

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
SUBDIRECCION DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO BACTERIOLOGÍA - MICOLOGÍA



**Sistemas serológicos rápidos y su impacto en
el diagnóstico de la leptospirosis
humana en Cuba**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Ana Margarita Obregón Fuentes

Ciudad de La Habana

2009

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
SUBDIRECCION DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO BACTERIOLOGÍA - MICOLOGÍA**

**Sistemas serológicos rápidos y su impacto en
el diagnóstico de la leptospirosis
humana en Cuba**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Ana Margarita Obregón Fuentes MC

Asesores: Prof. Tit., Dra. Alina Llop Hernández Dr C
Prof. Tit., Dra. Isabel Martínez Motas Dr C

Ciudad de La Habana

2009

Agradecimientos

Agradecer constituye el gesto más sencillo y modesto, que surge desde lo más íntimo del ser humano. Por ello quisiera dar mi gratitud infinita, en primer lugar a todas las personas, que de una forma u otra contribuyeron a la realización de cada una de las investigaciones incluidas en esta tesis y para ello, en especial, deseo hacer público mi agradecimiento a la Dra. Alina Llop Hernández, que a pesar de sus múltiples responsabilidades científicas, técnicas y políticas, fue la primera especialista en aceptar desde el primer momento la responsabilidad de asesorar la tesis, sin vacilaciones, ni titubeos, por eso, gracias a usted, por su tiempo, sus consejos y orientaciones oportunas.

Quiero agradecer muy particularmente también, a la Dra. Isabel Martínez Motas, en su condición de asesora de la tesis, porque además de su amistad y solidaridad, supo abrirme las puertas de su saber científico, brindándome una fructífera discusión y valiosa asesoría en todos los capítulos de la tesis. Gracias Isabel, por todo lo que me enseñaste, por tu meticulosidad y paciencia, por insertarte tan bien en un tema poco común para ti, jamás lo olvidaré.

Aprecio sincera y cordialmente el apoyo incondicional ante todos los retos presentados en todos estos años de labor continua, ofrecido por la Dra. Carmen Fernández Molina. Gracias Carmen, por tus consejos, observaciones y por mostrarme tu principal virtud, el alto grado de solidaridad en todos los momentos de la vida.

Sería muy ingrata, si no agradeciera a un científico altamente calificado, que muchos de nosotros siempre buscamos cuando deseamos aclararnos, y que siempre me ha brindado su amistad, sus consejos, sus valoraciones y sus opiniones, no solo en temas relacionados con la tesis, si no también de la vida cotidiana que compartimos como hermanos. Gracias al Dr. Rafael LLanes Caballero, por todo eso y por permitirme ser tu amiga para toda la vida.

Sea también extensivo mi agradecimiento, a un investigador prestigioso formado en nuestro laboratorio durante todo este decursar en el IPK, al Lic. Islay Rodríguez González, quién estoy segura, muy pronto discutirá también su tesis, para convertirse en un nuevo Doctor en Ciencia, gracias Islay, por tus observaciones y sugerencias.

Gracias a todas las personas del Departamento de Bacteriología Micología: al Dr. Ernesto Montoro, al Dr. Gerardo Martínez, al Dr. Carlos Fernández, al Dr. Raúl Díaz (oponente de la predefensa), a la Dra. Rosabel Falcón (secretaria del tribunal de la predefensa), a la Dra. Margarita Ramírez, a la Dra. Laura Bravo (presidenta del tribunal de la predefensa), a la Dra. Gilda Toraño, a la Dra. Dianelys Quiñones, a la Dra. Miriam F. Pérez, a la Lic. Odelayi Suárez, a la Lic. Lilian Mederos, a la Lic. Yarelys Zamora, a la Lic. Yaindrys Rodríguez, a la Lic. Nadia Rodríguez, a la Lic. Onelkis Feliciano, al Lic. Luis Jeréz, a la Lic. Victoria Vásquez y al Lic. Brian Mondeja, gracias por ayudarme a mejorar el tema presentado durante la segunda actividad realizada a este nivel. También, muchas gracias, a los técnicos protagonistas de las investigaciones, en particular al Téc. José Rodríguez, Téc. Roxana Blanco, Téc. Yanais Valdés, Téc. Oderay Gutiérrez y al Téc. Eduardo Echeverría.

Quiero además, agradecer al Dr. Rolando Ochoa por el papel desempeñado durante la oponencia en la etapa de la predefensa, muchas gracias por todas sus observaciones. También, deseo hacer un reconocimiento especial a Lázaro González, del departamento de dibujo y fotografía del IPK y a Cristina Martínez, por su ayuda en la impresión del documento.

Deseo dedicar este trabajo, a toda mi familia y en especial a quienes no están físicamente hoy conmigo, a mis abuelos maternos y a mi padre, que sé, que estén donde estén, siempre me alumbran y me dan fuerzas para continuar. Quiero darle las gracias a mi madre, persona muy especial para mi vida, a mis dos hermanas en especial a Martica, a mi sobrina Rachel y a mis cuñados Humberto y Santiago. Un agradecimiento especial a mis dos grandes pilares, mis dos razones de ser, mis hijos: Giselle y José Antonio, completamente distintos, pero tan necesarios para seguir adelante, para ustedes mis niños, muchas gracias por todo. Muchas gracias para mi esposo José Negrin, quién a pesar de su forma de ser, siempre está conmigo en los buenos y los malos momentos, gracias por enseñarme a diario que hay que ser fuerte en la vida. También, agradezco a mis suegros y a mi cuñada Gisela, a quienes le debo la tranquilidad que disfruto cuando me cuidan a mi pequeño hijo. No deseo concluir, sin antes reparar alguna injusticia cometida durante la redacción de estos agradecimientos, reiterando mis infinitas gracias, a todos los que acudieron en mi auxilio y colaboraron con buena voluntad cuando los necesité. A todos, todos, todos, infinitas gracias.

SÍNTESIS

Se incrementó el rigor científico del diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana en Cuba, al ampliar el conocimiento sobre la circulación de cepas de leptospiras y al demostrar la utilidad e importancia de los sistemas serológicos rápidos: LEPTO Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow, Lepto Tek Dri Dot y SD Leptospira IgM-IgG, los que presentaron aceptables valores de sensibilidad, especificidad y concordancia. Se utilizaron también, sistemas combinados de diagnóstico microbiológico, que identificaron la etiología de la leptospirosis humana y los principales serogrupos de leptospiras (Ballum, Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae), en los casos confirmados de brotes epidémicos ocurridos en Cuba. Además, se demostró que los serogrupos de leptospiras hallados en los casos confirmados con leptospirosis, coincidieron con los presentes en vax-SPIRAL[®], aunque la detección de Ballum, no incluido en la formulación de esta vacuna, sugirió mantener una vigilancia activa de laboratorio, con vistas a su futura inclusión. Este trabajo describió el diseño del nuevo sistema de látex autóctono, para el pesquisaje de leptospirosis humana. Este diagnosticador disponible en la Red Nacional de Laboratorios de Cuba, mostró valores aceptables de sensibilidad (93,8%), especificidad (90,4%) y concordancia (90,2%) en comparación con el método de referencia. Todos los sistemas serológicos rápidos mostraron amplia reactividad antigénica.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AcMs: anticuerpos monoclonales

AFAS: suplemento ácidos grasos de cadenas largas y albúmina bovina fracción V

AER: análisis de enzimas de restricción

AP-RCP: cebadores de secuencia arbitraria usados en la RCP

C3: fracción C3 del complemento

CD4+: antígenos de diferenciación (glucoproteínas) expresados en la superficie de los linfocitos T colaboradores (helpers)

CDC: Centros para el Control de Enfermedades Infecciosas de EEUU

CIE: contraelectroforesis

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

CPHEM: Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología

Dip-S-Ticks[®]-IgM: sistema serológico rápido (pesquisa de anticuerpos IgM contra leptospiras)

DNE: Dirección Nacional de Epidemiología

DOT-ELISA: ensayo inmunoenzimático ligado en fase sólida (papel)

ECP: electroforesis en gel de campo pulsado

EEUU: Estados Unidos de América

ELISA: ensayo Inmunoenzimático ligado a fase sólida

ELISA-IgM: ensayo Inmunoenzimático ligado a fase sólida de IgM.

EMJH: medio líquido de Ellinghausen y McCullough, modificado por Johnson y Harris

ESS: sustancia sensibilizante de eritrocitos

F4: antígeno filamentoso 4

FIOCRUZ: Fundación Internacional Oswaldo Cruz

HAT: técnica de hemoaglutinación

HATP: prueba de hemoaglutinación del *Treponema pallidum*

HLT: prueba hemolítica

ICMR: Consejo Indio de Investigaciones Médicas

IFI: prueba de inmunofluorescencia indirecta.

IgG: inmunoglobulinas G

IgM: inmunoglobulinas M

ILS: Sociedad Internacional de Leptospirosis

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

IS1500: elementos de inserción 1500

KIT: Instituto de Medicina Tropical de Holanda

LABIOFAM: Laboratorios Biológicos Farmacéuticos

LCR: líquido cefalorraquídeo

LEPTO Dipstick: sistema serológico rápido (pesquisa de anticuerpos IgM contra leptospiras)

Lepto Tek Dri Dot: sistema de aglutinación con partículas de látex (pesquisa de anticuerpos totales contra leptospiras)

Lepto Tek Lateral Flow: sistema serológico rápido (pesquisa de anticuerpos IgM contra leptospiras)

LipL32: lipoproteína 32 de leptospira

LipL36: lipoproteína 36 de leptospira

LipL41: lipoproteína 41 de leptospira

LNRL: Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras

LPS: lipopolisacáridos

LS-RCP: amplificación al azar de ADN polimórfico, o RCP de bajo rigor

MAT: prueba de microaglutinación

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

MOP: Manual de Operaciones y Procedimientos

OmL1: proteína de membrana externa 1 de leptospira

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PMEs: proteínas de membrana externa

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RFLPs: polimorfismo de restricción por tamaño de fragmento

RIA: radioinmunoensayo

RPR: prueba no treponémica de la reagina plasmática rápida

SD Leptospira: Estándares Diagnósticos - Leptospira

SD Leptospira-IgM: Estándares Diagnósticos – Leptospira-IgM

SD Leptospira-IgM-IgG: Estándares Diagnósticos – Leptospira-IgM-IgG

SSCP: análisis del polimorfismo de conformación de cadena sencilla

TFS: tampón fosfato alcalino

TM: antígeno termo moderado

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TSC: Comité de Taxonomía y Sistemática

UMELISA – HBsAg: sistema Ultra Micro Analítico de ELISA para la detección del virus de la hepatitis B

UMELISA anti – HCV: sistema Ultra Micro Analítico de ELISA para la detección del virus de la hepatitis C

VDRL: Laboratorio de Investigaciones de Enfermedades Venéreas

VIH / sida: virus de inmunodeficiencia humana / síndrome de inmunodeficiencia adquirida

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Introducción	2
1.2. Hipótesis	6
1.3. Objetivos	6
1.4. Novedad Científica	7
1.5. Valor Teórico	7
1.6. Valor Práctico	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Generalidades de la leptospirosis	10
2.1.1. Agente etiológico	10
2.1.2. Identificación y clasificación tradicional de las leptospiras	10
2.1.3. Identificación y clasificación molecular de las leptospiras	13
2.1.4. Antecedentes de la enfermedad	16
2.1.5. Epidemiología de la enfermedad	18
2.1.6. Patogénesis y Cuadro Clínico	22
2.1.7. Inmunopatología de la leptospirosis	24
2.1.8. Principales antígenos de las leptospiras	25
2.1.9. Inmunidad de la leptospirosis	26
2.2. Diagnóstico diferencial	27
2.2.1. Exámenes complementarios	27
2.3. Diagnóstico microbiológico	27
2.3.1. Demostración microscópica de las leptospiras	28
2.3.2. Demostración directa de las leptospiras	29

