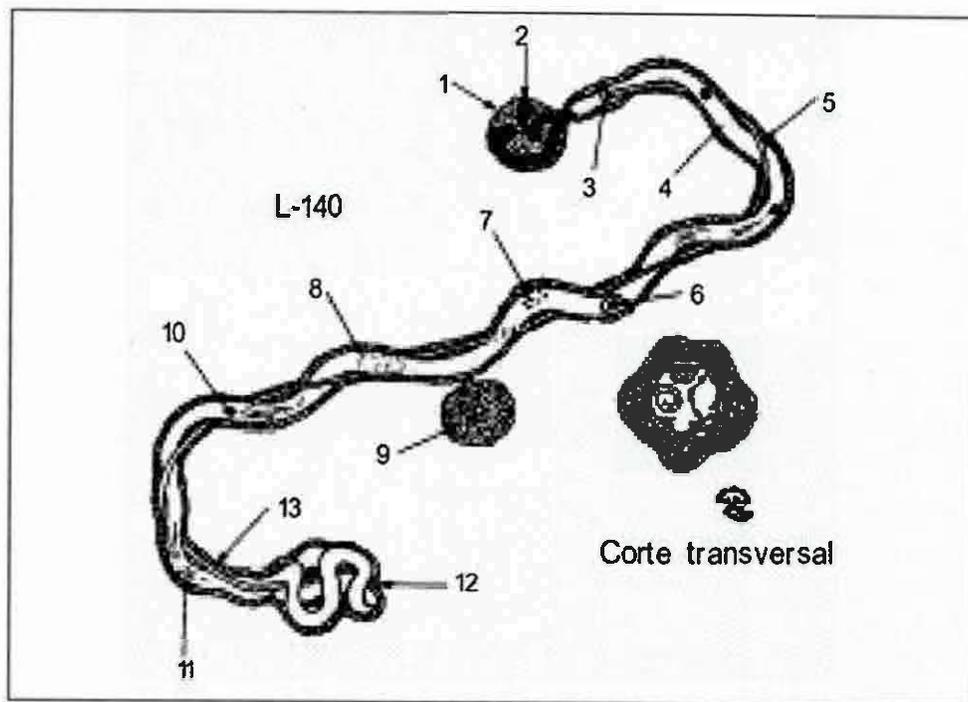
Las *Leptospiras interrogans* son microorganismos gramnegativos de morfología espiral, fina y muy móvil, que miden 6 a 25 µm de longitud por 0,1 a 0,2 µm de grosor. Son bacterias acrobias obligadas, de crecimiento lento y sus paredes están rodeadas por una envoltura rica en polisacáridos. Cuentan con un flagelo periplasmático en cada extremo (Figura 3). Presentan tres tipos de movimiento: rotación en torno al eje axial, movimiento progresivo longitudinal y movimiento circular y su secuencia completa consta de más de 4.700 genes (Tappero y cols., 2002; Bharti y cols., 2003; Levett, 2003). Es un genoma largo comparado con el de otras espiroquetas como *Treponema* spp. y *Borrelia* spp., circunstancia que es congruente con la capacidad de las leptospiras para vivir en diferentes huéspedes animales y libremente en el agua. Las leptospiras pueden vivir y reproducirse en aguas de ríos, arroyos, lagos, aguas estancadas, esteros,

pantanos; y requieren elementales condiciones de temperatura, de pH, presencia de ciertas sales minerales y estar protegidas de la luz solar (Brooks y cols., 2010). Su multiplicación es óptima en un pH comprendido entre 7.2 a 7.4; experimentalmente se ha constatado la persistencia de leptospiras viables en agua hasta 180 días.

Son incapaces de incorporar Pirimidinas y resiste, por lo tanto a la acción de 5 fluoracilo, utilizan como fuente principal de energía los alcoholes y ácidos grasos de cadena larga. El cuerpo celular y los flagelos están rodeados por una envoltura externa que les confiere una gran capacidad antigenética. Contienen proteínas y polisacáridos que las dotan de especificidad de serotipo. A pesar de que todas las especies, serovariedades y cepas son idénticas desde el punto de vista morfológico, las leptospiras se describen con arreglo a su serovariedad, por razones clínicas y epidemiológicas (Longo y cols. 2012).

Las leptospiras apenas se tiñen con los colorantes convencionales y para ser visualizadas es preciso el microscopio de campo oscuro y la tinción por impregnación argéntica o la microscopía electrónica de barrido. Son catalasa y oxidasa positivas y se cultivan en el medio de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMLH) (Gasque, 2008; Roca, 2006).

En la figura 3 tenemos un esquema ultra estructural de *Leptospira*, en el que se puede observar (1) Formación terminal, (2) apéndices terminales, (3) granulo basal, (4) cilindro citoplasmático, (5) filamentos axiales, (6) estructura lamear, (7) inclusiones electrodensas, (8) inclusiones permeables para electrones, (9) formaciones globosas, (10) inclusiones electrodensas, (11) nucleoide-ADN, (12) quiste, (13) Membrana externa; también muestra un corte transversal de marco (Macedo, 2005).



Fuente: Macedo, 2005.

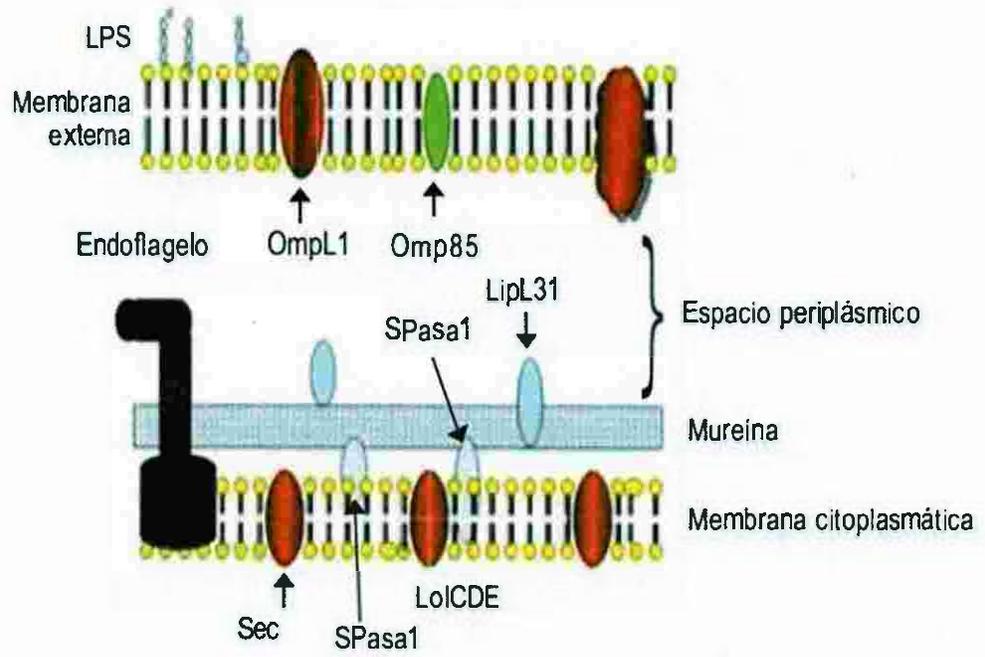
Figura 3. Estructura de *Leptospira*

### **Estructura Antigénica**

Los lipopolisacáridos (LPS) determinan las características antigénicas de cada grupo de composición compleja (Figura 4). Los antígenos superficiales localizados en la membrana externa facilitan la clasificación en serotipos (serovares) (García y cols., 2013). La especie se ha subdividido en más de 200 serotipos (serovariedades), que por las reacciones cruzadas entre ellos se dividen en 23 serogrupos (García y cols., 2013; Brooks y cols., 2010).

Las cepas de *leptospiras* aisladas del hombre o animales están relacionadas serológicamente y tienen reactividad cruzada en las muestras serológicas. Esto muestra un considerable entrecruzamiento en la estructura antigénica, por lo que es necesario efectuar reacciones cuantitativas y estudios de absorción de anticuerpos para el diagnóstico serológico específico (Aguinaga, 2000).

*Leptospira* cuenta con una membrana externa multiestratificada es rica en lípidos (20%); la bacteria presenta además peptidoglicanos. La membrana externa contiene Lipopolisacáridos (LPS) altamente inmunogénicos, responsables de la especificidad de los serovares, Varias lipoproteínas (LipL34, LipL41), porinas (OmpL 1, Omp85) que son altamente conservadas, constituyen el sitio de interacción con el hospedero y al parecer participan en la patogénesis de la nefritis intersticial y en la respuesta inmune innata. En la membrana interna, recubierta por el peptidoglicano, se encuentran lipoproteínas Sec, Spasa I y II, LolCDE y el cuerpo basal de endoflagelo, un sistema de secreción tipo II que enlaza ambas membranas (figura 4)(García y cols., 2013)



Fuente: García y cols., 2013.

Figura 4. Modelo de la estructura antigénica de *Leptospira*.

## Patología

Los mecanismos patogénicos de la leptospirosis son limitados. La razón por la que algunos pacientes presentan graves manifestaciones clínicas y otros una sintomatología nula, escasa, moderada o autolimitada se desconoce, pero podría estar relacionada con factores no solo dependientes de la bacteria (serovar causante de la infección, por ejemplo *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, y tamaño del inóculo bacteriano) sino propios del huésped (genéticos, estado nutricional, inmunidad por exposición previa a *Leptospira* (García y cols., 2010)

Las *Leptospiras* penetran en el cuerpo humano a través de cortes, abrasiones, piel macerada por el agua, mucosas o por la ingestión. Posteriormente, son transportadas por los linfáticos y por la circulación sanguínea a todos los órganos. Los mecanismos de virulencia de las *Leptospiras* se relacionan con la motilidad y con la capacidad para invadir los tejidos de células eucariontes. La motilidad es importante en la infección inicial y en la diseminación a los órganos diana (riñón, hígado, pulmón, ojo, cerebro) (Brooks y cols., 2012; Rodríguez y cols., 2006). Se han identificado proteínas quimiotácticas que confieren una ventaja selectiva para migrar dentro de los tejidos del hospedador (reacción de quimiocinas; factor de necrosis tumoral, proteína quimiotáctica de los monocitos). Así mismo, se han descrito hemolisinas, esfingomielinasas y fosfolipasas con actividad *in vitro*. En la adhesión inicial y en la invasión cutánea y mucosa parece tener un papel significativo la proteína de unión a la fibronectina, que se expresa en la superficie de *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, pero no en las *Leptospiras* saprofitas. También se han identificado genes con secuencias homólogas a las del gen de entrada en células de mamíferos (*mammalian cell entry*) de *Mycobacterium tuberculosis* y del gen de invasión *invA* de *Rickettsia prowazekii* (Rodríguez y cols., 2010).

El mecanismo de patogenicidad en animales de experimentación ha sido investigado, demostrando que la *Leptospira* regula la expresión de proteínas en

respuesta a estímulos del medio. (Bharti y cols., 2003; Diamont y cols., 2002), reportaron que en animales infectados de modo experimental (ratones) los órganos más afectados son hígado y riñón posiblemente causado por efecto citotóxico directo. Este daño puede estar mediado por la glucolipoproteína de *L. interrogans*, que inhibe la actividad de bomba de la adenosintrifosfatasa (ATPasa) sodio-potasio en el túbulo renal y activa a los monocitos de la sangre periférica. La presencia de las lipoproteínas está implicada en la nefritis intersticial. Por otro lado, la ictericia no se debe al daño hepatocelular, sino a una alteración en la secreción de bilirrubina en el canalículo, que es dependiente de adenosintrifosfato (ATP). En cuanto a las manifestaciones hemorrágicas, aparecen como resultado de la ruptura de la membrana endotelial en los vasos de pequeño calibre, ocasionada por la glucolipoproteína. Las lesiones petequiales reflejan una vasculitis sistémica (García y cols., 2010).

La primera fase de la enfermedad se caracteriza por fiebre elevada y leptospiremia, seguida de un breve periodo de mejoría y ausencia de fiebre que concluye con una segunda fase que cursa con fenómenos probablemente de etiología autoinmune (fiebre, insuficiencia renal, ictericia, meningitis aséptica y afectación ocular) que puede durar de 4 a 30 días (García y cols., 2010; Olmo y cols., 2014). Los síntomas y signos más frecuentes en la primera fase son fiebre, mialgias intensas, cefalea, congestión conjuntival no purulenta, manifestaciones gastrointestinales, tos, faringitis y un exantema máculo-papular pretibial (< 10% de los casos) (García y cols., 2010). Estudios recientes indican que una membrana externa de *Leptospira* inhibe la actividad del cotransportador sodio-potasio-cloro en el asa ascendente de Henle, dando como resultado hipopotasemia y pérdida de sodio (Olmo y cols., 2014).

**Tabla 1.** Principales patologías causadas por *Leptospira*.

<b>Órganos afectados</b>	<b>Descripción de la patología</b>
<u>Hígado</u>	Puede haber colestasis intrahepática. (Aumento en las enzimas hepáticas no mayor de 200 U/l. y elevación de la creatinfosfocinasa (CPK))
<u>Riñón</u>	Nefritis intersticial con infiltración celular intensa de neutrófilos y monocitos (la biopsia renal muestra nefritis intersticial y en ocasiones glomerulonefritis por inmunocomplejos. El análisis del sedimento de orina puede mostrar proteinuria, hematuria microscópica o cilindruria. La lesión fundamental es la necrosis tubular).
<u>Corazón</u>	Miocarditis intersticial con infiltración de linfocitos y predominantes células plasmáticas, hemorragias petequiales en epicardio (estas alteraciones se han asociado a la presencia de una glucoproteína en la pared celular de <i>Leptospira</i> , la cual inhibiría la Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , ATPasa a nivel cardiaco).
<u>Pulmón</u>	Congestión pulmonar y hemorragias (se caracteriza por la afectación hemorrágica a nivel traqueal, intersticial y alveolar. En las radiografías pueden aparecer imágenes nodulares, intersticiales o infiltrados alveolares).
<u>Meninges</u>	El análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) muestra una meningitis linfocitaria (mielorradiculopatía, la mielopatía y las alteraciones cerebelosas).
<b>Otras afectaciones</b>	
<u>Afectación hematológica</u>	Aunque lo habitual es encontrar una discreta leucocitosis, se han descrito casos de pancitopenia y trombocitopenia.
<u>Leptospirosis y embarazo</u>	La infección en fases precoces del embarazo suele ocasionar aborto; en fases más avanzadas de la gestación el feto puede o no afectarse.

Fuente: Modificado de Leveett, 2001; García y cols., 2010.