2.3.3.	Demostración indirecta de las leptospiras	29
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1.	Tipo de estudio	38
3.2.	Marco de la investigación	38
3.3.	Procedimientos y características generales del trabajo	39
3.3.1.	Evaluación y aplicación de sistemas serológicos rápidos, para el pesquisaje de la leptospirosis humana en Cuba	39
3.3.1.1.	Universo de trabajo y muestras	39
3.3.1.2.	Métodos	41
3.3.2.	Identificación de la infección por leptospiras en casos asociados a dos brotes epidémicos ocurridos en nuestro país	43
3.3.2.1.	Antecedentes de la investigación	43
3.3.2.2.	Universo de trabajo y muestras	44
3.3.2.3.	Métodos	45
3.3.3.	Verificación de la existencia de casos de leptospirosis humana en una provincia seleccionada para aplicar la vacuna vax-SPIRAL [®] y relacionar en éstos, los serogrupos de leptospiras circulantes	45
3.3.3.1.	Antecedentes de la investigación	46
3.3.3.2.	Universo de trabajo y muestras	46
3.3.3.3.	Métodos	46
3.3.4.	Desarrollo, evaluación y aplicación de un sistema autóctono de laboratorio, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana	47
3.3.4.1.	Antecedentes de la investigación	47
3.3.4.2.	Desarrollo y evaluación de cinco sistemas látex, como métodos de pesquisaje rápido para el diagnóstico de la leptospirosis humana	47
3.3.4.2.1.	Universo de trabajo y muestras	47
3.3.4.2.2.	Métodos	47
3.3.4.2.2.1.	Cepas utilizadas	48
3.3.4.2.2.2.	Obtención del antígeno	49
3.3.4.2.2.3.	Conjugación de cada antígeno con las partículas de látex	50
3.3.4.2.2.4.	Evaluación de la reactividad, estabilidad y reproducibilidad de los	51

	sistemas látex	
	3.3.4.2.2.5. Sistemas serológicos de referencia	51
	3.3.4.2.2.6. Análisis estadístico	52
3.3.4.3.	Aplicación del mejor sistema de látex en la pesquisa rápida de leptospirosis	52
	3.3.4.3.1. Universo de trabajo y muestras	52
	3.3.4.3.2. Método	53
	3.3.4.3.2. Sistema serológico de referencia	54
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1.	Evaluación y aplicación de sistemas serológicos rápidos, para el pesquisaje de la leptospirosis humana en Cuba	56
4.2.	Identificación de la infección por leptospirosis en casos asociados a dos brotes epidémicos ocurridos en nuestro país	64
4.3.	Verificación de la existencia de casos de leptospirosis humana en una provincia seleccionada para aplicar la vacuna vax-SPIRAL [®] y relacionar en éstos, los serogrupos de leptospirosis circulantes	73
4.4.	Desarrollo, evaluación y aplicación de un sistema autóctono de laboratorio, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana	77
	4.4.1. Desarrollo y evaluación de cinco sistemas de aglutinación con partículas de látex, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana	77
	4.4.2. Aplicación del mejor sistema de aglutinación con partículas de látex, al pesquisaje rápido de la leptospirosis humana	80
4.5.	Consideraciones generales finales	82
V.	CONCLUSIONES	90
VI.	RECOMENDACIONES	93
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

ANEXOS

1. Instructivo del estuche comercial: Dip-S-Ticks[®]-IgM, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana (PANBIO INDX, INC. 1756 Sulphur Spring Road, Baltimore, MD. 21227, USA).
2. Instructivo del estuche comercial: LEPTO Dipstick, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana (Organon Tecknika Ltd. Farnham Drive. Finglas Road. Finglas. Dublín 11. Holanda).
3. Instructivo del estuche comercial: Lepto Tek Dri Dot, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana (Organon TecknikaLtd. Farnham Drive. Finglas Road. Finglas. Dublín 11. Holanda).
4. Instructivo del estuche comercial: Lepto Tek Lateral Flow, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana (Organon Tecknika Ltd. Farnham Drive. Finglas Road. Finglas. Dublín 11. Holanda).

5. Instructivo del estuche comercial: SD Leptospira IgM-IgG, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana (BIO-LINE Standard Diagnostics, INC, 2007, [http://www. standardia.com](http://www.standardia.com)).
6. Protocolo para el cultivo de leptospiras. Hemocultivo.
7. Protocolo de la técnica de Microaglutinación (MAT), con antígenos vivos de leptospiras, utilizada para el diagnóstico de leptospirosis humana.
8. Protocolo de la Técnica de Hemoaglutinación Indirecta (HAT).
9. Protocolo de Microaglutinación (MAT), para la serotipificación de aislamientos de leptospiras, utilizando sueros policlonales.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

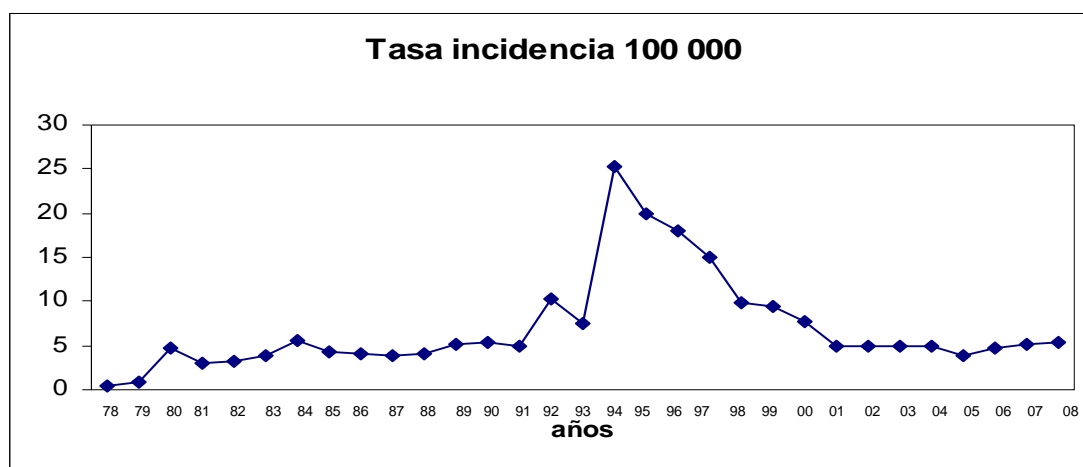
La leptospirosis humana, entidad clínica ubicada entre las enfermedades zoonóticas, se identifica como una infección sistémica, aguda y transmisible, producida por un gran número de bacterias helicoidales invasivas, incluidas en el complejo patogénico denominado *Leptospira interrogans sensu lato*. Esta entidad, que constituye una de las zoonosis más conocidas en el mundo, se clasifica como una enfermedad emergente, por el número elevado de brotes epidémicos que ocasionan las múltiples serovariedades de leptospirosis que afectan a los países tropicales y subtropicales (Nicaragua, Brasil, República Dominicana, Barbados, países de Europa, del sudeste Asiático y los Estados Unidos de Norteamérica). En los últimos 10 años la leptospirosis se asocia con el síndrome hemorrágico pulmonar que afecta a los países latinoamericanos y el continente asiático (Levett, 1999a y 1999b; Gouvela *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 2008; Vijayachari *et al.*, 2008; Abgueguen y Pichard, 2009; Svircev *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2009; Victoriano *et al.*, 2009; Agampodi *et al.*, 2009; Stark *et al.*, 2009; Paganin *et al.*, 2009).

En los humanos, la leptospirosis se presenta a cualquier edad, aunque es más frecuente entre las personas de la tercera y cuarta década de la vida. Los individuos susceptibles son aquellos que, debido a su profesión u oficio, se vinculan de forma directa o indirecta con las labores agrícolas y las prácticas deportivas (Levett, 2001; Faine, 2003; Vinetz, *et al.*, 2005; Johnston *et al.*, 2009; Mohan *et al.*, 2009).

De acuerdo con los datos ofrecidos por la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS) y la Fundación Internacional Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil notifica cifras de leptospirosis que alcanzan los 3 638 casos confirmados por año. Sin embargo, en Guatemala, Chile, El Salvador, Guyana y Nicaragua, el número es menor. Mientras que, en países como Surinam y

Panamá no está definido ese indicador. Este comportamiento demuestra que, para la región de Latinoamérica, la leptospirosis puede considerarse como un prototipo de enfermedad “olvidada o desatendida” (Hartskeerl, 2009; Cruz *et al.*, 2009).

En Cuba, desde la puesta en marcha en 1981, del Programa Nacional para la Prevención y el Control de la Leptospirosis, esta enfermedad muestra un comportamiento endemo-epidémico con un carácter cíclico y estacional (figura 1) (Cruz, 2002; Verdasquera, 2009).



Fuente: DNE, MINSAP - CUBA - 2008

Figura 1. Tasa de incidencia de la leptospirosis humana en Cuba (1978-2008)

Los factores climáticos y geográficos existentes en nuestro medio, facilitan la aparición de brotes epidémicos en determinadas épocas del año, comportamiento atribuible a las dificultades objetivas y subjetivas que conspiran contra la prevención de esta infección (Cruz, 2002; Verdasquera, 2009).

La leptospirosis como enfermedad infectocontagiosa muestra una evolución clínica variable y en la mayoría de los casos, las leptospiras invaden a los órganos con funciones vitales (Faine *et al.*, 1999; Faine, 2003; Gouvela *et al.*, 2008). En ocasiones, su reconocimiento clínico es difícil y mal diagnosticado, debido a la amplia gama de síntomas y signos inespecíficos que confunde a la leptospirosis con otras patologías agudas de pronóstico grave, fulminantes y mortales. Por su gran diversidad clínica es imprescindible hacer el diagnóstico diferencial, en particular, con otras enfermedades febriles como el dengue, la hepatitis, la influenza, las

I. Introducción

encefalitis, las gastroenteritis y las meningitis asépticas por *enterovirus*, entre otras (Singh *et al.*, 1999; Levett, 2001; Guerra, 2009).

La infección en el hombre ocurre por vía directa o indirecta. La primera sucede cuando las leptospiras penetran a través de una excoriación de la piel o de la mucosa intacta, mientras que la vía indirecta se produce después de la exposición de un individuo susceptible al ambiente contaminado con la orina de los animales infectados. Existen otras rutas de transmisión, sobre todo para los animales inferiores de sangre caliente, aunque éstas tienen una menor frecuencia para el ser humano (Levett, 2001).

El éxito del diagnóstico etiológico de la leptospirosis humana dependerá de las evidencias epidemiológicas, de los criterios clínicos, del conocimiento sobre la patogenia de la enfermedad, así como del momento de la toma de muestras clínicas y la eficacia de los métodos diagnósticos (Speelman, 2000; Levett *et al.*, 2001; Vijayachari y Sehgal, 2006).

El cultivo constituye “la prueba de oro” para el diagnóstico de la enfermedad y aunque su resultado es irrefutable, sólo ofrece una confirmación retrospectiva de la infección (Levett, 2001; Vijayachari y Sehgal, 2006). Las técnicas serológicas desempeñan un papel importante para ratificar la infección, éstas permiten demostrar en un breve período de tiempo, la presencia de inmunoglobulinas (IgM o IgG) producidas contra las leptospiras, superando en rapidez, sencillez y bajo costo al cultivo, así como a otras técnicas bacteriológicas y moleculares (Iwamoto *et al.*, 2009; Smythe *et al.*, 2009; Hesterberg *et al.*, 2009).