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son consecuencia de los daños provocados en la capa endotelial de pequeños vasos sanguíneos por mecanismos poco entendidos todavía. Todos los órganos internos pueden ser afectados, lo que explica el amplio rango de manifestaciones clínicas, por ejemplo: nefritis intersticial, tubular, lesiones glomerulares y vasculares en riñones que determinan la uremia y la oliguria/anuria, daño vascular de capilares hepáticos, en ausencia de necrosis hepatocelular, causando la ictericia, inflamación de las meninges causando dolor de cabeza, cuello rígido, confusión, psicosis, delirio (SSA, 2012).

### **Diagnóstico diferencial**

Son múltiples, desde la infección subclínica o asintomática (la más frecuente) al compromiso vital, pasando por la afectación de distintos órganos en diferente forma, grado y combinación de amplio espectro, debe hacerse con cualquier proceso febril que pueda cursar con hepatitis icterica (fundamentalmente hepatitis víricas), cuadro hemorrágico (fiebre hemorrágica, sobre todo Dengue e infecciones por hantavirus) o síndrome meníngeo (meningitis virales). En el diagnóstico diferencial con las hepatitis víricas ayuda el hecho de que las enzimas hepáticas presentan una elevación más discreta (García y cols., 2010). La hemorragia conjuntival, cuando esta ocurre, es uno de los signos diferenciadores más fiables, ya que raramente ocurre en otras enfermedades infecciosas (Olmo y cols., 2014).

Las principales enfermedades a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial son:

1. Malaria y dengue, ya que comparten algunas manifestaciones clínicas y patrones endémicos similares con la leptospirosis.
2. El tífus de las malezas es una enfermedad común en algunas regiones tropicales donde la leptospirosis también ocurre.
3. Rickettsiosis, como las infecciones con fiebre moteada, así como, tularemia, triquinosis y sarcodiosis que podrían imitar a la leptospirosis.

4. La infección por *Salmonella typhi* y fiebres entéricas podría imitar a la leptospirosis en zonas donde la fiebre tifoidea es común, sobre todo en el caso de abundantes síntomas gastrointestinales.
5. Ehrlichiosis y Babesiosis podría presentar características clínicas similares, incluyendo fiebre y otros hallazgos inespecíficos.
6. Enfermedades agudas víricas, incluida la gripe, podrían imitar a la leptospirosis, sobre todo en los casos de síntomas respiratorios prominentes.
7. Los Hantavirus pueden causar un síndrome renal similar al de la afectación renal causada por la leptospirosis.
8. Los Adenovirus pueden causar sufusión conjuntival y fracaso multiorgánico, como es el caso de la leptospirosis (Ahmad y cols., 2005; Olmo y cols., 2014).

#### **Datos de laboratorio clínico**

Los hallazgos de laboratorios son poco específicos, las cifras de leucocitos suelen estar por debajo de  $10.000/\text{mm}^3$ ; pueden variar de 3.000 hasta  $26.000/\text{mm}^3$ , con desviación a la izquierda. Cuando la evolución se prolonga son frecuentes la anemia y la trombocitopenia. Así mismo, la velocidad de sedimentación globular (VSG) está aumentada. Las alteraciones hepáticas se traducen por el patrón de colestasis intrahepática ya descrito. Es importante cuantificar la elevación de la creatinfosfocinasa (CPK) suele estar elevada, incluso podría ser útil para excluir el diagnóstico de leptospirosis. Las alteraciones renales se hallan siempre presentes. Varían desde mínimas alteraciones del sedimento urinario (leucocituria, proteinuria inferior a 1g/24hrs, piuria, cilindros granulosos y ocasionalmente hematuria microscópica). El líquido cefaloraquídeo (LCR) podría mostrar pleocitosis linfocítica o neutrofílica con discreta elevación de proteínas y glucosa normal (Olmo y cols., 2014). La confirmación diagnóstica se basa en el aislamiento del microorganismo o la seroconversión (Tabla 2).

**Tabla 2.** Criterio del diagnóstico clínico de leptospirosis.

**Definición clínica de caso**

Enfermedad caracterizada por escalofríos, fiebre, cefalea, mialgias, sufusión conjuntival y con menor frecuencia meningitis, erupción cutánea, ictericia o insuficiencia renal. Posible curso bifásico de la enfermedad

**Criterios de laboratorio**

1. Aislamiento de *Leptospira* de una muestra clínica
2. Incremento cuádruple o mayor del título de aglutinación de *Leptospira* en muestras de suero recogido en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad con más de dos semanas de separación.
3. Demostración de *Leptospira* en muestra clínica por inmunofluorescencia o ELISA

**Clasificación de casos**

Caso sospechoso/probable: caso compatible con la definición clínica de caso y serología positiva. Caso confirmado: caso compatible con la definición clínica de caso y criterio de laboratorio (punto 1 o 3 de los anteriores)

Fuente: García-Vázquez y cols., 2012.

## Epidemiología

La leptospirosis tiene una distribución universal, afecta a alrededor de 160 especies de mamíferos domésticos y salvajes (sobre todo ratas y perros) y predomina en climas cálidos, ya que su supervivencia se ve favorecida por un ambiente cálido, húmedo y un pH neutro o ligeramente alcalino. Los mamíferos infectados constituyen el reservorio y excretan la bacteria por largo tiempo a través de la orina (infección asintomática de los túbulos renales durante largos periodos de tiempo o de por vida), contaminando así el medio ambiente (suelo y aguas). Determinados serovares tienen predilección por determinados animales, por lo que la identificación del serovar causante de enfermedad en los pacientes infectados puede ayudar a conocer la fuente epidemiológica y los animales que están sirviendo de reservorio en el entorno en cuestión, para así poder tomar las medidas de salud pública necesarias. La infección en seres humanos se relaciona sobre todo con la exposición laboral o de recreo (baño en aguas estancadas u otras actividades asociadas a turismo de aventura y actividades acuáticas), pudiendo infectarse el paciente por contacto directo con el reservorio animal, o más frecuentemente a través de agua o terrenos húmedos contaminados (agua estancada, estanques, arrozales, etc.). Excepcionalmente pueden ocurrir casos en relación con la ingesta de agua contaminada (García-Vázquez y cols., 2010).

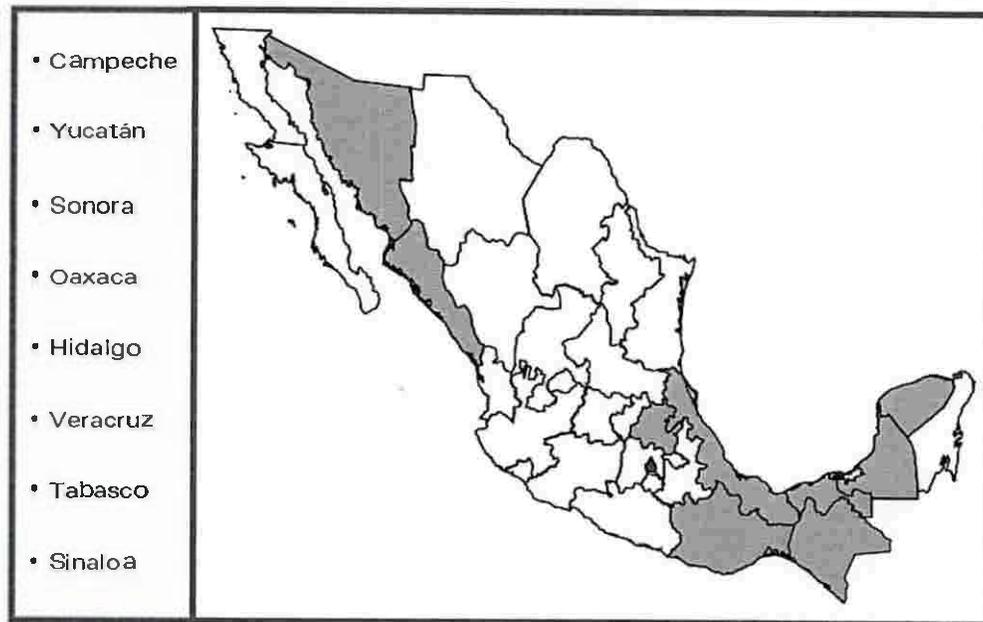
El número de casos que ocurren mundialmente no es conocido con precisión. De acuerdo con los reportes disponibles, la incidencia anual varía dentro de un rango desde, aproximadamente 0.1-1 por 100,000 en climas templados hasta 10-100 por 100,000 habitantes en climas húmedos tropicales de 0,04 por 100.000 habitantes en países desarrollados. Sin embargo, en zonas endémicas puede ser tan elevada como 3-4 casos por 100.000 habitantes. Cuando se producen brotes, y en los grupos con alto riesgo de exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 por 100,000 habitantes. (SSA, 2012;

García y cols., 2010). Aunque la distribución es mundial, se presentan zonas especialmente endémicas, tales como la India, las islas del Océano Índico y Pacífico, el Caribe y América Latina. En estos países los brotes se ven favorecidos por inundaciones y otras catástrofes naturales (García y cols., 2010). La letalidad que ha sido reportada en diferentes partes del mundo varía en un rango inferior al 5% hasta 30%, aunque la mayoría de los casos registrados refleja una mortalidad mayor al 10% (SSA, 2012; Olmo y cols., 2014).

En México se ha presentado una tasa nacional de 0.45-0.65 casos por cada 100,000 habitantes, manteniéndose constante durante los últimos 10 años (Figura 5), los estados que presentaron una incidencia mayor fueron: Hidalgo, Sinaloa, Veracruz, Tabasco, Sonora y Yucatán, que oscilan entre 0.22 a 9.80 casos por cada 100,000 habitantes; así mismo, afecta mayormente al sexo masculino que al femenino. Octubre es el mes con mayor incidencia de casos positivos (SSA, 2012), y los serovares reportados son: *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. canicola*, *L. ballum*, *L. hardjo* y *L. pomona* (Zuñiga y cols., 2013).

El primer estudio de leptospirosis en Sonora se realizó en el año de 1998 en ganado bovino, las serovariedades con mayor prevalencia fueron cepa H-89 (*hardjo* genotipo *hardjoprajitno*), *hardjo*, *wolffi* y *tarassovi* (Luna y cols., 2005). Del 2003 al 2008 se reportaron casos de leptospirosis en humanos (SSA, 2010). Así mismo, Gaz y Anduro (2013), reportaron la presencia de *Leptospira* en el sur del estado de Sonora por el método de ELISA.

Estados con casos confirmados de leptospirosis 2000-2010.



Árida y semiárida	Trópico seco	Trópico húmedo	Zona templada
1. Baja California Sur	1. Tamaulipas*	1. Veracruz*	1. Aguascalientes
2. Baja California Norte	2. San Luis Potosí	2. Tabasco*	2. Jalisco*
3. Sonora*	3. Sinaloa*	3. Chiapas*	3. Guanajuato*
4. Chihuahua	4. Nayarit	4. Campeche*	4. Querétaro
5. Coahuila	5. Colima	5. Yucatán*	5. Hidalgo*
6. Nuevo León*	6. Michoacán	6. Quintana Roo	6. Tlaxcala
7. Zacatecas	7. Guerrero		7. Distrito Federal*
8. Durango	8. Oaxaca*		8. Estado México*
			9. Morelos*
			10. Puebla*

\* Estados con datos sobre leptospirosis bovina.

Fuente: Luna y cols., 2005; Zúñiga y cols., 2013.

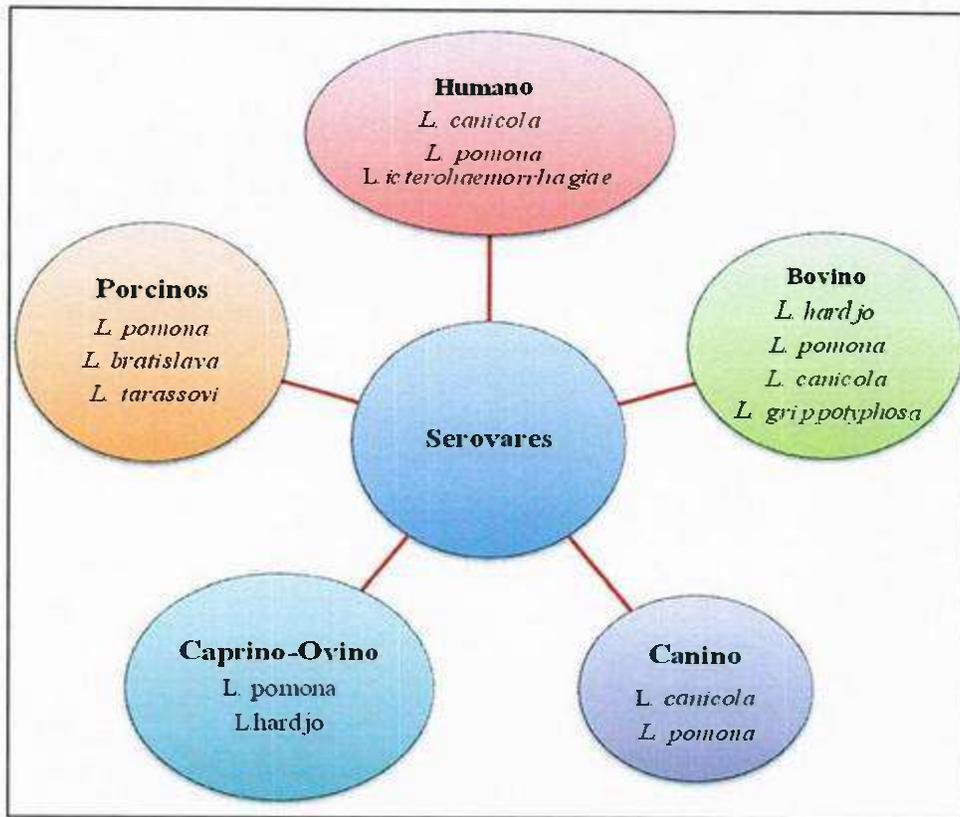
Figura 5. Prevalencia de leptospirosis en México del 2000 al 2010.

## Serovares

### Características de los serovares

La designación “sero” simplemente indica el uso de anticuerpos (policlonales o monoclonales) que reaccionan con estructuras específicas de la superficie celular bacteriana como los lipopolisacáridos (LPS), los flagelos o los antígenos capsulares. Los términos “serotipo”, “Serogrupo” y “serovariedad”, para fines prácticos, son idénticos; todos ellos utilizan la especificidad de estos anticuerpos para subdividir a las cepas de una especie bacteriana. (Books y cols. 2010). A pesar de que todas las especies, serovariedades y cepas son idénticas desde el punto de vista morfológico, las *leptospiras* se describen con arreglo a su serovariedad, por razones clínicas y epidemiológicas (Longo y cols. 2012). La serovariedad se determina mediante pruebas de microaglutinación en placa (MAT) después de una absorción cruzada con antígenos homólogos (Sandow y Ramírez, 2005).

De acuerdo con la estructura antigénica las *leptospiras* se clasifican en serovariedades de los cuales se reconocen más de 200 en el mundo. Cada especie animal puede ser infectada por diferentes serovariedades aunque frecuentemente se presenta una clara adaptación al persistir por largo tiempo en huéspedes particulares (Rodríguez, 2000). La figura 5 muestra los principales serovares reportados en México y su hospedero.



Fuente: Modificado de Rodríguez, 2000.

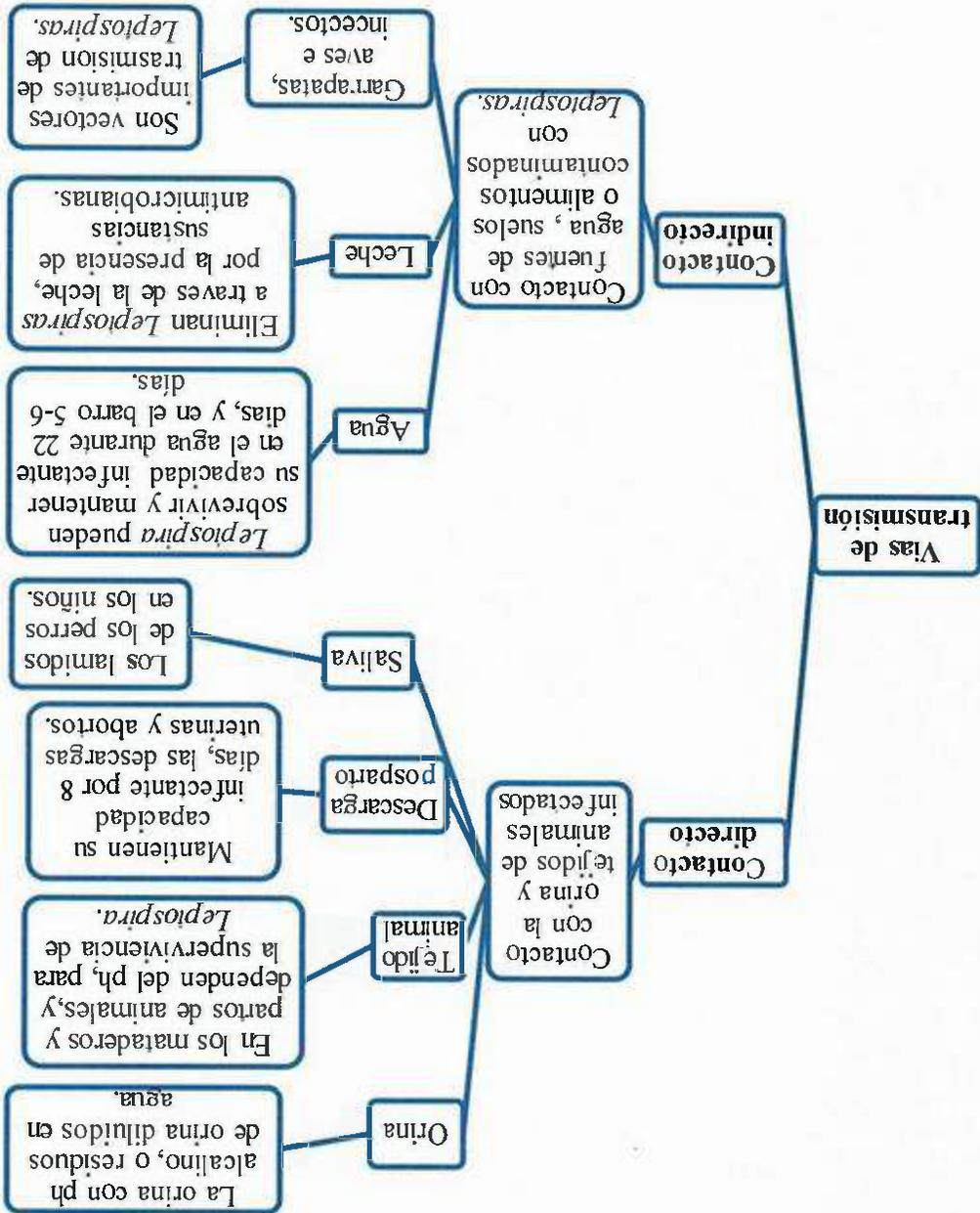
**Figura 6.** Serovares de importancia clínica en México.

### **Trasmisión**

Existen dos mecanismos: directo, a través del contacto con la orina y tejidos de animales infectados, generalmente origina casos aislados; indirecto, por el contacto con fuentes de agua, suelo o alimentos contaminados con leptospira, generalmente ocasiona brotes epidémicos (Figura 7). Se considera una enfermedad ocupacional en aquellos grupos expuestos como: agricultores principalmente de arrozales y cañaverales; trabajadores de alcantarillados, canales; criadores de ganado, médicos veterinarios. En las áreas urbana y rural, los grupos poblacionales más expuestos son aquellos que trabajan o viven en condiciones precarias de vivienda, sin saneamiento básico o en contacto con fuentes de agua o suelos contaminados con orina de roedores infectados o de otros animales domésticos y silvestres. Es rara la transmisión de persona a persona (SSA, 2012; SSA, 2013).

Figura 7. Mecanismos de transmisión de la *Leptospira*.

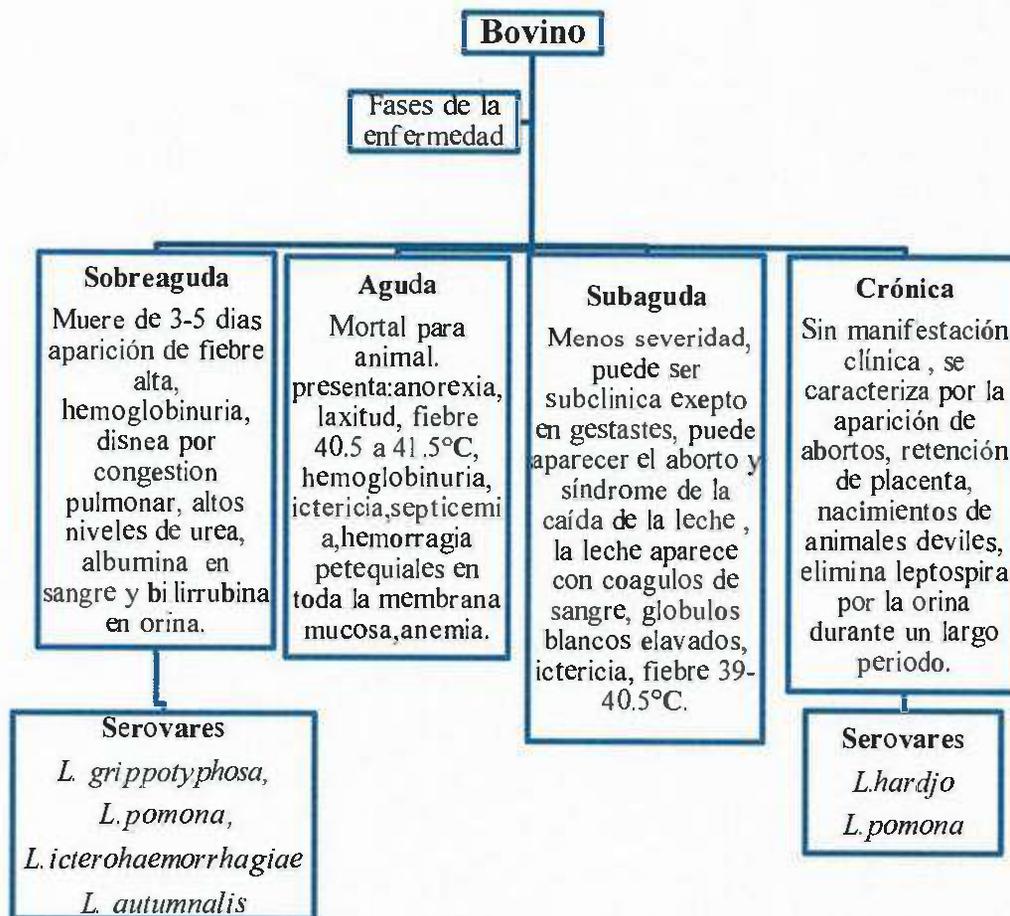
Fuentes: Modificado de Sandow y Ramirez, 2005; SSA, 2013.



### Vectores de especies y su relación con los serovares

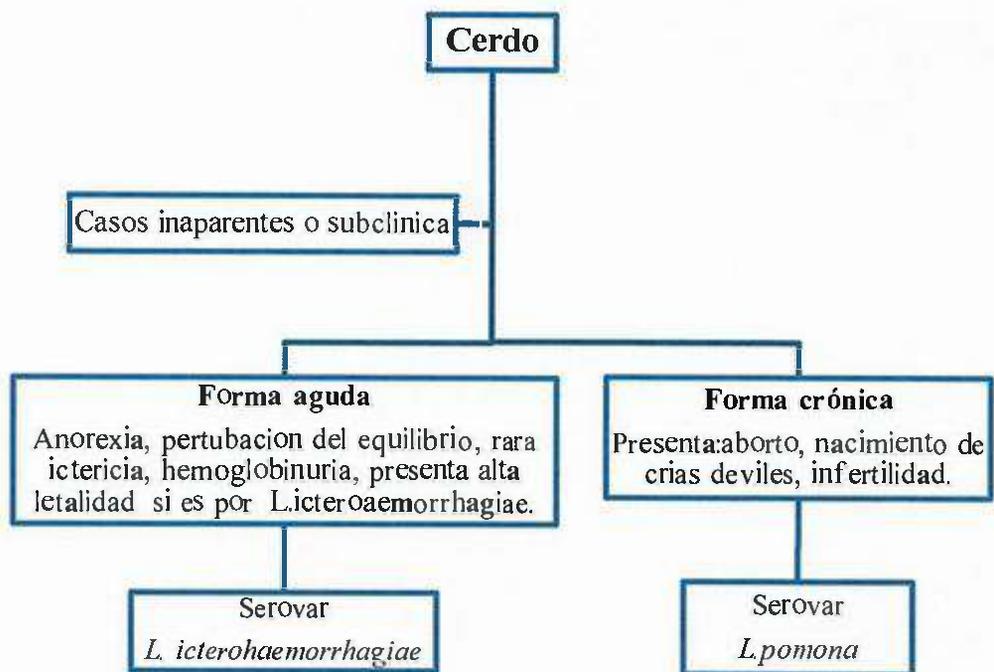
Se cree que las ratas y roedores pequeños para ser el principal reservorio de la infección para los seres humanos y parecen albergar cepas más virulentas de la enfermedad. Entre los principales reservorios en zonas rurales se encuentran los porcinos, bovinos, equinos, caprinos, ovinos, cervinos, caninos y roedores entre otros (Figura 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13). Los mamíferos pueden convertirse como portadores a largo plazo o cortos de mantenimiento de las *Leptospiras* y son generalmente asintomáticos. También hay informes de casos de transmisión de las ratas domésticas, con varios casos que se describen en el Reino Unido (Forbes y cols., 2012).

La gran variedad de serovares y su afinidad por los diferentes reservorios facilita la diseminación de *Leptospira*, perpetuando el ciclo endémico. La propagación de los serovares se encuentra favorecida por las migraciones de reservorios infectados y el posible contacto directo o indirecto que puedan tener con las personas (Saad y cols., 2006).



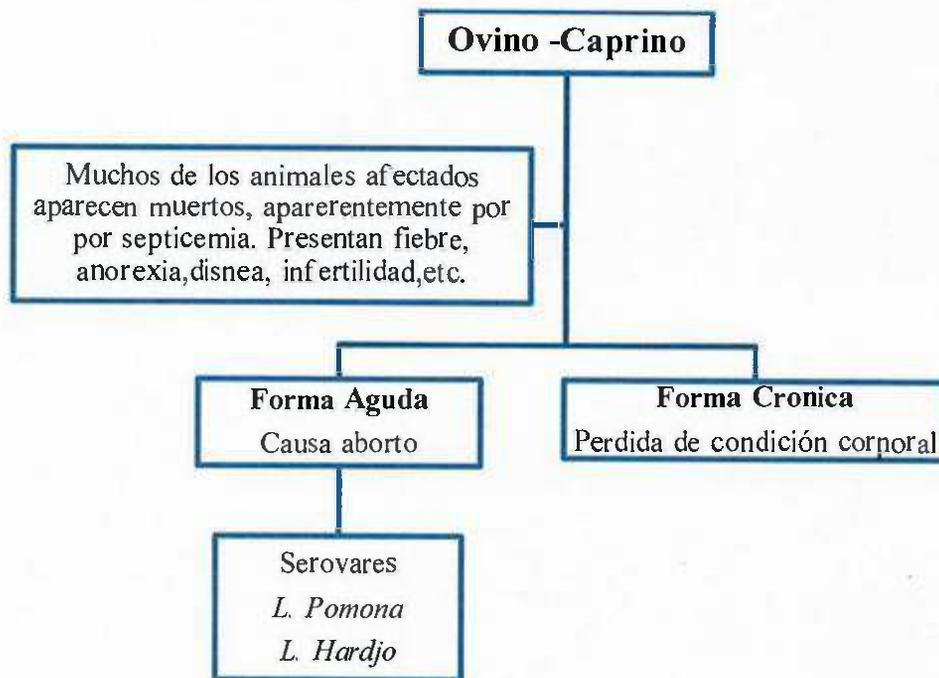
Fuente: Modificado de Sandow y Ramirez, 2005.

**Figura 8.** Presencia de serovares en bovinos.



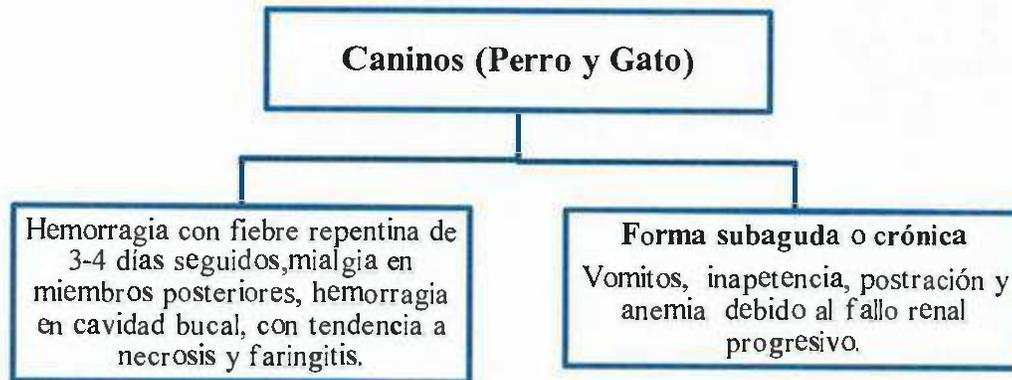
Fuente: Modificado de Sandow y Ramirez, 2005.