Gracias al avance tecnológico alcanzado en el mundo durante el siglo XX y principios del XXI, aparecen en el mercado estuches serológicos comerciales que permiten realizar una pesquisa rápida de la leptospirosis humana. En nuestro medio se conocen los sistemas inmunocromatogénicos de ventana: Dip-S-Ticks[®]-IgM (comercializado por la agencia PanBio INDX, Inc, de los Estados Unidos), LEPTO Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow y el sistema de aglutinación con partículas de látex Lepto Tek Dri Dot, diseñados por Organon Tecknika (Holanda) en colaboración con el Koninkluk Instituut voor de Tropen (KIT), de Holanda, los que detectan de forma rápida, anticuerpos IgM o IgG, principalmente en los sueros de

I. Introducción

pacientes con leptospirosis (Smits *et al.*, 2000a, 2000b, 2001a, 2001b; Smits HL. [comunicación personal 1]. Koninkluk Instituut voor de Tropen. Amsterdam, Holanda. 2005). Desde finales del año 2007, la empresa Coreana BIO LINE (SD) Standard Diagnostics, Inc. comercializa también estuches serológicos inmunocromatogénicos que se conocen como SD Leptospira, SD Leptospira-IgM y SD Leptospira IgM-IgG, utilizados para la búsqueda rápida de anticuerpos producidos contra las leptospiras o sus productos (BIO LINE, SD Standard Diagnostics, Inc: www.standardia.com).

En Cuba desde el año 1983 y según el Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis humana, la confirmación del diagnóstico etiológico de los casos sospechosos de leptospirosis en todos los centros asistenciales que integran la Red de Laboratorios de Microbiología del país se realiza casi siempre, por el sistema serológico de hemoaglutinación indirecta (HAT), una técnica que requiere del estudio de sueros pareados y el uso de un antígeno estable conocido como sustancia sensibilizante de eritrocitos (ESS), elaborado en sus inicios, por los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) y en la actualidad por el Instituto Finlay (Centro de Producción - Investigación de Vacunas). A pesar de la amplia utilización de la HAT en Cuba, se estima que alrededor del 10% de los casos presuntivos de leptospirosis no se confirman por este sistema, debido a la dificultad de obtener las muestras de sueros pareados, cuyos resultados permitirían corroborar la existencia de la infección (Dirección Nacional de Estadísticas. Ministerio de Salud Pública, Cuba; 2009). Se sabe además que, con excepción de la provincia de Holguín, región donde la leptospirosis humana se diagnostica desde hace muchos años, por la prueba de referencia internacional de microaglutinación con antígenos vivos (MAT) y se realiza también de manera sistemática el cultivo de las leptospiras, en ninguno de los restantes Centros Provinciales de Higiene Epidemiología y Microbiología (CPHEM) ejecutan otras técnicas que permitan la confirmación de los casos presuntivos. En estos centros provinciales, el diagnóstico se centraliza en el uso del sistema HAT, con sus requerimientos particulares, lo que unido a otros factores subjetivos y objetivos influye en el incremento del subregistro de la leptospirosis a nivel nacional.

Desde la década de los años 90 del siglo pasado, el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) investiga sobre el desarrollo, la aplicación y la evaluación de nuevas técnicas de laboratorio sencillas, económicas y que garanticen también la pesquisa rápida de la leptospirosis, sobre todo en los pacientes graves, así como en aquellos asociados con brotes epidémicos o eventos epidemiológicos que ocurran en Cuba. El trabajo desarrollado a través de todos estos años ha perfeccionado el sistema de vigilancia microbiológica en este país. De igual manera, el LNRL del IPK desarrolla sistemas autóctonos de diagnóstico con características similares a los descritos en otros países. La utilización de los sistemas serológicos rápidos posibilitará la sustitución de metodologías costosas y difíciles de adquirir en Cuba.

Por la problemática expuesta con anterioridad, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

1.2. Hipótesis

Los sistemas serológicos rápidos tienen gran impacto en el diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana y proporcionan suficiente información para la prevención y el control de esta enfermedad en Cuba.

Para la confirmación de esta hipótesis, se trazaron los siguientes objetivos:

1.3. Objetivos

Objetivo General

- Contribuir al diagnóstico etiológico rápido de la leptospirosis humana en Cuba.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar y aplicar los sistemas serológicos rápidos para el pesquiasaje de la leptospirosis humana en Cuba.

- 2) Identificar la infección por leptospiras en los casos clínicos asociados con dos brotes epidémicos ocurridos en Cuba.
- 3) Verificar la existencia de casos de leptospirosis humana en una provincia seleccionada para aplicar la vacuna vax-SPIRAL[®] y relacionar estos casos, con los serogrupos de leptospiras circulantes.
- 4) Desarrollar, evaluar y aplicar un sistema autóctono de laboratorio, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana.

1.4. Novedad Científica

En esta investigación se agrupó, por primera vez en Cuba, la información científica disponible sobre el uso de nuevas técnicas serológicas, rápidas y comercializadas, dirigidas al pesquisaje de la leptospirosis humana. Además, se presenta por primera vez también, un resultado científico autóctono relacionado con la formulación de un diagnosticador para la pesquisa rápida de la leptospirosis humana. Así mismo, se describen los serogrupos de leptospiras circulantes en Cuba durante un período de 10 años, lo que contribuyó a la ampliación de los conocimientos acumulados sobre el agente etiológico de la leptospirosis humana, en la Región de las Américas.

1.5. Valor teórico

El presente documento incluye la información teórica relacionada con el método desarrollado para la formulación de un sistema de aglutinación con partículas látex autóctono, para la pesquisa rápida de la leptospirosis humana. Además, se muestra la información científica relacionada con la metodología seguida para la evaluación integral de las nuevas técnicas serológicas, rápidas y comercializadas, dirigidas al pesquisaje de la leptospirosis humana en nuestro medio. En el trabajo se describen también los procedimientos utilizados para identificar los serogrupos de leptospiras circulantes en Cuba durante un período de 10 años, así como los procedimientos establecidos para realizar un diagnóstico preciso de leptospirosis humana en los casos estudiados.

1.6. Valor práctico

Los resultados incluidos en este trabajo, perfeccionan la calidad del diagnóstico y la vigilancia microbiológica de la leptospirosis en Cuba. Con la introducción y aplicación de las técnicas serológicas rápidas, para el pesquisaje de la leptospirosis, se realiza de forma más precisa la toma de decisiones efectivas desde el punto de vista clínico y terapéutico, en los pacientes graves o en los casos asociados con situaciones epidémicas en Cuba. La información ofrecida dio a conocer la distribución de los serogrupos de leptospiras en Cuba durante 10 años, una información valiosa desde el punto de vista epidemiológico y de gran interés para la formulación de nuevos preparados vacunales contra la leptospirosis. Por otra parte, todo el país dispone del primer sistema de aglutinación con partículas de látex, útil para la pesquisa rápida de la leptospirosis y que fue diseñado por investigadores del IPK. Así mismo, el abordaje multifactorial realizado en los brotes epidémicos descritos mediante el empleo de las técnicas microbiológicas, permite, en un futuro cercano, la adopción de nuevas estrategias dirigidas a una mejor prevención y control de la leptospirosis humana en Cuba. Los resultados que integran parte del contenido de esta tesis recibieron los siguientes reconocimientos: Resultados relevantes aprobados por el Consejo Científico del IPK (1997, 1998, 1999, 2001, 2003, 2006, 2007 y 2008). Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (2003); Ponencia Relevante en el Forum de Ciencia y Técnica del IPK (2001, 2006 y 2008); Premio Relevante en el Forum Municipal de Ciencia y Técnica (2006), así como Ponencia Relevante en el Forum Provincial de Ciencia y Técnica (2006 y 2008); Premio en el Evento Provincial de las BTJ-CENEDI (2002), Premio al Mejor Trabajo Científico en el Simposio sobre Leptospiras del Congreso Internacional de la ALAM (2002). Además, parte de los resultados obtenidos en esta tesis, están publicados en 19 artículos (divulgados desde 2002 al 2009), así como en tres folletos editados en Cuba. Dentro de ellos, siete aparecen como artículos originales en revistas nacionales y 11 en revistas internacionales. Otro trabajo se presentó como editorial en la Revista Cubana de Medicina Tropical (2006) y constituyeron tema de seis tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología (2002 y 2004) y dos formaron parte de Proyectos de Grado para optar por el Título de Técnico de la Salud (2006). Los resultados de esta tesis se presentaron también en 21 eventos científicos (cuatro nacionales y 17 internacionales).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades de la leptospirosis

2.1.1. Agente etiológico

El agente etiológico de la leptospirosis es una bacteria conocida como leptospira, espiroqueta helicoidal y móvil, que vista microscópicamente por iluminación en campo oscuro en medios líquidos, presenta un diámetro de alrededor de 0,1 μm , con una longitud de 6 a 8 μm y muchas espiras separadas entre sí a distancias desde 0,1 μm y hasta 0,15 μm . Estos microorganismos producen movimientos desordenados, variables y la mayoría tienen la capacidad de formar en uno o sus dos extremos, ganchos típicos, lo que les da la forma de “S” (Trueba *et al.*, 1992; Haake, 2000; Haake *et al.*, 2000; Levett, 2001; Ginebra, 2001).

Taxonómicamente, las leptospiras se ubican, dentro del Phylum BXVII en Spirochaetes phy. nov., perteneciente a la Clase I de Spirochaetes, al Orden I de Spirochaetales, la Familia III de Leptospiraceae y el Género II de *Leptospira* (Garrity *et al.*, 2001).

2.1.2. Identificación y clasificación tradicional de las leptospiras

Antes de 1989, el género *Leptospira* incluía dos especies tipos: *Leptospira interrogans*, que comprendía todas las cepas patógenas para el hombre y los animales, aisladas no sólo de las muestras clínicas procedentes de estos mamíferos, sino también del medio ambiente contaminado con la orina de los reservorios de mantenimiento y los portadores. Mientras que, la otra especie tipo, *Leptospira biflexa*, abarcaba las cepas saprofitas o de vida libre y aisladas del medio ambiente (Levett, 2001; Abgueuen y Pichard, 2009). Las especies

II. Revisión Bibliográfica

Leptospira biflexa y *Leptospira interrogans*, se diferencian entre sí, porque la primera crece a la temperatura de 13°C, en presencia de la 8 azoguanina (225 mg/mL) y la segunda se inhibe bajo estas condiciones (Levett, 2001). A pesar de la complejidad de su estructura antigénica, las leptospiras se clasifican en serogrupos y serovariedades mediante la reacción antígeno y anticuerpo obtenida por la técnica de MAT. El serovar de leptospira constituye la unidad sistemática básica y está representado por una cepa de referencia. Mientras que, los serogrupos están integrados por aquellos serovares que muestran reacciones de aglutinación cruzada y cuyos títulos oscilan desde moderados a altos, aunque, en ocasiones no pueden definirse con precisión y no tienen un estatus taxonómico oficial. Sin embargo, cumplen con el propósito práctico de agruparse sobre la base de su semejanza antigénica. La seroagrupación es necesaria debido a la existencia de más de 200 cepas de referencias de leptospiras, las que por razones prácticas, no pueden utilizarse de manera individual durante la serotipificación. Por no existir una definición exacta de serogrupo y ser sus diferencias muchas veces imprecisas, algunos serovares se desplazan de un serogrupo a otro. La definición original de serovar formulada por Wolf y Broom en 1954, ratificada más tarde por un grupo de expertos de la OMS en el año 1967, se hizo con propósitos taxonómicos y para diferenciar de forma práctica a las leptospiras, sobre la base de la relación huésped y parásito. Bajo la definición actual, se considera que, dos cepas pertenecen a diferentes serovares, si después de una absorción cruzada con cantidades adecuadas de un antígeno heterólogo, más del 10% del título homólogo se mantiene puntualmente, en al menos uno de los dos sueros policlonales de referencia, en experimentos repetidos. En correspondencia con la definición anterior, se estima como un nuevo serovar a aquel que es diferente a todos los serovares conocidos (representados con cepas de referencia). Si no existe un título homólogo persistente (<10%), la cepa desconocida pertenece al serovar en cuestión. Así, una cepa desconocida puede pertenecer a un serovar conocido representado por una cepa de referencia, o ser un nuevo serovar y convertirse de hecho en la cepa de referencia para este nuevo serovar. El criterio del “10% como límite” es crítico, ya que permite sólo un margen de diferencia desde el 0% y hasta el 10% para las cepas pertenecientes al mismo serovar (Levett, 2001; Faine *et al.*, 2003).