Figura 9. Presencia de serovares en cerdo.



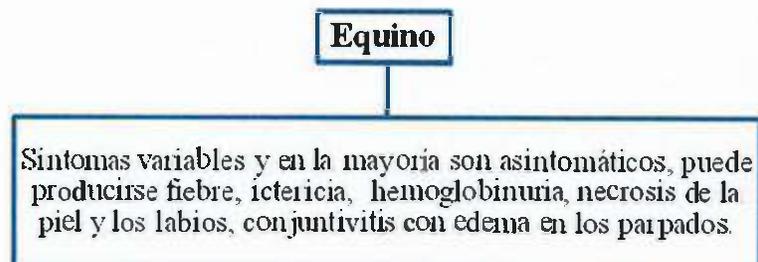
**Fuente:** Modificado de Sandow y Ramirez, 2005.

**Figura 10.** Presencia de serovares en ovino-caprino.



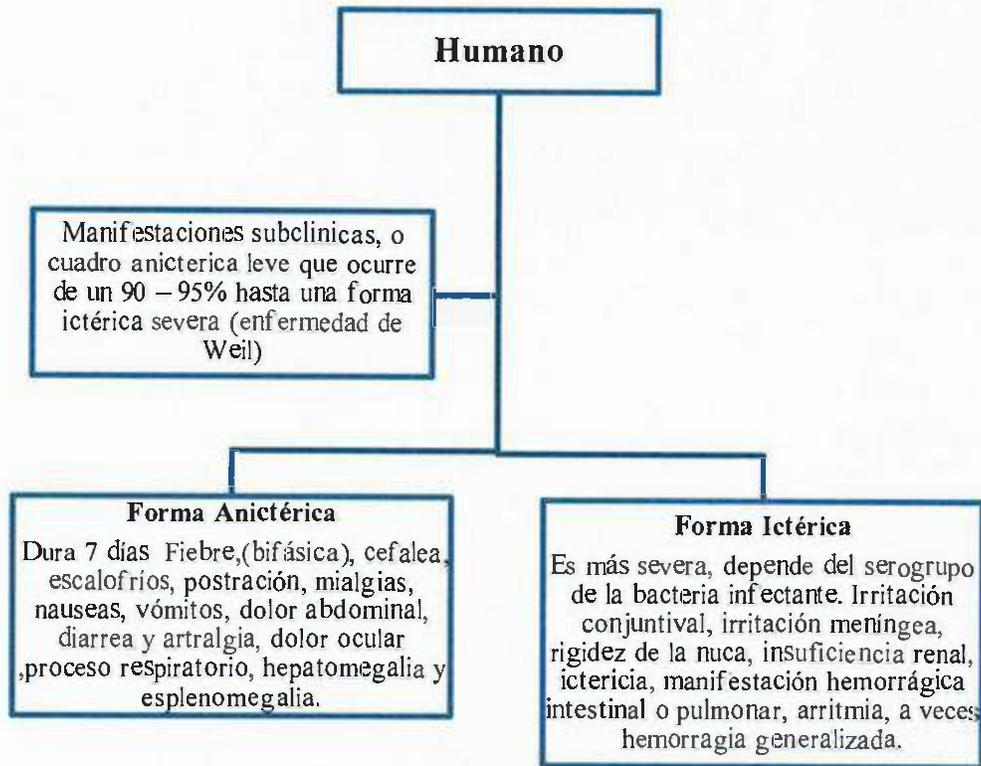
Fuente: Modificado de Sandow y Ramirez, 2005.

**Figura 11.** Manifestaciones clínicas de leptospirosis en caninos.



Fuente: Modificado de Sandow y Ramirez, 2005.

**Figura 12.** Manifestaciones clínicas en equinos.



**Fuente:** Modificado Sandow y Ramirez, 2005.

**Figura 13.** Manifestaciones subclínica en el humano.

## RESPUESTA INMUNOLÓGICA

El sistema inmune no existe en un órgano definido. Es un conjunto de tejidos, células y moléculas que interactúan y forman un frente común para integrar una respuesta: la llamada *respuesta inmune* (Abumohor, 2005).

El significado del término *inmune* se asocia históricamente a un mecanismo de *protección*. Deriva de la palabra latina: *immunis* que expresa: libre, exento de ciertos oficios, obligaciones, impuestos y castigos. El término se extendió para aplicarlo a personas que, después de haber padecido una enfermedad infecciosa, como la peste o la viruela, quedaban exentos de ataques ulteriores (Vega, 2008). El sistema inmune tiene un rol fundamental en la defensa contra infecciones, y es, al mismo tiempo, un sistema que tiende a mantener la homeostasis macromolecular del individuo (Abumohor, 2005). La respuesta inmunitaria hacia las infecciones incluye dos componentes principales: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Ahmad y cols., 2011; Vega, 2008; Abumohor, 2005).

**Tabla 3.** Componentes y características del sistema inmune

<b>Inmunidad innata</b>	<b>Inmunidad adquirida</b>
La inmunidad innata incluye la participación de los sistemas físico, celular y químico del organismo que responden a todos los aspectos de los invasores externos. Estos incluyen las barreras de mucosa, las células fagocíticas y la acción de las glucoproteínas circulantes como complemento.	El aspecto adaptativo se denomina en ocasiones inmunidad específica, debido a que tiene la capacidad para desarrollar nuevas respuestas que son sumamente específicas a los componentes moleculares de los agentes infecciosos y que se denominan antígenos. Estos encuentros activan el desarrollo de nuevas respuestas celulares y la producción de anticuerpos circulantes, que tienen un componente de memoria si el invasor regresa.
<b>Especificidad</b>	
Por estructuras compartidas por grupos de microorganismo	Por antígenos de microorganismo y otros antígenos no microbianos
<b>Diversidad</b>	
Limitada, codificada por genes de línea germinal	Extensa, receptores específicos codificados por recombinación génica
<b>Memoria</b>	
No	Si
<b>Autorreactividad</b>	
No	No en condiciones normales
<b>Componentes celulares</b>	
Fagocitos y células NK	Linfocitos
<b>Componentes solubles</b>	
Complemento, opsoninas, citoquinas	Anticuerpos, citoquinas.

Fuente: Abumohor, 2005; Ahmad y cols., 2011.

## INMUNOGLOBULINAS

Las sustancias elaboradas por el organismo ante un estímulo inmunogénico son los *anticuerpos*, cuya función fundamental es interactuar o combinarse específicamente con el antígeno que generó su formación (Guevara y cols., 2002). Se denominan inmunoglobulinas al conjunto de proteínas producidas por los linfocitos B estimulados por un antígeno (Zambrano, 2007), constituyen 20 % aproximadamente de las proteínas plásticas totales (Guevara y cols., 2002). Las inmunoglobulinas son glucoproteínas relacionadas, pero no idénticas (Parslow y cols., 2002; O'Farrill, 2012), son los principales mediadores de la inmunidad humoral frente a todo tipo de microorganismos (Romanillos, 2012). Se estima que cada persona tiene la capacidad de producir por lo menos  $10^8$  moléculas de anticuerpos diferentes, cada una con sus propiedades distintivas propias (Parslow y cols., 2002). Tiene la capacidad de combinarse específicamente con el antígeno y constituye la característica más evidente de las moléculas inmunoglobulinas (Zambrano, 2007; Brooks y cols., 2010). Los anticuerpos son moléculas bifuncionales, se fijan específicamente al antígenos, y también inician una diversidad de fenómenos secundarios, como activación del complemento, opsonización o transducción de la señal, que no están relacionados con su especificidad fijadora de antígeno (Parslow y cols., 2002).

### **Estructura**

Una glucoproteína compuesta de cadenas H y L, que funciona como anticuerpo. Todos los anticuerpos son inmunoglobulinas, pero no todas las inmunoglobulinas poseen la función de anticuerpos (Brooks y cols., 2010).

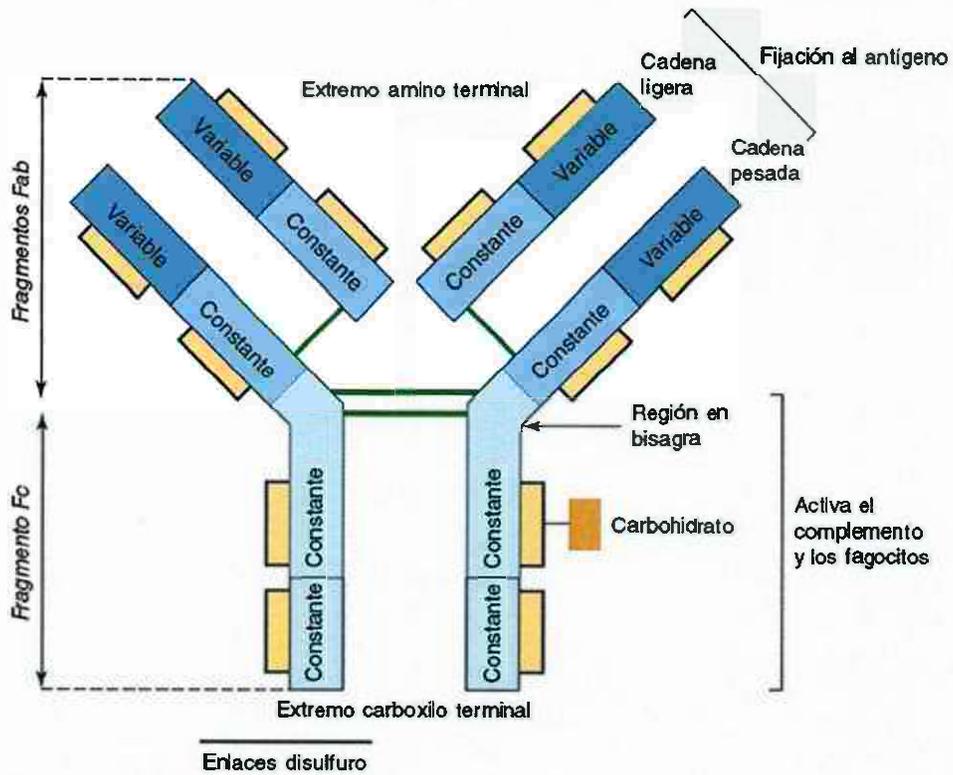
Su estructura básica se compone por 4 cadenas peptídicas dispuestas simétricamente de dos a dos (Figura 14). Cada plano de simetría está constituido

por una cadena pesada (H) y una ligera (L). Unidas por puentes disulfuro y otros enlaces covalentes (Romanillos, 2012).

Todas las moléculas de inmunoglobulina están constituidas por cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas. Los términos ligero y pesado se refieren al peso molecular; las cadenas ligeras tienen un peso molecular de casi 25 000, en tanto que las cadenas pesadas tienen un peso molecular cercano a 50 000 (Brooks y cols., 2010). Los atributos biológicos significativos se determinan por sus componentes polipeptídicos, aunque los carbohidratos sean la quinta parte de su composición (Romanillos, 2012; Parslow y cols., 2002; O'Farrill, 2002).

### **Tipos de Inmunoglobulinas**

El humano expresa cinco clases diferentes (o isótopos) de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, que difieren considerablemente en sus secuencias de la región CH, así como en sus propiedades físicas y biológicas (Parslow y cols., 2002). La clase de la cadena H determina la inmunoglobulina, por tanto, hay cinco clases de esta última: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Las inmunoglobulinas circulantes, presentan un componente de memoria, las cuales pueden ser rastreadas mediante pruebas inmunológicas con sus antígenos específicos. MAT es la principal prueba serológica para el rastreo de diferentes serotipos/serovares de *Leptospira interrogans* mediante la interacción del antígeno y el anticuerpo del paciente desarrollándose una respuesta de aglutinación específica para cada serovar, las inmunoglobulinas participantes son IgG e IgM (Brooks y cols., 2010; Zambrano, 2007; Parslow y cols., 2002)



Fragmentos Fab: "antigen binding fragment": zona de unión a antígenos

Fragmento Fc: "crystalline fragment": zona constante que interacciona con receptores celulares

Fuente: Brooks y cols., 2010

Figura 14. Estructura general de la inmunoglobulina.

La respuesta humoral cambia desde el primer día de la infección ya que el primer estímulo de anticuerpos es dado por la activación de IgM, a los 15 días aproximadamente dichos anticuerpos comienzan a descender y simultáneamente las IgG se activan, este momento se le llama estado de transición, en las cuales, las pruebas serológicas manifiestan la presencia de estos dos tipos de inmunoglobulinas, revelando que el paciente está pasando de un estado agudo a uno crónico en el cual se va a encontrar IgG solamente (Aricapa y cols., 2008). La figura 13 representa la presencia de las inmunoglobulinas por fases de la enfermedad.

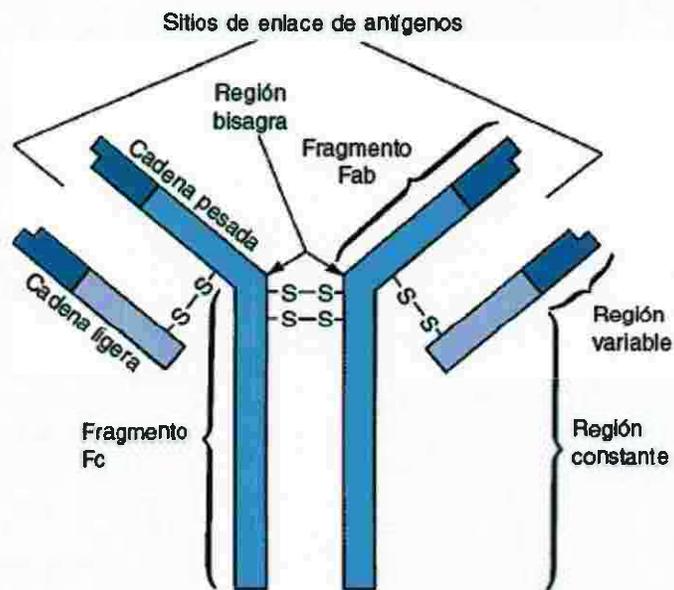
Las IgG son las más abundantes en individuos sanos y proporcionan la respuesta más amplia y duradera de los anticuerpos a los diversos antígenos microbianos y de otro tipo que se enfrentan a lo largo de la vida. De manera característica, el anticuerpo de la IgG se forma en grandes cantidades durante la respuesta secundaria a un estímulo antigénico y en general le sigue la producción de IgM en el curso de una infección viral o bacteriana (Ahmad y cols., 2011; Guevara y cols., 2002).

Las IgG constituyen del 80 al 85% de todas las inmunoglobulinas circulantes en sangre. Su vida media de 6 a 23 días. Se puede unir a macrófagos y puede atravesar membranas biológicas, por ejemplo placenta. Se encarga protección neonata durante primeros meses. Su concentración media en suero es 13.5 mg/dl. La concentraciones relativas de las subclases son: IgG1 60-70%, IgG2 14-20%, IgG3 4-8%, IgG4 2-6% (O'Farrill, 2012., Zambrano, 2007., Parslow y cols., 2002).



Fuente: Modificado Aricapa y cols., 2008.

Figura 15. Títulos de anticuerpos IgG e IgM por fase de la enfermedad.



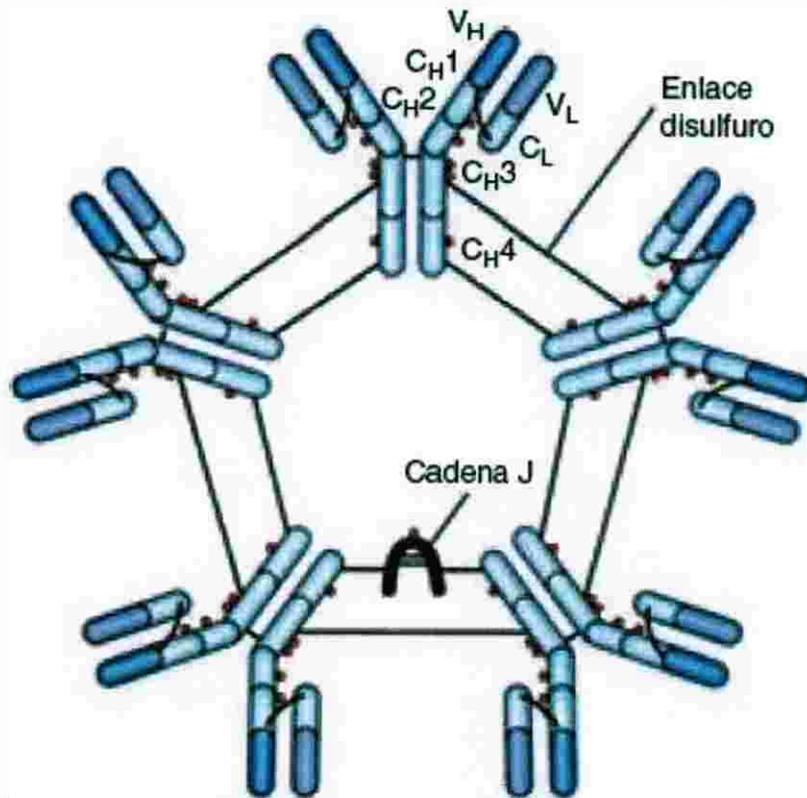
La molécula de IgG consiste en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas por enlaces disulfuro

Fuente: Ahmad y cols., 2011

Figura16. Estructura de la inmunoglobulina G

Las IgM representan del 5 al 10% de todas las inmunoglobulinas, junto con la IgD es la más frecuente en la superficie del linfocito B su vida media es de 5 días. Concentración sérica de 1.5 mg/ml. El grupo de las IgM son las que se forman más rápidamente en el proceso de la respuesta del sistema inmunológico y se reconoce que no pueden atravesar membranas biológicas. Las IgM se encuentran en circulación y son las primeras inmunoglobulinas que aparecen en exceso ante una estimulación por antígenos. Tiene reacción característica con la prueba del factor reumatoide. Es la inmunoglobulina fijadora del complemento más eficaz. (O'Farrill, 2012., Zambrano, 2007., Parslow y cols., 2002).

Debido a sus muchos sitios específicos de combinación, la IgM es particularmente eficaz para aglutinar partículas que transportan los epitopos contra los cuales están dirigidos. También contienen muchos sitios para fijar el primer componente del complemento, los cuales están disponibles una vez que la molécula de IgM ha reaccionado con el antígeno. La IgM es activa para causar un daño citolítico mediado por el complemento en las células portadoras del antígeno (Ahmad y cols., 2011; Guevara y cols., 2002).



La estructura de pentámero con enlaces disulfuro que unen cadenas de péptidos se muestra en negro; las cadenas laterales de carbohidratos se muestran en rojo. La cadena J une la molécula.

Fuente: Ahmad y cols., 2011.

Figura 17. Pentámero de la inmunoglobulina M

## PRUEBA DE MICROAGLUTINACION EN PLACA

### Métodos generales para el diagnóstico de *Leptospira interrogans*

La identificación por parte del laboratorio del agente causante de una enfermedad es crucial. El diagnóstico, por lo general se basa en síntomas clínicos, sin embargo por el polimorfismo clínico que presentan algunos agentes etiológico requieren de confirmación mediante pruebas de laboratorio, tal es el caso, de la presencia de *Leptospira interrogans* (denominado leptospirosis). Los síntomas clínicos pueden también ser poco claros o demasiado generales para identificar el patógeno definitivamente. El diagnóstico adecuado de laboratorio es, por tanto, importante no sólo para conectar casos individuales que podrían estar involucrados en un brote, sino también para asegurar el tratamiento adecuado para el paciente. Para ello se realizan los siguientes métodos más comunes:

#### **Cultivo**

El aislamiento del agente causal es la mejor manera de establecer un diagnóstico definitivo de leptospirosis, sin embargo, su lento crecimiento para su detección e identificación lo hacen poco práctico como método de rutina en la práctica clínica. El cultivo es de indudable importancia epidemiológica, aplicable al diagnóstico retrospectivo. Para el aislamiento de la *Leptospira* a partir de muestra sanguínea debe tomarse en los primeros cinco días después de la aparición de los síntomas, dependiendo de la evolución de la enfermedad, este microorganismo puede cultivarse de otros fluidos biológicos como orina, líquido cefalorraquídeo, peritoneal y amniótico. El cultivo debe incubarse a 30°C y examinarse cada semana al microscopio de campo oscuro por lo menos durante dos meses antes de descartarse como negativo.

Los medios de cultivo utilizados pueden ser líquidos (se recomienda EMJH) los cuales evidencian su crecimiento por la turbidez, o apariencia granular

en el fondo de los tubos en los cuales están creciendo; ambos pueden verse a simple vista pero debe confirmarse por la observación en el microscopio. Los medios semisólidos contienen 0,1 - 0,5% de agar (p/v), tales medios son de preferencia para el aislamiento de varias cepas y para el mantenimiento a mediano plazo (hasta varios años) y los medios sólidos contienen 0,8 - 1,3% de agar (p/v) y son dispuestos en tubos o en placas (OMS, 2008).

### Microscopía

El uso del microscopio para detectar las leptospiras en fluidos o tejidos podría ofrecer un diagnóstico rápido. Sin embargo, en las muestras de sangre obtenidas durante la fase leptospirémica la concentración de microorganismos es tan baja que no es posible su detección. Además, el examen directo de muestras clínicas o sus concentrados en el microscopio de campo oscuro y los métodos de tinción convencionales son poco sensibles. Por esta razón el diagnóstico microscópico debe confirmarse mediante cultivo y serología. (Solano y cols., 1996).

La observación en el microscopio de campo oscuro en fluidos biológicos (sangre, líquido cefalorraquídeo y orina) es difícil debido al gran número de artefactos que por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión. Además precisa que haya un gran número de microorganismos en las muestras (Jiménez, 2006; Leveett, 2001). Aproximadamente 104 *Leptospiras/ml* son necesarias para ser visibles por campo en el microscopía de campo oscuro. El método de capa leucocitaria cuantitativo ha demostrado recientemente tener una sensibilidad de aproximadamente 103 *Leptospiras/ml*. La sensibilidad de los métodos de doble centrifugación en muestra sanguínea con anticoagulante fue del 32 % de los pacientes cuyos leptospirosis fue confirmada mediante inoculación en animales de experimentación. Otros métodos que requieren de 104 a 105 *Leptospiras/ml* son radioinmunoensayo (RIA) y Inmunoabsorción ligado a enzimas método de ensayo (ELISA). Inmunolectroforesis y ELISA doble

sandwich son menos sensibles comparadas a los métodos anteriores (Leveett, 2001).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR se usa para detectar el ADN de *Leptospira* en muestras clínicas. Iniciadores (secuencias cortas de ADN que son específicas para leptospiras), en combinación con una polimerasa del ADN estable al calor, en presencia de nucleótidos y sometidos a ciclos de temperatura, amplifican una sección del ADN de *Leptospira*. La PCR puede ser empleada con sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejido ante o post-mortem (OMS, 2008).

### **Inmunofluorescencia (IFA)**

Esta técnica consiste en examinar muestras bajo luz ultravioleta. Casi siempre se utiliza en el diagnóstico para los casos de abortos y la presencia de *Leptospiras* en sedimentos de orina. Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros policlonales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia. Puede detectar *Leptospiras* en los tejidos o fluidos del feto o de animales infectados (OMS, 2008).

### **Inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)**

Es la prueba cualitativa ó cuantitativa para determinar presencia de anticuerpos contra *Leptospira*, la prueba sólo detecta anticuerpos género específicos y no es apropiada para la identificación del serogrupo o serovar. Los anticuerpos en los sueros a estudiar son puestos en contacto con un antígeno que está fijado en un soporte sólido como una placa de microtitulación. Luego de un período de incubación y de numerosos lavados para eliminar excesos de anticuerpos, se añade un anticuerpo antiespecie (a la cual pertenece el suero probado) conjugado con una enzima (Leveett, 2001).

### **Electroforesis de campo pulsado (ECP)**

En la electroforesis de campo pulsado (ECP), enzimas de restricción, tales como *NotI*, se usan para diferenciar entre *Leptospira* sp y entre cepas. Tales enzimas cortan el ADN en fragmentos largos separados electroforéticamente en geles de agarosa, dando patrones característicos. Este método ofrece la ventaja de poder interpretarse de una manera simple ya que están presentes sólo bandas grandes (OMS, 2008)

### **Técnica de Aubiidot**

Es un inmunoensayo indirecto en fase sólida empleando inmunosondas de oro coloidal amplificado con reveladores de plata utilizando antígenos de *Leptospira biflexa*, serogrupo *samaranga*, cepa *patoc* para detectar, in vitro, anticuerpos contra *Leptospira* patógena: modificación de la técnica para el control de la vacuna GAVAC (Machado y cols., 2009).

### Microaglutinación en placa (MAT)

La prueba de MAT pertenece al grupo de los métodos serológicos los cuales brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales que pueden ser de la clase IgM e IgG (Borbolla y cols., 2009). La prueba de microaglutinación en placa (MAT) es una reacción serológica, recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual es considerada como “*la prueba de oro*” para el diagnóstico de leptospirosis (Ministerio de Salud, 2010).

La reacción de MAT se basa principalmente en la aglutinación de antígenos vivos de superficie (Solano y cols., 1996), cuya ventaja más importante es ser altamente específica (serovar/serogrupo) para la detección de anticuerpos antileptospira en suero de pacientes humanos y de animales (Velineni y cols., 2007; Rodríguez, 2011). También se le conoce como la “prueba de lisis” debido a la formación de grumos de lisis o glóbulos de lisis de los desechos celulares en presencia de antisuero de alta titulación, que contienen células vivas y no residuos (Leveett, 2001).

#### **Fundamento de la reacción de MAT**

Esta técnica está basada en la formación de agregados de bacterias que resultan de la adición de una suspensión de *Leptospiras* en suero (Jiménez, 2006). Los anticuerpos antileptospiras presentes en el suero hacen que las *Leptospiras* se peguen unas a otras formando grumos. Este proceso de agrupamiento es llamado aglutinación para ella se incuban los sueros de los pacientes con el antígeno de los serovares de *Leptospira*, se examinan en el microscopio de campo oscuro para observar la aglutinación y se determina el título de la muestra (Céspedes, 2007; Leveett, 2001; Acha y Szyfres 2001).

### Requerimientos de la muestra

Sangre completa o suero extraída lo más precozmente posible frente a sospecha de la enfermedad (Anzalone, 2004). En caso de no utilizar las muestras inmediatamente el suero debe depositarse en viales, los cuales se mantienen congelados a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la prueba de MAT (Medrano y cols., 2011). Es necesario tener muestras de suero pareadas para confirmar el diagnóstico con certeza, por lo que para considerar un caso positivo se necesita un incremento de cuatro veces el título en los sueros pareados sin importar el intervalo entre las muestras; o una conversión del seronegativo a un título de 1/100 (Céspedes., 2005; Leveett, 2001). Se requiere estudiar muestras pareadas de 7-14 días de intervalo de la primera y si se observa que ha habido seroconversión, se considera de valor diagnóstico es necesario un intervalo más largo entre las muestras o muestreo repetido (Sandow y Ramírez, 2005; Jiménez, 2006).

Durante la fase aguda de la enfermedad las *Leptospiras* pueden ser aisladas de sangre o líquido cefalorraquídeo y pueden aparecer en orina a partir de la segunda semana desde el inicio de la enfermedad. Para muestras de orina debe realizarse el cultivo lo más pronto posible, ya que las espiroquetas sobreviven unas pocas horas en la orina con pH ácido.

La serología MAT es insensible, particularmente en muestras tempranas de fase aguda (Branda'O y cols., 1998; Leveett, 2001). En muchas de las regiones el problema es que se cuenta con una sola muestra, entonces la determinación de la infección aguda es a veces sugerida por un solo título elevado. La magnitud de un título es dependiente de la exposición y por lo tanto la seroprevalencia (Céspedes., 2005, Leveett, 2001).

La tabla 4 muestra los títulos y su diagnóstico clínico, sin embargo, se puede presentar reacciones cruzadas con varios serogrupos, los cuales disminuyen en títulos diferentes meses después de la infección. Si es posible, es importante examinar varios sueros tomados a intervalos después de la enfermedad aguda con el fin de determinar el serogrupo infectante presuntivo. En raras ocasiones, la seroconversión puede retrasarse durante varias semanas después de la recuperación, y la serológica de seguimiento será necesario para confirmar el diagnóstico. Algunos pacientes tienen evidencia serológica de infección previa con un serogrupo de *Leptospira* diferente. En estos casos, el diagnóstico serológico se complica aún más por la "respuesta anamnésica," en el que el primer aumento del título de anticuerpos por lo general se dirige contra el serovar infectante de la exposición anterior. Sólo más tarde se hace posible identificar el serogrupo responsable de la infección actual, como el título de anticuerpo específico se eleva. Reacciones paradójicas también se producen en los pacientes que tienen este tipo de infecciones, y la interpretación de la serología es aún más complicada (Leveett, 2001).