II. Revisión Bibliográfica

Existen dos métodos tradicionales para determinar el estatus de serogrupo, el primero utiliza una suspensión de antígeno de una cepa desconocida, la que se enfrenta a un panel de sueros policlonales elaborados a partir de las cepas de referencias. Este procedimiento investiga, además, la relación existente entre la cepa desconocida y otras cepas de referencia del mismo serogrupo. Un serovar desconocido puede aglutinar con uno o más sueros policlonales de referencia. El segundo procedimiento es más complicado e involucra la comparación de las reacciones de aglutinación absorción cruzada que se observan en la MAT entre la cepa desconocida y su suero homólogo, con respecto a las cepas de referencia y sus sueros homólogos, que fueron positivas en las pruebas para la determinación del serogrupo. La prueba de aglutinación - absorción cruzada (CAAT) es laboriosa y consume mucho tiempo, lo que restringe su uso para los laboratorios súper especializados (Levett, 2001; Faine *et al.*, 2003). Por esta razón, los laboratorios de referencia se esfuerzan en investigar nuevos métodos para serotipificar las cepas de leptospiras, entre los mismos se citan: el factor del suero que involucra el estudio más detallado de la estructura antigénica de cada serovar, caracterizado por su propia combinación particular (o mosaico) de factores antigénicos mayores y menores. Los factores del suero se preparan por la absorción de un suero policlonal, con una o más suspensiones de antígenos diferentes que reaccionan sólo con un serovar o serogrupo. El análisis del factor del suero es un método refinado para el estudio de los grados de semejanza antigénica entre las cepas y permite la determinación rápida y provisional de pertenencia al serovar de la cepa en cuestión. Sin embargo, la preparación del factor del suero es laboriosa y su reproducibilidad es limitada entre los lotes, no obstante, se considera un método útil para la tipificación presuntiva y rápida de las cepas de leptospiras (Levett, 2001; Faine *et al.*, 2003).

Desde los años 1990, se describe el uso de anticuerpos monoclonales (AcMs) para la serotipificación de las cepas de leptospiras. La caracterización con AcMs se relaciona con la tipificación tradicional y se basa en el reconocimiento de los patrones antigénicos característicos de los serovares, por los paneles de monoclonales. A diferencia de la prueba de CAAT, los paneles de AcMs posibilitan la tipificación de leptospiras en un breve período de tiempo; además de que reconocen una sola característica antigénica (epítope).

Un epítoto puede ser específico para un determinado serovar o compartirse por varios serovares. Sobre la base de las combinaciones o mosaicos de epítotos característicos de ciertos serovares, se confeccionan paneles de AcMs que identifican a las leptospiras hasta el nivel de serovar y en ocasiones, reconoce al subserovar. La obtención de diferentes perfiles de aglutinación, con el uso de estos AcMs puede indicar la presencia de un nuevo serovar, aunque es posible observar diferencias entre las cepas pertenecientes a un mismo serovar. La disponibilidad y uso de los paneles de AcMs contra las cepas de leptospiras presentes en determinadas regiones, permite a los laboratorios no especializados tipificar de forma fácil y rápida a las cepas circulantes. Alrededor de la mitad de los serovares más comunes y reconocidos en la actualidad, pueden tipificarse con sueros monoclonales. Su utilización permite hacer también una revisión rápida de la identidad de las cepas de leptospiras (antígenos) que se emplean en la MAT para el serodiagnóstico. Además, en contraposición con el método tradicional que utiliza un suero policlonal, los paneles de AcMs posibilitan que cepas de leptospiras con una identificación errónea puedan ser de nuevo tipificadas e identificadas con una mayor facilidad y precisión. La composición de los paneles es parcialmente subjetiva, muchos AcMs se preparan durante procedimientos estándares, pero sólo unos pocos se seleccionan para el uso práctico, lo que constituye una limitación en su aplicabilidad. La especificidad de los monoclonales es limitada, entre otros factores, por la estructura antigénica de la cepa inmunizante y el repertorio inmunológico del ratón (Levett, 2001; Cerqueira y Picardeau, 2009; Maneewatch *et al.*, 2009). Hasta el presente se describen cerca de 67 serovariedades y 38 serogrupos para *L. biflexa* y 25 serogrupos y más de 250 serovariedades para *L. interrogans* (Levett, 2001; Hartskeerl *et al.*, 2008; Hartskeerl, 2009).

2.1.3. Identificación y clasificación molecular de las leptospiras

Desde el punto de vista taxonómico, la clasificación de las leptospiras sustentada en su comportamiento genotípico es correcta y proporciona bases importantes para las futuras definiciones (Ramadass *et al.*, 1992; Renesto *et al.*, 2000; Bulach *et al.*, 2000; Merien *et al.*, 2000; Haake y Matsunaga, 2002; Sehgal *et al.*, 2002b; Haake *et al.*, 2004; Merien *et al.*, 2005; Levett, 2006; Murray *et al.*, 2009). Tomando en consideración los aportes científicos de éstos estudios, las especies se determinaron basadas en la homología del

II. Revisión Bibliográfica

ácido desoxirribonucleico (ADN) y entonces, se describe al género *Leptospira* compuesto por un grupo de cepas patógenas, comprendidas dentro del complejo *L. interrogans sensu lato* y por otro grupo de no patógenas, las que se encuentran dentro del complejo de *L. biflexa sensu lato*. Las especies patógenas que se reconocen hasta estos momentos incluyen a *L. interrogans sensu stricto* y las no patógenas a *L. biflexa sensu stricto*. Existen en la actualidad, diversos métodos genéticos para la serotipificación de las leptospiras. Las secuencias de ADN de los genes de las leptospiras son un blanco atractivo para los estudios filogenéticos. La secuencia del gen *rrs*, que codifica para la región 16S del ARNr, es la más aceptada en los estudios de relaciones genéticas. Un sistema de clasificación basado en los rasgos genéticos debe permitir la caracterización de las subespecies (Hookey, 1992; Johansson, 1996; Faine *et al.*, 2003; McBride *et al.*, 2009).

La clasificación genética de las leptospiras, difiere de la serológica. Los métodos de tipificación de cepas deben ser simples y brindar resultados confiables, si pretenden satisfacer las necesidades de la práctica clínica y epidemiológica. El uso de la hibridación cuantitativa de ADN-ADN, para medir las relaciones entre el ADN de las cepas de leptospiras, es el método más utilizado para la clasificación de las especies. En estos momentos, alrededor de 300 cepas se clasifican sobre las bases de la homología del ADN. En esta aproximación se incluyen también otras técnicas como: el análisis de enzimas de restricción (AER), la electroforesis en gel de campo pulsado (ECP) y las enzimas de restricción usadas para cortar el ADN de las leptospiras en fragmentos (llamado polimorfismo de restricción por tamaño de fragmento o RFLPs). Los fragmentos obtenidos se separan, por electroforesis en gel de agarosa, formándose patrones con bandas características, lo que permite establecer relaciones entre las cepas de leptospiras, cuando se comparan sus patrones, con los de las cepas conocidas o de referencia. La técnica de RFLPs muestra un alto grado de resolución y los resultados que ofrece superan muchas veces los obtenidos por los métodos serológicos, revelando también pequeñas diferencias entre algunas cepas de leptospiras. En la ECP se utilizan las enzimas de restricción como *NotI*, para diferenciar cepas de *Leptospira* spp. Estas enzimas cortan el ADN en fragmentos largos, los que, luego de separarse por electroforesis en un gel de agarosa, muestran patrones característicos. Este método ofrece la ventaja de poder realizar la interpretación de

II. Revisión Bibliográfica

los resultados de forma simple, ya que se observan grandes bandas y en pocas cantidades. El RFLP puede combinarse con el procedimiento de “southern blott”, método en el cual se usan sondas específicas. Por ejemplo, en la ribotipificación, los fragmentos obtenidos por los cortes de las enzimas de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa, luego se transfieren a una membrana y al final se hibridizan con sondas de 16S o 23S marcadas. El resultado que se obtiene es un “fingerprint” más simple y fácil de interpretar. Los reactivos que se utilizan en este método están disponibles y no se requiere de todas las cepas de referencia y los correspondientes sueros inmunes. La ribotipificación también provee información sobre las relaciones genómicas, basadas en la similitud de fragmentos comunes encontrados en las cepas de leptospiras (Ribeiro *et al.*, 2009; Slack *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009).

Basados en los resultados de la mayoría de éstos estudios también se establecieron algunas “genomaespecies” de leptospiras (cepas relacionadas fenotípicamente y por la homología de su ADN), las que en estos momentos, el Comité de Taxonomía y Sistemática (TSC) propone como nuevas especies (Levett PN. [comunicación personal 2]. Saskatchewan Disease Control Laboratory. Saskatchewan. Canadá. 2009).

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP), también proporciona una base novedosa para la tipificación de las leptospiras. Esta técnica en dependencia, de su objetivo de estudio, utiliza los siguientes métodos: uso de cebadores con las secuencias complementarias de las especies o de las cepas de leptospiras; la determinación de secuencias de los productos amplificados por la RCP, la aplicación de técnicas de RFLP a los productos obtenidos por la RCP, el uso de cebadores sobre secuencias que tienen posiciones características en el genoma de una determinada cepa, por ejemplo están los elementos de inserción (IS1500), hecho que genera patrones característicos de la cepa en un gel de agarosa, el análisis del polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), el uso de los cebadores de secuencia arbitraria por la RCP (AP-RCP), la amplificación al azar de ADN polimórfico y la RCP de bajo rigor (LS-RCP). Todos estos métodos tienen la ventaja de que, al menos en teoría, son aplicables a las muestras clínicas sin necesidad del aislamiento o el cultivo de las leptospiras. No obstante, el RFLP requiere del aislamiento de

este microorganismo. Una desventaja adicional es que los perfiles generados dependen de la calidad del ADN aislado. Por tanto, éstas técnicas son difíciles de estandarizar. A finales del pasado y principios del presente siglo, surge la variante cuantitativa de la RCP en tiempo real, para la clasificación de cepas de leptospiras a nivel de laboratorio (Woo *et al.*, 1998a, 1998b y 1999; Barochi *et al.*, 2001; Levett *et al.*, 2005; Slack *et al.*, 2006; Slack *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009; Stoddard *et al.*, 2009; Lourdault *et al.*, 2009; Cerqueira y Picardeau, 2009; Lilenbaum *et al.*, 2009; Djadid *et al.*, 2009).

2.1.4. Antecedentes de la enfermedad

Con una percepción retrospectiva, los casos de ictericia producida por leptospira se describen antes de la notificación teórica realizada por Adolfo Weil (Faine, 1999; Faine *et al.*, 2003). Algunos trabajos señalan que la especie *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, surge en Europa occidental en el siglo XVIII, lo que demuestra su extensión hacia el oeste de Eurasia, asociada a uno de los principales reservorios correspondientes al género *Rattus norvegicus* (Levett, 2001; Krojgaard *et al.*, 2009; Houwers *et al.*, 2009).

Sin embargo, la leptospirosis no se reconoce hasta el siglo XIX, manteniéndose históricamente relacionada con las guerras y los desequilibrios ecológicos. Se notifica por primera vez en el año 1886 en Heidelberg, Alemania, por el médico Adolfo Weil, investigador que describe un síndrome icterico hemorrágico acompañado de insuficiencia hepatorenal (enfermedad de Weil), en un paciente con el diagnóstico presuntivo de “fiebre amarilla” (Abgueuen y Pichard, 2009).

La leptospirosis recibe muchas denominaciones, entre ellas: enfermedad de Weil, leptospirosis icterohemorrágica, ictericia espiroquética hemorrágica, fiebre del cieno, enfermedad de los cortadores de caña, fiebre de los cañaverales, enfermedad de los arroceros, fiebre de los arrozales, fiebre canícola, fiebre otoñal, fiebre del día siete, fiebre del pantano, fiebre del barro, fiebre del bastón-cortador y enfermedad de los porqueros (Chin, 2001). Esta enfermedad muestra una evolución aguda y generalizada. Se caracteriza, por presentar en la mayoría de los casos un espectro clínico polimórfico, con

II. Revisión Bibliográfica

manifestaciones que oscilan desde una presentación leve anictérica hasta una forma muy grave, conocida como “síndrome de Weil”, una variante clínica que presenta, con frecuencia una evolución fulminante y mortal (Speelman, 2000).

La primera observación de las leptospiras se realiza en cortes histológicos de riñón obtenidos de un paciente fallecido con la sospecha clínica de “fiebre amarilla”, este descubrimiento científico se le atribuye a Stimson (1907), de Nueva Orleans, quien en ese momento la denomina como *Espiroquetas interrogans*, por su parecido morfológico con el signo de interrogación (Faine, 1999). Unos años después (1915), se señala en Japón, el aislamiento de este microorganismo en los humanos, revelándose determinadas asociaciones entre las espiroquetas y los anticuerpos específicos presentes en la sangre de mineros japoneses con ictericia infecciosa. Al mismo tiempo, un equipo de médicos de Alemania (Uhlenhuth, Fromme, Hubener y Reiter), investigan a soldados alemanes atrincherados al nordeste de Francia, los que presentaban un cuadro clínico compatible con la enfermedad de Weil. La investigación permite demostrar la presencia de espiroquetas en las muestras de sangre obtenidas a esos soldados (Levett, 2001). No obstante, es en 1918 que Noguchi, propone nombrar al género como *Leptospira* (Levett, 2001).

Los estudios realizados en 1917 dan a conocer el papel que tienen la rata de desagüe *Rattus norvegicus*, conocida como rata parda, noruega o de alcantarilla, el ratón común (*Mus musculus*) y la llamada rata negra o común (*Rattus rattus*), como los principales reservorios de la infección en los humanos. En estos mamíferos la infección cursa de forma asintomática y la eliminación de las leptospiras por la orina es prolongada (Vijayachari *et al.*, 2004).

En los animales domésticos se producen infecciones inaparentes, así como diversos cuadros clínicos que se difunden sin distinción entre los rebaños. La propagación de las leptospiras en estos rebaños ocasiona pérdidas económicas considerables, sobre todo en el ganado bovino, porcino, ovino y equino (Faine *et al.*, 1999; Bolin, 2000; Acha y Seyfres, 2001).

2.1.5. Epidemiología de la leptospirosis

En la actualidad, la leptospirosis es la zoonosis de mayor difusión mundial. Está bien documentado que afecta a más de 160 especies de animales salvajes y domésticos, grupos que constituyen el reservorio principal y la fuente de infección para el hombre (Adler *et al.*, 2002). Esta enfermedad se transmite por dos mecanismos fundamentales, directos e indirectos. La transmisión directa se realiza a través del contacto con la orina o los tejidos de los animales infectados, vía que casi siempre origina los casos aislados o esporádicos. Mientras que, el mecanismo indirecto se lleva a cabo a través de los alimentos contaminados por leptospiras, así como por el contacto con el agua estancada o la tierra, representado ésta la fuente principal de infección en los brotes de leptospirosis (Acha y Seyfres, 2001; Ganoza *et al.*, 2006; Spichler *et al.*, 2008; Hartskeerl, 2009).

La transmisión interhumana es rara y aunque puede producirse, para muchos investigadores, carece de importancia práctica. Se conoce que la eliminación de leptospiras por la orina humana es un mecanismo que puede prolongarse unos pocos meses después de la recuperación o la convalecencia del paciente (Roura, 1990). También se describe la transmisión por contacto sexual durante la etapa de la convalecencia (Acha y Seyfres, 2001). La infección transplacentaria es común en los animales y cuando ocurre puede ocasionar el aborto, un parto prematuro o el nacimiento de animales debilitados con graves problemas de salud. Las aves migratorias, sobre todo los ofidios, los murciélagos y los artrópodos hematófagos, contribuyen de manera eventual con la transmisión de la leptospirosis (Acha y Seyfres, 2001). En condiciones naturales, las leptospiras permanecen viables por algunas horas en la leche materna de los animales lactantes en fase septicémica (Ellis, 1991).

La incidencia de la leptospirosis, es mayor en los países tropicales y subtropicales pobres, regiones donde el clima y las malas condiciones higiénico - sanitarias favorecen la supervivencia de este patógeno, en contraposición con lo que sucede en los países fríos o templados (Svircev *et al.*, 2009). Esta enfermedad, muestra un comportamiento estacional, con un ascenso en el verano y el otoño, principalmente durante la estación de lluvia, etapa donde la unión con las temperaturas elevadas, aumenta la supervivencia de las leptospiras

II. Revisión Bibliográfica

en el medio ambiente. Mientras que, la desecación erradica su diseminación de las aguas y los suelos (Acha y Seyfres, 2001; Topic *et al.*, 2009; McCurry, 2009).

La leptospirosis no es una enfermedad ocupacional estricta, pero se asocia con determinadas profesiones tales como los veterinarios, los ganaderos, los pastores de rebaños, los trabajadores del campo (en especial los segadores de arroz), los mineros, los obreros de la construcción, los empleados del alcantarillado, así como los individuos que practican algunos deportes acuáticos como la pesca, la caza submarina, las excursiones y la espeleología. En la actualidad, la epidemiología de la leptospirosis, está siendo variada por modificaciones directas del ecosistema urbano producidas por los desastres naturales, así como por otros fenómenos sociales y naturales (Faine *et al.*, 1999; Pavli y Maltezou, 2008; Mohan *et al.*, 2009; Monahan *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2009).

La puerta de entrada de esta infección suele ser la ruptura de la piel o la mucosa intacta, incluyéndose también la vía conjuntival. Mientras que, la inhalación del agua en forma de aerosoles puede producir una infección del tracto respiratorio. Sin embargo, se considera infrecuente la infección a partir de la mordedura de los animales domésticos o salvajes, aunque existen algunos casos notificados (Sehgal, 2000; Sehgal *et al.*, 2000 y 2002a).

Los hospederos o portadores de leptospiras se dividen en permanentes o accidentales. La leptospirosis se mantiene en la naturaleza, por la eliminación de las espiroquetas a través de los hospederos permanentes, donde la vía usual de transmisión se produce por el contacto directo. La infección de estos hospederos se adquiere a una edad temprana; mientras que, la eliminación de las leptospiras por la orina se incrementa con el envejecimiento (Oliveira *et al.*, 2009).

Las leptospiras establecen una relación simbiótica con los hospederos y en muchas ocasiones persisten años en los túbulos renales sin perder su viabilidad. No obstante, pueden ocurrir variaciones entre los hospederos permanentes y los serovares que portan (Kokudo *et al.*, 2009). El conocimiento de la prevalencia de los serovares de leptospiras en sus hospederos permanentes es esencial para enriquecer los fundamentos de la

II. Revisión Bibliográfica

epidemiología de la leptospirosis en el mundo. La susceptibilidad humana es general, pero la inmunidad es selectiva para la serovariedad que produce la infección (Levett, 2001; Chin, 2001; Góngora *et al.*, 2008; Alton *et al.*, 2009; Koizumi *et al.*, 2009b; Whitney *et al.*, 2009; Baverud *et al.*, 2009).

En algunos países se utiliza la doxiciclina para prevenir la leptospirosis durante los períodos de exposición elevada, aunque este criterio no se aplica con mucha frecuencia (Cruz, 2002, Guidugli *et al.*, 2009; Niwattayakul *et al.*, 2009). La aplicación de la terapia de soporte, es esencial en los casos graves y se aplica para el manejo de la deshidratación, la hipotensión, las hemorragias, el fallo renal y los trastornos respiratorios (Braunwald *et al.*, 2001).

Después del triunfo de la Revolución de Cuba el 1 de enero de 1959, la leptospirosis presenta un comportamiento endemo - epidémico con un carácter cíclico estacional. Históricamente, la mayor morbilidad se registra entre los meses de agosto a diciembre, confrontándose aún dificultades en la prevención y el control, asociadas con la alta infestación de roedores, la presencia de perros y cerdos en las ciudades, así como el deficiente tratamiento de los residuales pecuarios y las limitadas disponibilidades de los medios de protección, factores que se incrementan como una consecuencia del férreo y hostil bloqueo económico impuesto a nuestro país desde 1962, por el gobierno de los Estados Unidos. Por estas razones, se ejecutan nuevas estrategias nacionales que ayudarán al perfeccionamiento de la vigilancia y el control de esta enfermedad en todo el país (Cruz, 2002; Verdasquera, 2009).

Está bien documentado que los individuos del sexo masculino y las poblaciones con edades comprendidas entre los 15 a 54 años, constituyen los grupos más afectados; se conoce también que la principal fuente de infección se asocia con las actividades agrícolas realizadas en los terrenos húmedos e infestados por roedores (Cruz, 2002; Verdasquera, 2009).

II. Revisión Bibliográfica

En el año 1972, se recibe en Cuba, la primera asesoría de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Oficina Panamericana de la Salud (OPS). Este asesoramiento se hace con el objetivo de establecer las técnicas de laboratorio confirmatorias para la leptospirosis y cuatro años después (1978), se crean las condiciones para facilitar el diagnóstico serológico en todas las provincias del país. Entre los años 1970 - 1980 surgen algunos brotes epidémicos nacionales, el más significativo ocurre en la antigua provincia de Camagüey. En el quinquenio 1980-1985 los brotes que se presentan estuvieron relacionados principalmente, con el trabajo agrícola en los terrenos bajos infestados por roedores, así como en los ríos, las presas, los canales y los embalses de aguas contaminadas con residuales pecuarios. En ese período se produce un incremento paulatino del número de casos, situación en correspondencia con la extensión del diagnóstico serológico confirmatorio por todo el país. En 1981 editan en Cuba, el Programa de Prevención y Control de la Leptospirosis y en 1983 se inicia la inmunización antileptospirósica, con la vacuna rusa compuesta por los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa y Hebdomadis, en los grupos de riesgo (Cruz *et al.*, 1986). Durante el período 1988 - 1990 se notifican a nivel nacional, un promedio de 778 casos anuales con 33 fallecidos y a partir de 1991, la mayoría de las provincias de Cuba elevan sus tasas de morbilidad, debido al incremento paulatino del deterioro de las condiciones higiénico -sanitarias y a la no inmunización con la vacuna rusa, aplicada hasta 1987. Al concluir el año 1994, se registra una tasa de incidencia nacional de 25,6/100 000 hab, cifra que constituye el más alto record histórico epidémico después del período revolucionario. La situación epidemiológica existente conduce al establecimiento de un plan de acción nacional emergente, el que adopta medidas que permitirían, a partir de ese momento, una reducción sostenida de la morbilidad (Cruz, 2002). Una de estas medidas se lleva cabo por el Instituto Finlay (Centro de Producción - Investigación de Vacunas), una institución que inicia las investigaciones para la elaboración y obtención de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana, la que a partir de su registro, se aplica de forma exitosa en todo el territorio nacional (González *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000 y 2001). En 1995, se registran 2 169 casos (tasa de 19,5/100 000 hab) con 60 fallecidos. A partir de 1996, las cifras descienden de forma significativa, notificándose en 1997, 1 085 enfermos (tasa de morbilidad de 9,8/100 000 hab) y 52 fallecidos. Desde 1998 se mantiene una estricta vigilancia de la