**Tabla 4.** Títulos de MAT y su cuadro clínico

Títulos obtenidos por MAT	Cuadro Clínico	Tipo de población
≥ 200	Cuadro clínico compatible con la enfermedad	Población no frecuente en leptospirosis
≥ 800	Indicativo de leptospirosis	Zona tropical leptospirosis endémica
≥ 1,600	Leptospirosis evidente	
≥ 25,600	Después de la infección aguda	

Fuente: Modificado Leveett, 2001

## Recolección de la muestra

Procedimiento especializado que consiste en la obtención de uno o varios especímenes biológicos con el fin de encontrar la causa o factores que afectan la salud. Por tal motivo es importante garantizar la calidad en la obtención de la muestra y la información que debe acompañarla durante el proceso que comienza en la fase previa al análisis, que incluye la preparación, la obtención y el transporte, lo cual concluye en el análisis de la muestra. Errores en cualquiera de las fases llevan a pérdidas económicas y temporales, mala utilización de recursos y, lo más grave, a errores diagnósticos de gran impacto en el pronóstico y la seguridad en la atención de los pacientes. A continuación se describe las recomendaciones para la toma de muestra de los diferentes fluidos biológicos y su manejo para la identificación de *Leptospiras*.

Extracción de 5 ml de sangre en tubo de ensayo con heparina sódica, para ser empleada en hemocultivo en los primeros 10 días de la enfermedad. El cultivo de la sangre después de los 10 días de la aparición de la enfermedad no es recomendado, ya que las *Leptospiras* han desaparecido del torrente sanguíneo y los anticuerpos habrán comenzado a ser detectables en el suero permitiendo el serodiagnóstico. Las muestras para cultivo deben ser guardadas y transportadas a temperatura ambiente, debido a que las bajas temperaturas son perjudiciales para las *Leptospiras* patógenas.

1. Empleo de suero para serología, deben obtenerse preferiblemente dos muestras con un intervalo de varios días con base a la fecha de aparición o inicio de la enfermedad y el tiempo probable de seroconversión. El análisis de muestras pareadas es necesario para detectar un incremento en los títulos entre ambas muestras o la seroconversión, y por tanto para confirmar el diagnóstico de la leptospirosis. Un resultado serológico negativo en la fase aguda de la enfermedad no excluye la leptospirosis.

2. Orina para cultivo. Las *Leptospiras* mueren rápidamente en la orina por lo que el uso de orina para cultivo puede ser valioso solamente cuando es posible obtener una muestra limpia que pueda ser inoculada en un medio de cultivo apropiado en no más de 2 horas después de haber sido recogida.
3. Muestras postmortem. Es importante coleccionar muestras del mayor número de órganos posibles, incluyendo cerebro, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, pulmones, riñones, hígado, páncreas y corazón, y si es posible, sangre del corazón, para serología. Las muestras postmortem deben ser obtenidas asépticamente y tan pronto como sea posible después de la muerte; deben ser inoculadas el medio de cultivo lo más rápido que se pueda.
4. Líquido cefalorraquídeo. Corresponde a 3ml, depositado en un tubo estéril conservado a temperatura de refrigeración; no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio.
5. Exudados y biopsia de hígado, deben enviarse en frascos estériles, sin adición de sustancias químicas y en condiciones de refrigeración; no pasar de 24 horas para su envío y recepción en el laboratorio, en caso contrario pueden conservarse con hielo seco o en nitrógeno líquido al laboratorio, mediante lo cual se evita su descomposición durante su transportación cuando esta sobre pasa las 24 horas (SSA, 2012; NOM-029-SSA2-1999)

### **Antígenos**

Los antígenos que se utilizan en esta técnica son cultivos de vivos (Sandow y Ramírez., 2005; Jiménez., 2006; Medrano y cols., 2011). La prueba requiere de *Leptospiras* con 10 días de crecimiento en medio de cultivo líquido EMJH y requiere de evaluación previa como la edad, tiempo de incubación, temperatura, punto de corte y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación (Carbrey, 1960; Sandow y Ramírez, 2005; Bello-Piericcini y Rodríguez-Villa, 2011; OMS, 2008). Para la realización de la prueba se utilizan cultivos jóvenes con una transmitancia del 60-70 % a 400 nm de

longitud de onda (Sandow y Ramírez, 2005). Esta prueba se utiliza para la confirmación serológica de una infección reciente y pasada por *Leptospira* (Solano y cols., 1996; SSA, 2006).

El medio de cultivo líquido Fletcher es otra alternativa al cual se adiciona Tween 80-albúmina de 1 a 3 gotas en 5 ml de medio e incubadas a 28-30°C en la oscuridad durante 5 a 6 semanas (Gonzales y cols., 2006). En los medios de crecimiento semisólidos el crecimiento de *Leptospiras* se aprecia la formación de un anillo de turbidez debajo de la superficie, de unos 0,5 a 1 cm de espesor, que aparece de 6 a 14 días posteriores a la inoculación. La adición de 5-fluoruracilo al medio evita la contaminación bacteriana y permite mejores aislamientos (García-Vázquez y cols., 2012).

#### **Principales técnicas de microaglutinación en placa (MAT)**

La prueba de microaglutinación en placa (MAT) es considerada la “prueba de oro” o la piedra angular del serodiagnóstico por su insuperable especificidad diagnóstica (serovar/serogrupo) en comparación con las otras pruebas disponibles actualmente (SSA, 2012). La tabla 5 muestra los serovares empleados por diversos investigadores empleando MAT como prueba para el diagnóstico de leptospirosis.

**Tabla 5.** Principales serovares identificados por pruebas de MAT

Autores	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
Vanasco, y cols., 2012	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>canicola</i>	<i>canicola</i>	H. Utrecht IV
		<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>	M20
			<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
		<i>pomona</i>	<i>pomona</i>	Pomona
		<i>pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	Salinem
		<i>sejroe</i>	<i>Wolffi</i>	3705
			<i>Hardjo</i>	Hardjoprjait no
		<i>bataviae</i>	<i>bataviae</i>	Swart
		<i>australis</i>	<i>australis</i>	Ballico
	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>ballum</i>	<i>castellonis</i>	Castellón 3
		<i>tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>	Perepelitsin
		<i>sejroe</i>	<i>Sejroe</i>	M 84
	<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>grippothyphosa</i>	<i>grippothyphosa</i>	Moskva V
<i>Leptospira biflexa</i>	<i>semaranga</i>	<i>patoc</i>	Patoc 1	
Navarrete y cols., 2011	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>hardjo</i>	<i>Hardjo</i>	
		<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	
		<i>pomona</i>		
		<i>canicola</i>		
		<i>Shermani</i>		
Velasco y cols., 2009	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	

Autores	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
Borbolla y cols., 2008	<i>Leptospira interrogans</i>	Bratislava	<i>bratislava</i>	
		Hardjo	<i>hardjo</i>	
		Autumnalis	<i>autumnalis</i>	
		icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	
		Ballum	<i>castellonis</i>	
		canicola	<i>canicola</i>	
		<i>pomona</i>		
		<i>pyrogenes</i>		
		<i>Muenchen</i>		
		<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>tarassovi</i>	
Agudelo y cols., 2007	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>grippotyphosa</i>		
		<i>copenhageni</i>		
		<i>pomona</i>		
		<i>icterohaemorrhagiae</i>		
		<i>hardjo</i>		
		<i>pyrogenes</i>		
		<i>australis</i>		
		<i>wolffi</i>		
		<i>Canicola</i>		
		<i>ballum</i>	<i>castellonis</i>	
		<i>Bratislava</i>		
		<i>Cinopteri</i>		

Autores	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>tarassovi</i>		
	<i>Leptospira biflexa</i>	<i>Semaranga</i>	<i>Patoc</i>	
Obregón y cols., 2004	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>ballum</i>		
		<i>canicola</i>		
		<i>pomona</i>		
		<i>icterohaemorrhagiae</i>		
		<i>sejroe</i>		
		<i>hebdomadis</i>		
Navarro y cols., 2004	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>		
		<i>Canicola</i>		
		<i>Pomona</i>		
		<i>Australis</i>		
		<i>Hebdomadis</i>		
		<i>sejroe</i>		
	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Tarasovi</i>		
Obregón y cols., 2003	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>		
		<i>canicola</i>		
		<i>Pomona</i>		
		<i>australis</i>	<i>Ballico</i>	
		<i>ballum</i>	<i>castellon 3</i>	<i>Su73/II</i>
		<i>hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	

R. 7170017

Autores	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
		canicola	canicola	Van Thienen
		Hardjo	Hardjoprajitino	Hond Utrecht
		Copenhageni		H45 cepa
		Sejroe		M 84
		Wolffi		3705
		Pyrogenes	Salinem	
		Bataviae		
		icterohaemorrhagiae		RGA
	<i>Leptospira grippityphosa</i>	Moskva	perepelicin	
	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Tarassovi		

Fuentes: Modificado de Chappel y cols. 1998; Navarro y cols., 2004; Obregón y cols., 2007; Velasco y cols, 2009; Vanasco, y cols., 2012, Brandaño y cols., 1998, Agudelo y cols., 2007.

### **Procedimiento general de la prueba de MAT**

Registrar la muestra de suero la cual debe ser pareada en la bitácora de trabajo.

#### **Preparación del antígeno**

1. Preparar la base del medio EMJH de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial y realizarle la prueba de esterilidad incubándolo a 37° C por 24 horas para ver si hay contaminación.
2. Envasar en cantidades de 9 ml en tubos tapa rosca.
3. A partir de un cultivo puro de una semana de incubación se replica 1 ml en el tubo que tiene los 9 ml del medio EMJH preparado antes.
4. Cultivar cada una de las especies de 6 a 9 días en medio de polisorbato con albumina bovina (medio EMJH) Incubar de 4 a 10 días entre 28 y 30°C,
5. Donde se ajusta con buffer salino de fosfato (PBS; 5mM, pH 7.2) a una densidad óptica equivalente a 0.5 unidades de turbidez en la escala de McFarland usados como antígenos.
6. Todas las semanas se debe repetir el mismo proceso ya que los antígenos deben tener de 4 a 10 días máximo de incubación.

#### **Determinación de la identidad**

Se debe realizar determinación de identidad de las cepas para saber que se encuentran puras es decir que no están cruzando con otros serovares para lo cual se realizan diluciones de los antisueros incluyendo la dilución de un suero negativo comercial, luego se le adiciona el antígeno preparado, se incuba como se indicó anteriormente y se lee en microscopio de campo oscuro. Se debe ver reacción de aglutinación únicamente con el antisuero respectivo de lo contrario hay contaminación cruzada con otro serovar (Bello y cols.2011).

### Preparación de la muestra

Se prepara una dilución 1:40 suero: PBS (a 3.9 ml de PBS, agregar 0.1 ml del suero), en un tubo de ensaye limpio previamente rotulado con el número de registro de la muestra a analizar y la fecha de realización. Homogenizar y dejar en reposo por 20 minutos las diluciones de las muestras se conservan en refrigeración durante 5 días después de los cuales se desechan; en el caso de no haber terminado el proceso se vuelve a realizar la dilución. Del suero diluido 1:40 tomar 50µL y adicionar 50µL del antígeno a ensayar, homogenizar cuidadosamente. La figura 18 muestra la distribución del control positivo (C<sup>+</sup>) y negativo (C<sup>-</sup>), buffer (solución PBS), y pacientes (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> etc.). Se cubre la placa para evitar evaporación, y se incuba por una hora y media a 30°C. Cada pozo se examina directamente para observar aglutinación en el microscopio de campo oscuro con el objetivo de 10X si se analizan más muestras en un mismo día ya no es necesario incluir con controles. La tabla 6 muestra los serogrupos/serovares recomendados por la OMS.

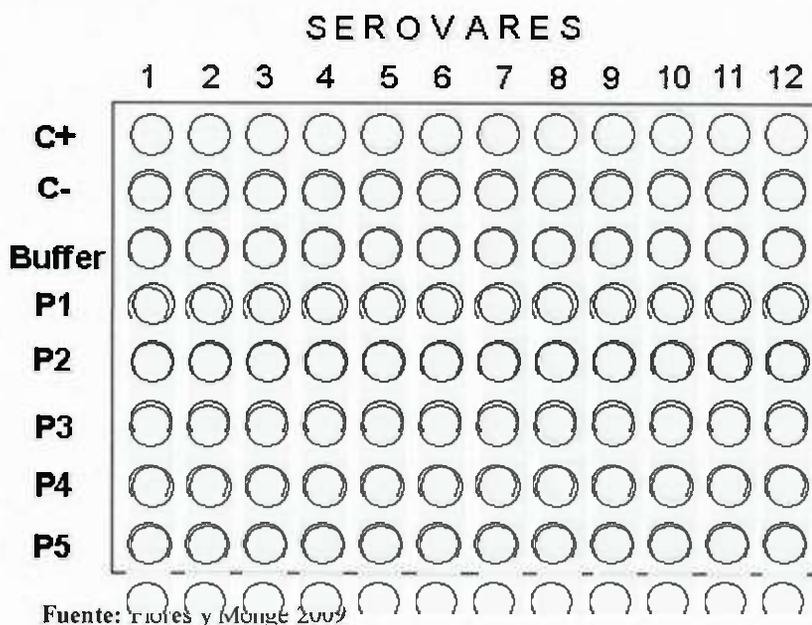


Figura 18: Placa de Microelisa de las muestras y controles

**Tabla 6. Serogrupos recomendados como antígenos para MAT**

Serogrupo	Serovar	Cepa
Andamana	Andamana	CH11
Australis	Australis Bratislava	Ballico Jez Bratislava
Autumnalis	Autumnalis Rachmati	Akiyami A Rachmat
Ballum	Ballum	Mus 127
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	copenhageni icterohaemorrhagiae	M20 RGA
Javanica	Javanica Poi	Veldrat Batavia 46 Poi
Panamá	Panamá	CZ214
Pomona	Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Hardjo saxkoebing sejroe	Hardjoprajitno Mus24 M84
Semarang	Patoc	Patoc 1
Shermani	Shermani	LT821
Tarasovi	Tarasovi	Perepelitsin

Fuente: Bello y cols.2011

### Interpretación de resultados

En la parte correspondiente a positivos y negativos, el laboratorio debe informar solo los casos confirmados mediante criterios establecidos que son:

- Positivo se considera cuando:

- ✓ Mediante muestras pareadas se obtiene una seroconversión mayor o igual a 4 veces el título inicial.
- ✓ En muestra única al observar títulos  $\geq 1:1280$  para cualquier serovariedad de *L. interrogans* (Figura 19).
- ✓ Muestras únicas que por situaciones de emergencia o en decesos, no se pueda obtener una segunda muestra, casos clínicamente sospechosos o con riesgo epidemiológico, donde al analizar por microaglutinación (MAT) se obtiene un título mayor o igual a 1:80 y menor a 1:1280, y es IgM positivo con el equipo de diagnóstico rápido (Tabla 7).