II. Revisión Bibliográfica

leptospirosis humana, reportándose un total de 980 (8,8/100 000 hab) y 25 fallecidos. Al inicio del año 1999, los huracanes “George” y “Mitch” provocan importantes precipitaciones e inundaciones en algunos países del Caribe y Centroamérica, lo que favorece la ocurrencia de brotes epidémicos en las provincias de Pinar del Río, Las Tunas y Ciudad de La Habana, regiones donde la causa fundamental se relaciona con el contacto de roedores y con la no utilización de los medios de protección (Cruz, 2002; Santín, 2002; Verdasquera, 2009). Entre los años 2000 y 2003, los casos confirmados oscilan cerca de los 500 por año y las tasas fueron las siguientes: en el 2000 = 5/100 000 hab; 2001 = 4,8/100 000 hab; 2002 = 4,9/100 000 hab y 2003 = 5/100 000 hab. Particularmente en los primeros meses de 2002, se origina en Ciudad de La Habana un incremento significativo del número de casos sospechosos de leptospirosis, lo que provoca la emergencia de un brote epidémico (Santín, 2002). En 2004 se notifica una franca reducción de la tasa de morbilidad (2,7/100 000 hab) y de nuevo, en los años 2005 y 2006, se incrementan las tasas de incidencia (6 y 7,4/100 000 hab), respectivamente. En especial, en 2005 y gracias al uso del sistema de alerta acción aplicado en las provincias de Guantánamo y Santiago de Cuba, se detecta el incremento progresivo de casos con una sospecha clínica de leptospirosis, situación que coincide con el ascenso significativo de las lluvias y las inundaciones ocasionadas por el huracán “Wilma”, condiciones que provoca la emergencia de nuevos brotes epidémicos. En 2007, se confirman 834 casos (7,4/100 000 hab), en 2008, 484 pacientes (4,3/100 000 hab) y en 2009, se identifican 190 enfermos confirmados (1,7/100 000 hab). Toda esta información se extrae de las estadísticas disponibles en la Dirección Nacional de Estadística (DNE) del MINSAP. En Cuba, la leptospirosis humana no figura entre las principales causas de muerte; sin embargo, todos los años se informa la ocurrencia de casos y fallecidos por esta enfermedad según la DNE del MINSAP (Verdasquera, 2009).

2.1.6. Patogénesis y cuadro clínico de la leptospirosis

A pesar del gran desarrollo científico y técnico alcanzado en el mundo, no están bien definidos los mecanismos patogénicos por los cuales las leptospiras producen enfermedad (Lee *et al.*, 2000; Levett, 2001; Gunawardhana y Sellahewa, 2008).

II. Revisión Bibliográfica

El papel que desempeñan las diferentes toxinas de este microorganismo en la patogenia de la leptospirosis se describe desde el año 1964 (Xue *et al.*, 2009) y entre ellas se destacan, como posibles factores de virulencia, las siguientes enzimas: colagenasa, hialuronidasa, esfingomielinasa y fosfolipasa (Lee *et al.*, 2000; Levett, 2001). El serovar Pomona, produce enfermedad hemolítica del ganado bovino, mientras que el serovar Ballum afecta a los hámsteres. Las hemolisinas de los serovares Ballum, Hardjo, Pomona y Tarassovi son las esfingomielinasas (Lo, *et al.*, 2009). Algunas cepas virulentas exhiben quimiotaxis a través de la hemoglobina (Yuri *et al.*, 1993). El plasma se ha empleado en la prevención de la hemólisis. La actividad de la fosfolipasa C, se señala en el serovar Canicola (Carrizo *et al.*, 2009). Mientras que, la hemolisina presente en el serovar Lai, no se asocia con la actividad de las esfingomielinasa o fosfolipasas, aunque puede ser una proteína formadora de poros (Lee *et al.*, 2000) y las endotoxinas de los lipopolisacáridos (LPS), muestran baja potencia biológica (Masuzawa *et al.*, 1990; De Souza y Kourí, 1992).

Las leptospiras son microorganismos invasivos y se adhieren al epitelio celular. Estas bacterias, penetran al organismo gracias a su típica movilidad de rotación y traslación. La difusión por vía sanguínea, facilita su rápida proliferación y diseminación por los tejidos; lo que conlleva a una intensa y aguda disfunción generalizada del organismo. La respuesta inmunológica del caso infestado es de tipo humoral, con la formación de anticuerpos aglutinantes específicos. Las leptospiras suelen aislarse durante su multiplicación en la sangre, en los tejidos y en las meninges (Braunwald *et al.*, 2001; Levett, 2001).

Aproximadamente, el 15% de los pacientes cursan la enfermedad de forma subclínica. Más del 90% de los enfermos sintomáticos, sufren la variante leve anictérica, con o sin meningitis asociada. La leptospirosis grave, con intensa ictericia y conocida como “síndrome de Weil”, se presenta en alrededor del 5-10% de las personas infectadas (Braunwald *et al.*, 2001; Guidugli *et al.*, 2009).

La severidad del cuadro clínico depende de la virulencia y las dosis del serovar infectante, así como de la susceptibilidad del hospedero, de la edad, la inmunodependencia y del sistema u órgano afectado. La leptospirosis se considera una enfermedad bifásica, formada

II. Revisión Bibliográfica

por las fases clínicas de leptospiremia (primera fase) y leptospiuria e inmune (segunda fase); sin embargo, en algunos pacientes puede presentarse de forma monofásica donde se “funden” en una expresión continúa los diferentes signos y síntomas clínicos (Braunwald *et al.*, 2001; Levett, 2001).

El período de incubación de la enfermedad varía entre dos y 30 días (Ko *et al.*, 1999; LaRoque *et al.*, 2005). El tratamiento selectivo contra la leptospirosis es la penicilina, aunque las leptospiras son sensibles también a los β -lactámicos, los macrólidos, las tetraciclinas, las fluoroquinolonas y las estreptomicinas (Illangasekera *et al.*, 2008). Los problemas que inciden en no poder investigar su susceptibilidad “*in vitro*”, radica quizás en la ausencia de un método objetivo y reproducible, capaz de determinar el comportamiento de la cepa aislada frente a los antimicrobianos empleados en la terapéutica y profilaxis de la leptospirosis. Esta dificultad pudiera estar relacionada con el prolongado período de incubación de las leptospiras, así como con la facilidad que tienen los medios de cultivo para contaminarse con microorganismos de crecimiento rápido (Takashima *et al.*, 1993; Yersin *et al.*, 2000; Trivedi *et al.*, 2009; Brett-Major y Lipnick, 2009).

2.1.7. Inmunopatología de la leptospirosis

De manera general, la fase inmune de una leptospirosis aguda se caracteriza, por la desaparición de las leptospiras del torrente sanguíneo y la aparición de anticuerpos aglutinantes u opzonizantes (Abdulkader *et al.*, 2002; Fialho *et al.*, 2009; Senthilkumar *et al.*, 2009). Se sabe que la producción de inmunocomplejos, seguido de la inflamación del sistema nervioso central, conspira con el mejoramiento clínico de los casos. En las infecciones experimentales se demuestra la existencia de antígenos de leptospira localizados en el intersticio renal, mientras que la IgG y la fracción C3 del complemento, se depositan en el glomérulo y en las paredes de los vasos sanguíneos (Yasuda *et al.*, 1991).

La patogénesis de la uveítis equina recurrente parece ser la responsable de la producción de los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada contra el tejido ocular, pero en particular, el daño de la retina se vincula con la presencia de linfocitos B (Kalsow y Dwyer, 1998). En los pacientes con leptospirosis se identifican también anticuerpos antiplaquetarios. En la

II. Revisión Bibliográfica

fase septicémica, los anticuerpos presentes en la sangre se dirigen contra los criptoantígenos, éstos producen el daño plaquetario y no son la causa de la trombocitopenia. En la fase aguda de la enfermedad se identifican otros autoanticuerpos (anticardiolipinas IgG y los antineutrófilos citoplasmáticos); aunque, se cuestiona aún, la relevancia de estos últimos en la patogénesis y el daño vascular (Abdulkader *et al.*, 1993; Levett, 2001; Craig *et al.*, 2009).

Las cepas virulentas de leptospiras inducen la apoptosis “*in vivo*” e “*in vitro*”, aunque la mayor evidencia se observa en los modelos experimentales, sobre todo en los ensayos con ratones. La apoptosis linfocitaria se incrementa por la presencia de los lipopolisacáridos (LPS) de las leptospiras, una vía de inducción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), quienes además de los altos niveles de citoquinas inflamatorias, están presentes en los casos de leptospirosis (Estavoyer *et al.*, 1993; Malmstrom *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2009).

2.1.8. Principales antígenos de las leptospiras

La membrana externa de las leptospiras contiene principalmente LPS y algunas lipoproteínas reconocidas en la literatura científica como proteínas de membrana externa (PMEs) (Haake, 2000; Jiang *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009). Los LPS son buenos inmunógenos y son los responsables de la especificidad de cada serovar de leptospira, en particular, en el serovar Grippotyphosa, se asocia la expresión de las PMEs con su virulencia (Lo *et al.*, 2009).

Varias PMEs se reconocen como módulo reguladoras con actividad “*in vivo*” (Nicholson *et al.* 1993; Haake, 2000; Haake *et al.*, 2000 y 2004; Haake y Matsunaga 2002 y 2005; Vieira *et al.*, 2009), aunque LipL32 y LipL36, no se reconocen bien, por la respuesta inmune encontrada en el hámster infectado (Haake *et al.*, 2000; Lottersberger *et al.*, 2009; Stoddard *et al.*, 2009; Aviat *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2009).

Los componentes de la membrana externa juegan un papel importante en la patogénesis de la nefritis y las glicoproteínas, en particular, en el serodiagnóstico (Blanco *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Aviat *et al.*, 2009). Se describen desde principios de este siglo, patrones

de una fibronectina producida por cepas virulentas de leptospiras (Merien *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2009).

2.1.9. Inmunidad de la leptospirosis

La inmunidad de la leptospirosis está restringida al serovar homólogo infectante o a los serovares genéticamente muy cercanos entre sí (Midwinter *et al.*, 1994; Levett, 2001), ejemplo de ello, es la descripción de la protección cruzada encontrada en el hámster inmunizado con las PMEs OmL1 y LipL41 de leptospiras. Estas proteínas conservadas muestran buena capacidad inmunogénica, comportamiento que permite el desarrollo experimental de una protección sinérgica o el desarrollo de una fuerte inmunidad protectora (Haake, 2000; Hakke *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009).

Con la incorporación de las tecnologías modernas se caracterizan los antígenos de leptospiras involucrados en la respuesta inmune humoral. Así por ejemplo, se describe el antígeno F4 (serovar específico), extraído del LPS de las leptospiras, un antígeno que al perder su actividad endotóxica, induce una inmunidad protectora en los modelos experimentales del conejo, ratón y del hámster. El antígeno TM de las leptospiras se inhibe con frecuencia por la aglutinación frente a un suero homólogo, comportamiento que no ocurre con el antígeno F4, aunque ambas estructuras poseen un epítoto común. Extractos de células completas de leptospiras extraídas con dodecil-sulfato de sodio, producen anticuerpos protectores capaces de fijarse al complemento y aglutinarse en presencia del suero del enfermo (Sonrier *et al.*, 2000). Estudios recientes describen la existencia de citoquinas inducidas por el serogrupo Pomona, detectadas en líneas de células de ratones y humanos (Jongyota *et al.*, 2008).

La inmunidad pasiva se confiere por la reducción o supresión del número de linfocitos CD4+ y también se señala su respuesta hacia algunos mitógenos, principalmente en los pacientes con infección por el VIH, coinfectados con leptospiras (Da Silva *et al.*, 1990; Yamashiro-Kanashiro, 1991).

2.2. Diagnóstico diferencial

La leptospirosis humana debe diferenciarse de otras enfermedades febriles que presentan síntomas y signos clínicos similares. Entre estas entidades, las más conocidas son: el dengue, la hepatitis, el paludismo, la fiebre entérica, las infecciones por hantavirus y por enterovirus, así como las enfermedades causadas por rickettsias (Speelman, 2000; Braunwald *et al.*, 2001; Koizumi *et al.*, 2009a; Chandy *et al.*, 2009). Los datos que ofrecen los resultados del laboratorio clínico, suelen orientar hacia la definición de la gravedad de los distintos componentes clínicos del síndrome de Weil (Tullu y Karande, 2009; Hurst *et al.*, 2009).

2.2.1. Exámenes complementarios

Existen importantes exámenes de laboratorio complementarios, cuyos resultados ayudan a la orientación del clínico sobre la sospecha de una infección por leptospiras. La presentación de una leucocitosis con neutrofilia, una eritrosedimentación elevada, así como una proteinuria y leucocituria son indicadores importantes de una posible leptospirosis. La naturaleza no específica de estos cambios, no significa, ni niega, la existencia de la enfermedad. Para la confirmación final de los hallazgos del laboratorio clínico se deben realizar las pruebas microbiológicas específicas (Levett, 2001; Chandy *et al.*, 2009).

2.3. Diagnóstico microbiológico

El éxito del diagnóstico microbiológico de la leptospirosis, dependerá del conocimiento adquirido sobre la patogenia de la enfermedad y de los mecanismos que demuestren las propiedades invasivas de su agente etiológico (Levett, 2001). Para la realización del diagnóstico etiológico, se utilizan diferentes productos patológicos provenientes de los animales sospechosos, incluyendo al humano, así como de la obtención y el procesamiento de las muestras de aguas y los suelos relacionados con la fuente de infección (Levett, 2001; Dassanayake *et al.*, 2009; Guerra, 2009).

La obtención de sangre para el cultivo constituye una muestra útil a partir del segundo y hasta el quinto día después del inicio y establecimiento de la sintomatología. Los hemocultivos deben realizarse de pacientes no tratados con antimicrobianos (Levett, 2001).

II. Revisión Bibliográfica

Las muestras de suero tienen también mucha importancia para el diagnóstico etiológico. Generalmente, se utilizan sueros pareados obtenidos con intervalos entre siete a 10 días, de forma tal, que representen las dos fases clínicas de la enfermedad (Levett, 2001). El valor práctico de la muestra de orina es vital en la fase de leptospiuria e inmune, aunque en algunos ensayos, al procesar muestras colectadas durante la fase leptospirémica, se obtienen resultados satisfactorios (Van Eys *et al.*, 1991; Gravekamp *et al.*, 1991 y 1993). La obtención del líquido cefalorraquídeo (LCR) se recomienda a partir del quinto y hasta el decimonoveno día posterior a la infección. Los cortes de tejidos (riñón, hígado y pulmones) no congelados deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio de microbiología, lugar donde se inocularán en los medios selectivos para leptospiras, con la finalidad de aislar al microorganismo. Para estudios epizootiológicos son importantes las muestras de aguas y de los suelos vinculados con la fuente de infección. Las cepas de leptospiras patógenas, crecen “*in vitro*” a temperaturas de 28 a 30° C. Para el cultivo y aislamiento de estas espiroquetas, están los medios selectivos comerciales de Ellinghausen y McCullough, modificado por Johnson y Harris (EMJH), el Korthof y el Fletcher, entre otros. Las muestras clínicas de las que se aíslan las leptospiras, suelen contaminarse fácilmente, existiendo distintos métodos para su descontaminación. Las diluciones en solución salina con pH neutro o alcalino, las filtraciones a través de membranas bacteriológicas con poros de 0,22 µm, así como la inoculación en los animales de experimentación (hámsteres) son los métodos más utilizados (Levett, 2001).

2.3.1. Demostración microscópica de las leptospiras

Las leptospiras pueden visualizarse a través del examen microscópico directo en campo oscuro, método poco sensible y específico (Vijayachari *et al.*, 2001b). Una manera práctica para aumentar la sensibilidad del método, consiste en teñir la célula de leptospira (Vijayachari *et al.*, 2001b). Las principales tinciones utilizadas son aquellas que emplean las sales de plata y entre ellas, la más conocida es la coloración de Warthin - Starry (Vijayachari *et al.*, 2001b). También se recomiendan algunas inmunotinciones (Zaki *et al.*, 1996).

2.3.2. Demostración directa de las leptospiras

El aislamiento de las leptospiras por cultivo, constituye la prueba de oro para la confirmación (retrospectiva) de la enfermedad. Este método es muy bien conocido y presenta un 100% de especificidad (Levett 2001; Smythe *et al.*, 2009).

Otros métodos directos para la detección de leptospiras, a partir de muestras clínicas, presentan son el Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ensayo inmunoenzimático (ELISA) directo de doble sándwich (Champagne *et al.*, 1991) que es el más estudiado, aunque también se reportan los inmunoensayos quimioluminocentes (Palmer y Hookey, 1992) y la cromatografía en capa delgada para la detección de leptospiras (Pol y Bharadwaj, 2009).

La aplicación de las técnicas de biología molecular, con la determinación del ADN de las leptospiras, exhibe su valor a partir de diferentes muestras clínicas (Van Eys *et al.*, 1991; Gravekamp *et al.*, 1991 y 1993; Zuerner *et al.*, 1995; Zuerner y Bolin, 1997; Merien *et al.*, 1993, 1995, 2000 y 2005). La RCP, es uno de los métodos diagnósticos más utilizados, esta técnica al igual que el cultivo, ofrece una buena especificidad, lo que le permite su aplicación para el diagnóstico rápido de la infección activa, a pesar de tener el inconveniente de realizarse, sobre todo, en los laboratorios especializados y con un personal calificado (Van Eys *et al.*, 1991; Gravekamp *et al.*, 1991 y 1993; Manu *et al.*, 2009). Está bien documentada la utilización de la RCP a partir de sueros, en los trabajos científicos que avalan grandes evaluaciones clínicas, así como para el diagnóstico rápido de una infección activa por leptospiras (Gravekamp *et al.*, 1991; Merien *et al.*, 1993; Branger *et al.*, 2005). A finales del pasado y principios del presente siglo, surge la variante cuantitativa de la RCP en tiempo real para el diagnóstico de esta enfermedad (Woo *et al.*, 1998a, 1998b y 1999; Levett *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2009; Stoddard *et al.*, 2009; Lourdault *et al.*, 2009).

2.3.3. Demostración indirecta de las leptospiras

La mayoría de los casos clínicos sospechosos de leptospirosis se confirman, a través de la serología como herramienta principal. La IgM dirigida contra las leptospiras se detecta en

II. Revisión Bibliográfica

la sangre de los enfermos, después del quinto o séptimo día del inicio de los primeros síntomas (Levett, 2001).

La técnica de MAT considerada la prueba de referencia internacional para el serodiagnóstico de la leptospirosis, se describe por primera vez por Schüffner y Mochtar en el año 1927. En sus inicios se reconoce como una prueba de aglutinación y lisis, ya que sus resultados se leían en dependencia de la cantidad de círculos de lisis y de los restos celulares observados. Posteriormente, se comprueba que existían agrupamientos o aglutinados que contenían células de leptospiras vivas y no eran precisamente restos celulares (Levett, 2001). Modificaciones realizadas permiten desarrollar la tecnología, hasta llegar al micrométodo, una técnica que, en estos momentos, se utiliza en la mayoría de los laboratorios (Smythe *et al.*, 2009; Dassanayake *et al.*, 2009).

La técnica de MAT se considera el único método serológico de laboratorio, que determina el “posible serogrupo y serovar específico” productor de la infección por leptospiras. A pesar de esto, son pocos los estudios que demuestran la correlación existente entre un serogrupo o serovar identificado por MAT y el encontrado por el cultivo. Según Levett, se predice con exactitud, el serogrupo o serovar de leptospira causante de la infección por MAT, solo en el 40% de los casos positivos (convalecientes de leptospirosis) (Levett, 2003).

La lectura de la prueba de MAT, es subjetiva y difícil y se realizan considerables esfuerzos para reducir el grado de variabilidad en la observación final. La estimación entre 50% de leptospiras libres, con respecto a 50% de células aglutinadas puede generar una interpretación errónea y un alto grado de reacciones cruzadas entre los serogrupos de leptospiras, a pesar de esto, resulta muy difícil obtener un falso biológico positivo por esta técnica (Levett, 2001).

Durante la primera fase clínica de la enfermedad aparecen con frecuencia las “reacciones paradójicas” en algunos primeros sueros de pacientes sospechosos de leptospirosis (Faine *et al.*, 1999; Faine, 2003; Craig *et al.*, 2009), razón por la cual resulta necesario el estudio

II. Revisión Bibliográfica

de sueros pareados por MAT. El incremento en dos diluciones del título del segundo suero, respecto al primero, indica un resultado positivo y el intervalo de tiempo que media entre la toma del segundo suero con respecto al primero, será de siete días como mínimo (Levett, 2001). Si no se demuestra la conversión serológica, quizás por una toma incorrecta de las muestras, se necesitarán nuevas extracciones de sangre, hasta poder demostrar la positividad en las mismas (Levett, 2001).

Los títulos serológicos presentes en los sueros de pacientes con leptospirosis frente a las cepas inactivadas de leptospiras, son inferiores a los que se logran con el uso de cepas vivas. Se señala también que la aglutinación que se observa cuando se utilizan células tratadas con formalina es cualitativamente diferente a la que se produce con la utilización de células no tratadas. Los reactivos inactivadores del crecimiento bacteriano, tales como el formaldehído, modifican la configuración espacial de muchos de los epítopes antigénicos que reconocen los anticuerpos producidos contra las leptospiras. Sin embargo, el tratamiento con formalina puede ser una buena alternativa de trabajo, para aquellos laboratorios que no dispongan de un personal calificado y que no tengan experiencia en mantener vivas las colecciones de leptospiras (Levett, 2001).

Otras técnicas utilizadas para el serodiagnóstico de la leptospirosis son la prueba macroscópica en lámina, la macroaglutinación con antígeno termorresistente, la contraelectroforesis (CIE) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Yasuda *et al.*, 1991; Appassakij *et al.*, 1995; Levett, 2001). Muestra también aceptables resultados para el serodiagnóstico de la leptospirosis, el ensayo de immunobloting, método que emplea un conjugado de oro coloidal (Petchclai *et al.*, 1991). Mientras que, en la saliva y el suero se pueden demostrar anticuerpos IgM mediante la técnica DOT-ELISA, respectivamente (Silva *et al.*, 1997 y Vasconcellos *et al.*, 2009). Comercialmente existe un IgM-Dot-ELISA-Dipstick con valores de sensibilidad tan elevados como el demostrado por el ELISA-IgM tradicional (Levett *et al.*, 2001).

En contraste con la amplia reactividad que exhiben los ensayos de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis en los humanos (Qiu *et al.*, 2009), en las diferentes especies de

II. Revisión Bibliográfica

animales, el comportamiento es diferente. El ELISA que más se reconoce en este sentido, es el descrito para la detección del serovar Pomona y Hardjo en el ganado bovino (Levett *et al.*, 2001).

Existen otros métodos que utilizan células rojas (eritrocitos) obtenidas de diferentes especies de animales, que actúan como soporte para los antígenos de leptospiras. La sustancia sensibilizante de eritrocitos (ESS), es uno de los antígenos de leptospiras que se acopla más comúnmente a los hematíes de carnero. Este complejo formado por el antígeno y el soporte biológico (hematíe), se emplea para la detección de anticuerpos específicos contra leptospiras, en la prueba hemolítica (HLT) y la técnica de HAT, esta última descrita por Chang en 1957 y aplicada por otros autores como McComb (1957), Sulzer (1975) y Sakamoto (1985). En el año 1998, se realiza una de las evaluaciones más importante de la técnica de HAT para el diagnóstico de la leptospirosis humana en los Centros de Enfermedades (CDC) de EE.UU. La evaluación demuestra que la prueba es valiosa ya que proporciona unos valores de sensibilidad y especificidad del 92 y 95%, respectivamente (Levett y Whittington, 1998). Estudios posteriores señalan que los valores de la sensibilidad de la técnica de HAT, varían en dependencia de la zona geográfica donde se aplique el sistema, así como del momento de la toma de la muestra y del diseño experimental realizado. En uno de estos estudios se detecta una positividad de 44% en la fase aguda de la enfermedad, cuando las muestras de los pacientes se tomaron a partir del 5^{to} día de iniciados los síntomas (Yersin *et al.*, 2000; Effler *et al.*, 2000; Levett *et al.*, 2001). La técnica de HAT, está descrita en el Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis en Cuba y se utiliza desde el año 1983, en todos los CPHEM principalmente para el serodiagnóstico de esta entidad infecto contagiosa (Cruz, 2002).