- Negativo, se considera cuando:

- ✓ Mediante muestras pareadas no se observa seroconversión mayor o cuatro veces igual al título inicial.
- ✓ Muestras únicas que por situaciones de emergencia o en decesos, no se puede obtener una segunda muestra, casos clínicamente sospechosos o con riesgo epidemiológico y donde al analizarse para la IgM sea negativo con el equipo de diagnóstico rápido (previamente validada y aprobada por el InDRE) y que por microaglutinación (MAT) se obtengan títulos negativos o menores a 1:1280 para cualquier serovariedad.
- ✓ No es posible realizar la confirmación del resultado inicial con una segunda muestra por lo que se deberá colocar el número total de muestras únicas (indeterminados) ya que sean negativos o positivos (considerando como positivos títulos desde 1:80 y menores de 1:1280).

Control Negativo



50% de aglutinación



100% aglutinación



Fuente: Bello y cols., 2011

Figura 19. Interpretación microscópica de campo oscuro de la aglutinación en placa.

Tabla 7. Formas de reportar los resultados de aglutinación de MAT

Lectura	Reporta	Células aglutinadas %	Células libres %
++++	(4 +)	75 a 100	25 a 0
+++	(3 +)	50 a 75	50 a 25
++	(2 +)	25 a 50	75 a 50
+	(1 +)	1 a 25	99 a 75

Fuente: Modificado Leveett, 2001

### Titulación

Las muestras a analizar y sus respectivas diluciones se registran, solo se realiza titulación a aquellas muestras que en el tamiz presentaron aglutinaciones iguales o mayores a 2 cruces.

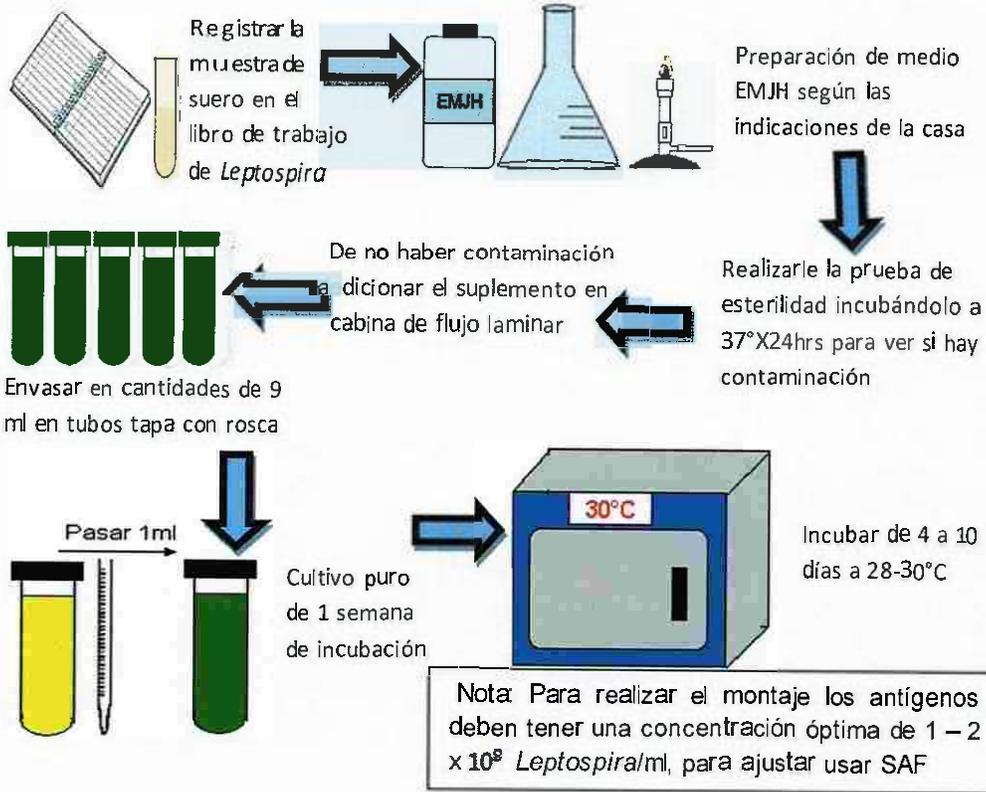
1. Dichas muestras de manera inicial se llevan a 4 diluciones (1:80, 1:160, 1:320, 1:640) y se colocan en pozos consecutivos de la placa de manera vertical.
2. Se colocan 100  $\mu$ L de la muestra a analizar en el primer pozo, y así consecutivamente el resto de las muestras en sentido horizontal.

3. Se adicionan 50  $\mu$ L de PBS en los siguientes tres pozos en sentido vertical de donde se colocó la muestra
4. Posteriormente se toman 50  $\mu$ L de la muestra colocada en el primer pozo y se vacían en el siguiente pozo que contiene PBS, se agita aproximadamente 10 veces con una micropipeta, después se toman 50  $\mu$ L y se repite la operación en el siguiente pozo y de nuevo en el último pozo con PBS, de ahí, después de agitar se toman 50  $\mu$ L y se desechan, en total por cada muestra se ocupan 4 pozos, el primero solo con la muestra y los otros tres con muestra y PBS (que corresponden a las diluciones).

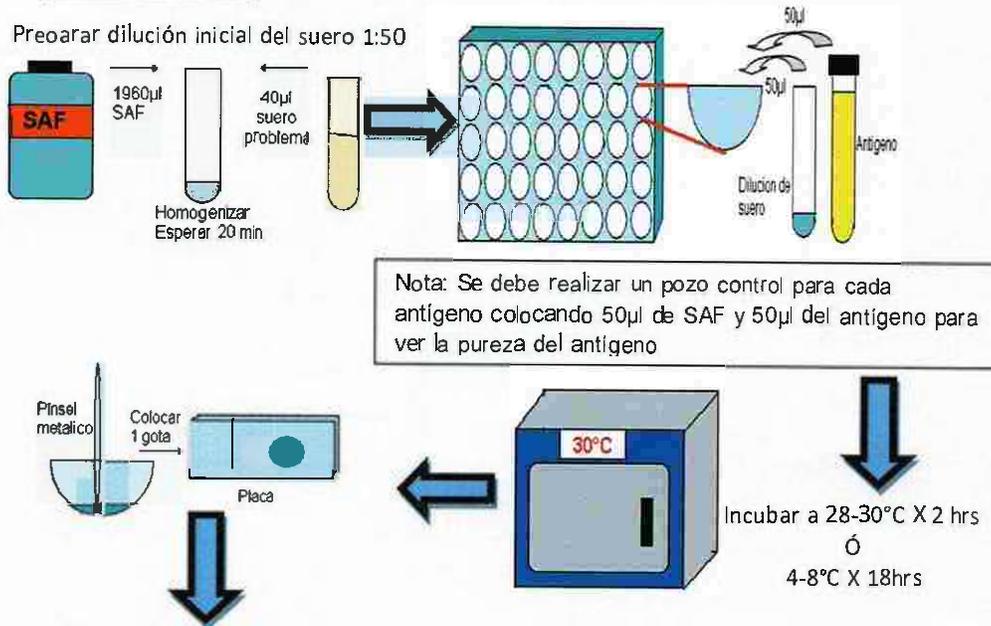
Cada pozo queda con un volumen total de 50  $\mu$ L, posteriormente a cada dilución se le adiciona 50  $\mu$ L del serovar al que haya sido positivo en el tamiz. Se usa una punta limpia para cada dilución y para cada serovariedad.

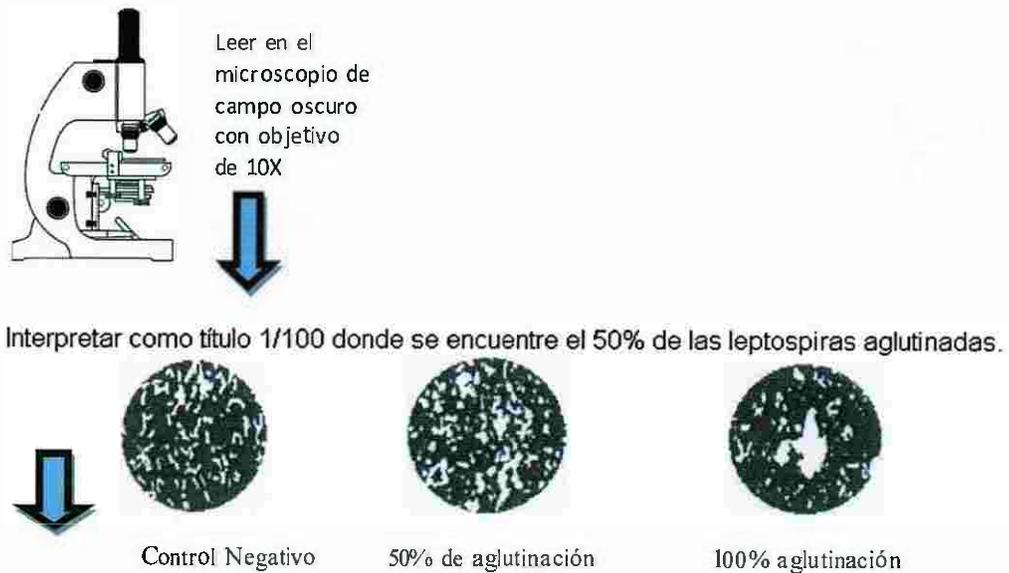
5. Se apilan las placas, se cubren de la luz y se incuban a 30° C durante 90min. Una vez transcurrido el tiempo, se realizan las lecturas de microaglutinación, el título de corte será la última dilución donde la cantidad de aglutinaciones sea igual a 2+, si en la mayor dilución (1:640) se obtiene una lectura de 2+ aglutinaciones, entonces se deben realizar diluciones mayores, pues no hay manera de asegurar que a diluciones mayores ya no haya aglutinación, por lo tanto en estos casos se procede a realizar una segunda serie de diluciones (1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240), se obtiene una lectura de 2+ aglutinaciones, entonces se deben realizar diluciones mayores, pues de igual manera no se puede asegurar que a diluciones mayores ya no haya aglutinación, en este caso se procede a realizar una tercera serie de diluciones (1:20480, 1:40960, 1:81920, 1:163840, 1:327680, 1:655360, 1:1310720 y 1:2621440). La figura 19 muestra el procedimiento general de la prueba de MAT.

## Preparación de antígenos



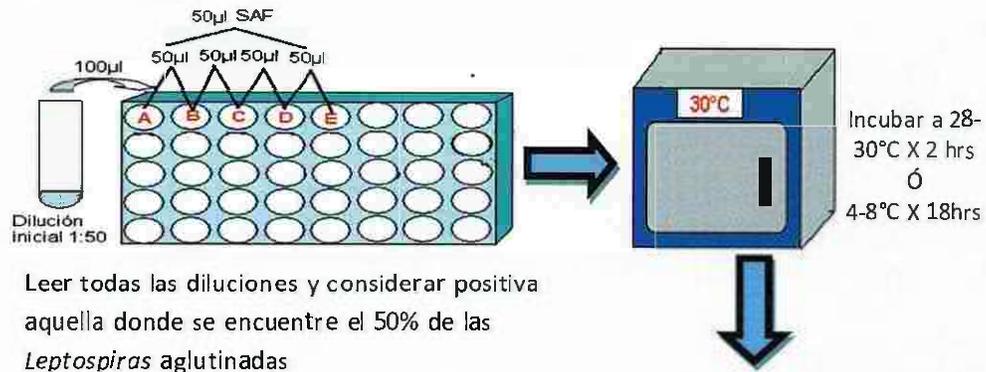
## Prueba cualitativa





**Prueba cuantitativa**

Después de ver alguna reacción positiva se procede a realizar diluciones desde 1:100 hasta 1:3200 de la siguiente manera



**Figura 20.** Diagrama de flujo de la Prueba MAT.

## BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para trabajar con leptospiras se requieren los procedimientos estándar de un laboratorio microbiológico. Las leptospiras son susceptibles a la desecación, ácidos, a desinfectantes y antisépticos fenólicos y detergentes, y al calor. Los derrames o salpicaduras en pisos y mesas del laboratorio y pisos de bioterios deben ser desinfectados. Los accidentes de laboratorio suponen el mayor peligro para el personal de laboratorio, en especial aquellos que involucran penetración en la piel y cortaduras, junto con salpicaduras en los ojos provenientes de agujas y jeringas usadas para la inoculación de animales. El uso de la boca para pipetear cultivos de *Leptospira* y suero está estrictamente prohibido. Todo el material de vidrio debe tener su seguridad verificada (p.ej. sin bordes cortantes) antes de ser lavados.

El personal de laboratorio que manipula muestras de sangre o suero humano para cultivo o serología también está expuesta al riesgo de otras infecciones (hepatitis viral, VIH, etc.), que pueden ser serias o incluso fatales. Se debe usar guantes cuando se manipulan muestras de suero.

Si ocurre un accidente, por el cual un miembro del personal se infecta o cree estar en riesgo de infección con leptospiras patógenas, se recomienda comenzar un tratamiento profiláctico con antibióticos. Cuando se manipulan nuevos aislamientos y cepas virulentas, se requiere que todo el personal reporte o notifique cualquier enfermedad febril.

Se deben tomar medidas para prevenir el contacto directo de las manos sin protección u otra parte de la piel o ropa con salpicaduras de suero o sangre de derrames o fugas de recipientes.

El calentar las muestras de suero (30 minutos a 56 °C) eliminará muchos agentes infecciosos, pero no todos.

El personal de laboratorio debe tener una muestra de suero de control, congelada, para compararla con otra, si ocurre un accidente de laboratorio o se sospecha de una exposición a la infección.

Todo el personal debe estar inmunizado contra hepatitis B, debe considerarse la inmunización contra leptospirosis, dependiendo del grado de exposición a animales infectados y la disponibilidad de una vacuna apropiada. Otras vacunas contra otras zoonosis, tales como la rabia, deben ser administradas cuando sea necesario (OMS 2008).

### **Condiciones de Bioseguridad**

*Leptospira* sp debe manipularse de acuerdo al nivel 2 de Bioseguridad, correspondiente a la clasificación internacional de Riesgo.

Equipamiento de contención adecuado para cada especie, equipamiento de protección individual, uso de protección facial y respiratoria. (OMS, 2004).



Fuente: OMS, 2004.

**Figura 21:** Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2.

## PREVENCIÓN Y CONTROL

El control consiste en evitar la exposición al agua que puede estar contaminada, y disminuir la contaminación, por eliminación de roedores.

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

Tales medidas incluyen:

- ✓ La reducción de una determinada población animal reservorio, p.ej. ratas;
- ✓ La separación de los animales reservorios de las viviendas humanas a través de cercas y mallas.
- ✓ La inmunización de perros y ganado.
- ✓ Eliminación de la basura y mantenimiento de la limpieza en las áreas alrededor de las viviendas humanas.
- ✓ Motivación de la personas a no dejar alimentos a su alrededor, especialmente en áreas recreativas, en donde las ratas pueden estar presentes (OMS, 2008).

## CONCLUSIÓN

Leptospirosis es una patología causada por la bacteria *Leptospira interrogans*. La infección por *Leptospira* tiene un espectro clínico muy amplio, su diagnóstico clínico puede presentarse desde un cuadro pseudogripal hasta complicaciones más graves con compromiso en órganos y sistemas.

El diagnóstico de leptospirosis requiere de técnicas especiales que permitan evidenciar la presencia de la bacteria de forma directa e indirecta, entre ellas, la prueba de microaglutinación en placa (MAT) también conocida como la “prueba de oro” por la OMS siendo la más específica, eficiente y estandarizada.

La prueba MAT permite detectar que serotipo/serovar puede ser causante de leptospirosis y por ende se puede sospechar el tipo de vector o reservorio animal.

## LITERATURA

- Abumohor G. P. (2005). Fisiología de la Respuesta inmune, sección de inmunología Hospital clínico, Revista Reumatología 2005, Vol.21 (2):51-57.
- Acha-N. P., Szyfres B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales: Otras formas de Leptospirosis. Organización Panamericana de Salud. 3ª edición Vol.1 (580):175-185
- Agudelo-Flórez P. (2005). Leptospirosis diagnostico serológico. Rev.Med. Vol.19 (1):37-41.
- Agudelo-Flórez P., Restrepo M., Moreno N. (2008). Diagnóstico de leptospirosis de muestras de sangre y cultivo por observación en microscopio de campo oscuro. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Revista Biomédica, Vol.28 (1):7-9
- Aguinaga-Recuenco A., Mesarina-Gutiérrez A. (2000). Leptospirosis, Ministerio de Salud, Módulos técnicos (2) Lima, Perú.
- Ahmad N., Drew W.L., Plorde J.J. (2011). Microbiología Médica 5ª Edición. Editorial MC Graw-Hill.
- Andicoberry A., García-Peña F.J., Ortega-Mora L.M. (2001). Epidemiología, Diagnostico y Control de la Leptospira Bovina. Invest: Prod. Sanid. Anim. Vol. 16 (2): 205-225
- Anzalone-Cantoni L., Arenas-Jiménez C., Ballesté-Allaniz R., Bazet C., Blanco-Tolosa J., Legnani-Cardoso M., Rodríguez-Cuns G., Salvatella-Agrelo R., Seija-Scarone V. (2004). Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Departamento de laboratorio clínico repartición microbiología hospital de clínicas facultad de medicina Montevideo – Uruguay. OPS, Vol.299 (04): 17-37

- Arbey-Hoyos J., Arango J.H., De Lima E. (1998). Leptospirosis icterohemorrágica. Presentación de un caso. Revista Colombia Médica. Editorial Medica del Valle Vol. 29 (1): 43-46
- Aricapa H.J. Pérez J.E., Cabrera I.C., Rivera K. (2008). Valoración de la Respuesta de Anticuerpos tipo IgM e IgG frente a *Leptospira* en Bovinos. Revista Biosalud, vol. 7(1): 29-39.
- Bello-Pieruccini S., Rodríguez-Villamarín. (2011). Manual de *Leptospira* ssp. OMS. Vol. 1: 1-20.
- Borbolla-Sala M.E., García-Vanegas L., Cárdenas-Martínez M.T., Hernández-Hernández R., De la Fuente-Gutiérrez J.C., Piña-Gutiérrez O.E., Rodríguez-León A. (2009). Leptospirosis durante la contingencia ambiental por inundación en Tabasco 2008. Revista Salud en Tabasco, Vol.15: 860-867.
- Branda 'O A.P., Camargo E.D., da Silva E.D., Silva M.V., Abrao R.V. (1998). Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human Leptospirosis. Revista JMCJ, Vol.36 (11):3138 -3142
- Brooks F.,Carroll K.C., Buter J.S.,Morse S.A., Mietzner T.A.,Jawetz Melnick y Adelberg.(2010). Microbiología medica.25ª Edición. Editorial Me Graw-Hill.
- Buriticá-Gaviria E.F., Echeverry-Bonilla D.F., Cruz-Sarmiento L.J. (2008). Leptospirosis en el departamento del Tolima, Colombia, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, Vol.3 (1):42-47
- Chappel R.J., Khailik D.A., Adler B., Bulach O.M., Faine S., Perolat P., Vallance V. (1998). Serological titres to *Leptospira fainei* serovar

- hurstbridge in human, in Australia. *Epidemiol Infect.* Cambridge University Press, Vol. 121(2): 473-475
- Forbes A.E., Zochowski W.J., Dubrey A. W., Sivaprakasam.(2012). Leptospirosis and Weil's disease in the UK . Department of Cardiology, Hillingdon Hospital. *Revista QJ Med.* Vol. 105 (12):1151-1162.
- García-González R., Reyes-Torres A., Basilio-Hernández D., Ramírez-Pérez M., Rivas-Sánchez B. (2013). Leptospirosis: un problema de salud pública. *Rev. Latinoamer. Patol. Clin.* Vol. 60(1): 57-70
- García-Vázquez E., Herrero J.A., Hernández A., Gómez J. (2010). Leptospirosis. Servicio de Medicina Interna-Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España. *Revista Medicine* Vol. 10(57):3896-3902
- García-Virosta E., López-Gutiérrez C. (2007). Medicina y viajes II: después del viaje. Actualización en medicina de familia. Editorial Elsevier Doyma Vol.33 (3):140-8
- Gasque-Gómez R. (2008). Enciclopedia Bovina, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1ª edición. Editorial FMVZ :168-172.
- González A., Borrero R., Ruiz J., Batista N., Fernández Y., Valdés Y., González M. (2006). Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum, *Revista Argentina de Microbiología* Vol.38 (2):61-68.
- Guerrero R., Berlanga M. (2005). Movimiento procariótico: Entre la atracción y la repulsión en los balbuceos de la vida. *Rev. Actualidad SEM.* Vol. 40:8-26.

- Guevara-Rosales M., Castellanos-Martínez R., Robinson-Rodríguez R., Vázquez-Ríos L. (2002). El sistema inmune en los Estados de Salud y Enfermedad, Instituto Superior de Ciencias Médicas. Revista Electrónica MEDISAN, Vol.6 (1):60-68.
- Jiménez-Aristizabal L.M. (2006). Revisión actualizada sobre métodos de identificación y diagnóstico de *Leptospirosis* en bovinos. Trabajo de posgrado. Pontificia universidad Javeriana, facultad de Ciencias microbiológicas agrícola y veterinaria .Bogata D.C.: 17-64
- Leveett P.N. (2001). Leptospirosis. Clinica. Microbiolgy Rev., Vol. 14(2):296.
- Lineamientos del diagnóstico de leptospirosis mediante microaglutinación microscópica, InDRE-RNLSP. (2013), Secretaria de Salud, 1ª Edición S.S.
- Llop-Hernández A., Valdés-Dapena Vivianco M.M., Zuazo-Silvia J.L. (2001). Microbiología y Parasitología Medica Tomo I, Editorial Ciencias Medicas: 388- 417.
- Longo D.L., Kasper D.L., Jameson J.L., Fauci A.S., Hauser S.L., Loscalzo J.(2012).Harrison principios de Medicina Interna 18ª Edición. Editorial McGraw-Hill. Sección 9: 1392-1397.
- Machado H., Abeledo M., Feraud D.(2009). Utilización de una técnica serológica rápida para el diagnóstico de la *Leptospira* canina. Rev.de Veterinaria. Vol.10 (7): 1-9.
- Medrano Galarza C., Diaz-Rojas C.A., Dalmau-Barros E.A. (2011). Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá, Rev.Med. Vet. Vol.21:133-145.

- Ministerio de la Salud (2010). Lineamientos para la vigilancia y control de la Leptospirosis en El Salvador.
- Ministerio de Salud (2008). Norma técnica para la atención integral de la leptospirosis humana. Lima Perú.
- Monterrubio-Villar J., González-Velasco C., Cidoncha-Calderón B., Manuel Cidoncha-Gallego M. (2013). Colecistitis alitiásica como forma de presentación de una *leptospirosis* grave. Editorial Elsevier Doyma Vol.91 (4):264-276.
- Moschini J. (2011). Artículo de Leptospirosis humana con compromiso del sistema nervioso central. Comunicación de dos casos y revisión de la literatura, Buenos Aires, Argentina. Editorial Elsevier Doyma Vol.3 (4):222-228.
- Navarrete-Espinosa J., Moreno-Muñoz M., Rivas-Sánchez B., Velasco-Castrejón O. (2011). Leptospirosis Prevalence in a Population of Yucatan, Mexico. Journal of Pathogens Vol. 2011:1-5.
- Navarro-Aguirre L., Gonzales-Gonzales O.L., Sánchez-Alvares M.L., Rodríguez-García O. (2004). Comparación de técnicas para el serodiagnóstico de *Leptospiras* humana. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, Vol.23 (1):19-22.
- O'Farril-Romanillos P.M. (2012). Alergia e inmunología clínica: Inmunoglobulinas. Centro Médico Nacional Siglo XXI Hospital de Especialidades. México D.F.
- Obregón A.M., Fernández C., Rodríguez I., Rodríguez J., Zamora Y. (2007). Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de la leptospirosis humana en Cuba. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Rev Cubana MEO TROP Vol.59 (1): 63-67.

- Olmo-Montes F.J., Peñas-Espinar C., Sojo-Dorado J., Muniáin-Ezcurra M.A. (2014). *Leptospirosis*. Servicio de Medicina Interna. Hospital San Juan de Dios. Sevilla, España. Editorial Elsevier Doima Vol. 11 (51):3003-3008.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2004). *Laboratory biosafety manual* 3ª edición.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. - Río de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, (Serie de Manuales Técnicos, 12).
- Pappas M.G., Ballow R.W., Gray M.R., Takafuji E.T., Miller R.N., Hockmeyer W.T. (1985). Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM specific dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 34(2):346-354.
- Parslow T.G., Stites D.P., Terr A.I., Imboden J.B. (2002). *Inmunología Básica y Clínica* 10ª edición. Editorial el Manual Moderno.
- Pumarola-Suñé T., Jiménez-de Anta Losada M.T. (2002). *Leptospirosis*. Servicio de Microbiología. Revista. Hospital Clínico. Barcelona. Vol.8 (69):3688-3692.
- Roca B. (2006). *Leptospirosis*, Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna. Hospital General de Castellón, Universidad de Valencia. *Rev Med Univ Navarra*, Vol. 50 (2):44-47.
- Rodríguez-Martínez G., (2000). Estado actual de la Leptospirosis, *Revista MVZCórdoba* Vol. 5 (1):61-63.
- Rodríguez-Vidigal F.F., Vera-Tomé A., Muñoz-Sanz A. (2006). *Leptospirosis*. Unidad de Patología Infecciosa, Hospital Universitario Infanta Cristina. *Rev. Medicine*. Vol. 9 (55):3571-3576.

- Rodríguez-Villamizar I.E. (2011). El concepto Serovar en *Leptospira*. Revista REDVET. Vol.12 (7):1-4.
- Rosario L.A., Arencibia D.F., Batista N., Jirón W., Suárez Y.E., Infante J.F. (2012). Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* por métodos fenotípicos y moleculares de la república de Nicaragua. Rev. Electrónica Vaccimonitor. Vol. 21(3): 6-12
- Saad C., Moron L., Parra E., Higuera L., Pacheco A. (2006). Leptospirosis Humana: Hallazgo clínico e histopatológicos en un caso y revisión de la literatura. Revista Colombiana de Enfermería. Vol.1 (1): 51-63.
- Sandow K., Ramírez W. (2005) Leptospirosis. Centro de Estudios Prevención y Mitigación de Desastres Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de Granma. GranmaCuba. Vol.6 (6): 1-61.
- Sandow K., Ramírez W. (2005). Leptospirosis. Revista Electrónica Veterinaria REDVET, Vol. 5 (6):1-66.
- Solano-Chinchilla A., Boza-Cordero R., Saenz Bolaños E.(1996). Leptospirosis en Humanos, Rev Cost. de Ciencias Médicas, Vol.17 (2):41-57.
- SSA, Secretaria de Salud (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis. Dirección general de epidemiología. México D.F.
- Vanasco N.B., Schemeling M.F., Chiani Y., Lottersberger J., Tarabla H.D. (2012). Diagnostico de leptospirosis humana: Evolución de la aglutinación Macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. Revista Salud pública de México. Vol. 54 (5):532-535.
- Vega – Robledo G.B. (2008). La Respuesta inmune (Serie: inmunología para el médico general). Rev Fac Med UNAM, Vol 51 (3):128-130.

- Velasco-Castejón O., Rivas-Sanchez B., Sanchez-Spindola M., Soriano J., Rivera-Reyes H.H., Garibay-Sebles V. (2009). Leptospirosis crónica de México: diagnóstico microscópico y evidencias que respaldan su existencia e importancia. *Rev Méx Patol Clín.* Vol. 56 (3): 160-165.
- Velineni S., Asuthkar S., Umabola P., Lakshmi., Sritharan M. (2007). Serological Evaluation of Leptospirosis in Hyderabad Andhra Pradesh: A retrospective Hospital-Based Study. *Indian Journal of Medical Microbiology*, Vol. 25 (1): 24-27.
- Zambrano Villa Sergio A. (2007) *Inmunología: básica y clínica*. 1ª Edición. Editorial McGraw-Hill.
- Zuñiga-Carrasco I.R., Caro-Lozano J. (2013). Panorama epidemiológico de leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos 2002-2010. *Vol. 33 (2):71-78.*