La técnica de aglutinación de la microcápsula, método que emplea un polímero sintético de leptospiras, en lugar de células rojas, se evalúa como parte de un estudio multicéntrico en muestras de sueros obtenidas en la fase aguda de leptospirosis de individuos de Japón, India y China. Sin embargo, no se detectan casos positivos infectados por otros serovares de leptospiras que no estén incluidos en la preparación antigénica utilizada. Una de sus

II. Revisión Bibliográfica

ventajas como un método directo de aglutinación radica en que puede aplicarse a sueros de diferentes especies de animales (Cui *et al.*, 1991; Sehgal *et al.*, 1997).

A principios de los años 1990, la agencia comercial PanBio INDX, INC., de los Estados Unidos comercializa la primera generación del sistema inmunoenzimático cualitativo conocido como Dip-S-Ticks[®]-IgM (anexo 1), este sistema es útil para la detección de anticuerpos específicos (IgM) producidos contra las leptospiras. Esta primera versión del Dip-S-Ticks[®]-IgM, permite analizar diferentes tipos de muestras clínicas, entre ellas los sueros, el plasma, la sangre total heparinizada y la sangre obtenida de la punción del dedo (anexo 1).

En el año 1997, Holanda da a conocer el uso de un ensayo Dipstick para la detección de anticuerpos IgM en los sueros de casos sospechosos de leptospirosis (Gussenhoven *et al.*, 1997). A partir de este momento, la agencia comercial Organon Tecknika (Organon Tecknika LTD., Holanda) en colaboración con el Instituto de Medicina Tropical (KIT), de Holanda, desarrolla la segunda variante de este sistema, conocida como LEPTO Dipstick (Smits *et al.*, 1999 y 2000a) (anexo 2), un método inmunocromogénico específico para la detección de anticuerpos IgM en el suero humano. Este segundo estuche es un sistema diagnóstico compuesto por dos bandas horizontales, una de ellas, la que se ubica en la parte inferior de la tirilla, se corresponde con el antígeno de leptospira (obtenido a partir de la cepa Patoc I del serogrupo Semarang, serovar Patoc, de la especie *L. biflexa*) de amplia reactividad y la otra banda, ubicada en la parte superior, se corresponde con un control interno (anti IgM humana). La existencia de anticuerpos específicos contra las leptospiras en el suero se pone en evidencia, por la adición de un reactivo revelador, con un conjugado acoplado a una solución colorante. La reactividad del antígeno permite la eficiente detección del amplio espectro de anticuerpos contra la infección por leptospiras. Desde el punto de vista técnico, este ensayo es más simple que el Dip-S-Ticks[®]-IgM (Smits *et al.*, 2000a).

En el 2000, la firma comercial Organon Tecknika (Organon Tecknika LTD., Holanda), en colaboración con el KIT de Holanda, desarrolla otro sistema rápido dirigido a la pesquisa

II. Revisión Bibliográfica

de leptospirosis humana. En particular, Lepto Tek Dri Dot es un sistema de aglutinación con partículas látex (Smits *et al.*, 2000b y 2001b) (anexo 3). El antígeno acoplado al ensayo (obtenido a partir de la cepa Lely del serovar Hardjo, serogrupo Sejroe, de la especie *L. interrogans*) detecta anticuerpos específicos contra las leptospiras en el suero humano, por lo que se considera de una amplia reactividad genérica. La mezcla conjugada del antígeno y las partículas de látex se absorbe a una cartulina blanca, por congelación en seco. La presencia de una aglutinación granular fina y homogénea, evidencia un resultado positivo. Por el contrario, cuando no existen anticuerpos específicos contra las leptospiras, no se formará aglutinación y la suspensión permanecerá azul, indicando un resultado negativo. Pueden ocurrir reacciones débiles positivas, dependiendo de la concentración de los anticuerpos. Todos los casos positivos por este sistema deben confirmarse por la técnica de MAT (Smits *et al.*, 2000b y 2001b; Vijayachari *et al.*, 2002; Goris *et al.*, 2009). El método no requiere de equipamiento alguno para su realización y los resultados se obtienen a los 30 seg de realizar la prueba. Los reactivos del estuche comercial son muy estables y pueden almacenarse a la temperatura ambiente (Vijayachari *et al.*, 2002; Goris *et al.*, 2009).

En el 2001, la firma comercial Organon Tecknika (Organon Tecknika LTD., Holanda), en colaboración con el KIT de Holanda, desarrolla otro sistema serológico denominado Lepto Tek Lateral Flow (Smits *et al.*, 2001a) (anexo 4), para la pesquisa rápida de IgM en las muestras de suero y sangre de los casos sospechosos de leptospirosis. Lepto Tek Lateral Flow, es un sistema inmunocromogénico, que tiene un antígeno específico de leptospira (obtenido a partir de la cepa Patoc I, del serogrupo Semarang, serovar Patoc, de la especie *L. biflexa*) fijado como una línea discreta, en una membrana de nitrocelulosa porosa localizada como la zona “test”. También está fijado, del mismo modo, una anti-IgM humana en la zona denominada “control”. La membrana (en su totalidad) se incluye dentro de un soporte o tablilla plástica.

En el extremo izquierdo de la tablilla plástica está la zona “porta-muestra”, que recibe la sangre o el suero. Para la realización del ensayo se emplea un reactivo de detección compuesto, por un grupo de partículas coloidales rojas móviles, unidas a un anticuerpo anti-IgM humana. Al difundir y trasladarse la muestra más el reactivo de detección, por la

II. Revisión Bibliográfica

membrana, se formarán, si existe identidad, bandas coloreadas o líneas que en dependencia de su ubicación orientarán a favor de un resultado u otro. Por lo general, en la zona “control”, siempre aparecerá una banda coloreada que indicará la validez de la prueba. Si en la muestra existen anticuerpos específicos contra leptospiras, en la zona “test” aparecerá una línea roja (más o menos intensa), en dependencia de las concentraciones de IgM específicas producidas contra las leptospiras. Si por el contrario, la muestra no posee anticuerpos específicos IgM, la mezcla continuará difundiendo y sobrepasará la zona “test”, caso donde no se observará la línea de coloración roja. El criterio de confiabilidad del Lepto Tek Lateral Flow, dependerá del debido funcionamiento de la zona “control” (Smits *et al.*, 2001a; Eapen *et al.*, 2002; Sehgal *et al.*, 2003; Goris *et al.*, 2009).

Este estuche es una segunda generación del sistema conocido como LEPTO Dipstick, el ensayo no requiere de equipamiento específico y los resultados se obtienen a los 10 min de realizar la prueba. Los reactivos, según el productor, deben conservarse entre 2 a 25⁰ C, en un lugar seco y protegido de la exposición directa de la luz. La comparación de Lepto Tek Lateral Flow con el ELISA-IgM para el serodiagnóstico de la leptospirosis, muestra una sensibilidad total de 86%, con una especificidad de 92%. La amplia reactividad del antígeno de leptospira acoplado al Lepto Tek Lateral Flow, permite la detección de infecciones causadas por cepas de leptospiras de diferentes serovares (Eapen *et al.*, 2002; Sehgal *et al.*, 2003; Goris *et al.*, 2009).

Con el desarrollo tecnológico aparecen otros sistemas de ventana diseñados comercialmente, para el pesquisaje de leptospirosis humana. En este sentido se destacan los comercializados por la compañía coreana BIO LINE SD Standard Diagnostics INC, líder mundial en el desarrollo y venta exitosa de productos para el diagnóstico “in vitro”, tanto en el campo de la salud pública como en el veterinario, en más de 95 países. Para el pesquisaje de leptospirosis, BIO LINE – SD, dispone de tres sistemas de ventanas, basados en la detección de anticuerpos IgG (Leptospira), IgM (Leptospira IgM) e IgM-IgG (Leptospira IgM-IgG) (anexo 5). Estos estuches presentan diferencias en cuanto el tipo de muestras a utilizar, así como el tiempo de incubación y la cantidad de bandas coloreadas. La técnica inmunocromogénica de BIO LINE SD Leptospira IgM-IgG en particular, se

II. Revisión Bibliográfica

basa en fijar, sobre la superficie de una tirilla, las siguientes líneas: “G” (anticuerpo IgG obtenido frente a la cepa Patoc I, del serogrupo Semarang, serovar Patoc, de la especie *L. biflexa*), “M” (anticuerpo IgM obtenido frente a la misma cepa Patoc I), y “C” (línea control, formada por una anti-IgM humana). Estas líneas no son visibles antes de aplicar la muestra. La línea “C”, se emplea como control de la prueba, trazo que se visualiza cuando la técnica se ejecuta de forma adecuada. Mientras que, el color púrpura visible en las zonas “G” y “M” dependerá de la concentración de las IgG o IgM presentes en el suero o el plasma. La ausencia de color, se corresponde con la inexistencia de estas inmunoglobulinas. El productor recomienda no emplear esta prueba sólo en función del diagnóstico y avalar los resultados con los hallazgos clínicos y epidemiológicos encontrados. Si la prueba fuera negativa y la clínica aporta elementos que hacen sospechar una leptospirosis, es válido tomar nuevas muestras y realizar las repeticiones que sean necesarias (BIO-LINE SD Standard Diagnostics, INC, 2007, <http://www.standardia.com>).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

Este capítulo se dividió en cuatro grupos de investigaciones descriptivas y prospectivas, comprendidas en los acápites **3.3.1**, **3.3.2.**, **3.3.3.**, y **3.3.4.**. En primera instancia (acápite **3.3.1**) se mostraron los resultados de las evaluaciones prácticas realizadas a los siguientes sistemas serológicos comerciales: LEPTO Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow, Lepto Tek Dri Dot (Organon Tecknica LTD., Holanda) y SD Leptospira IgM-IgG (<http://www.standardia.com>). Además se presentó, cómo fue identificada la infección por leptospiras en los casos clínicos asociados con dos brotes epidémicos ocurridos en Cuba (acápite **3.3.2**), cómo se verificó la existencia de casos de leptospirosis humana en una provincia seleccionada para aplicar la vacuna vax-SPIRAL[®] y cómo se detectaron los serogrupos de leptospiras circulantes (acápite **3.3.3**). El último de los acápites (**3.3.4**) presentado en este capítulo, incluyó el primer estudio realizado en Cuba para el desarrollo, la evaluación y la aplicación de un sistema de aglutinación con partículas de látex, método que se utilizó para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana.

3.2. Marco de la investigación

El LNRL, perteneciente al Departamento de Bacteriología - Micología de la Subdirección de Microbiología del IPK y que sirvió de marco para estas investigaciones, está considerado como un laboratorio de alcance internacional. Este laboratorio posee el equipamiento tecnológico necesario para brindar servicios especializados, así como enfrentar las contingencias sobre la leptospirosis humana y otras enfermedades producidas por espiroquetas que se presenten en Cuba. En esta entidad se realiza el control de calidad del diagnóstico de todos los CPHEM del país y se hace todos los años, el diagnóstico

microbiológico a un promedio de 500 casos sospechosos de leptospirosis que acuden al hospital del IPK y a otras instituciones nacionales. Por sus condiciones técnicas y la preparación científica de los profesionales que laboran en él, constituye el Centro de Referencia Nacional reconocido por el MINSAP para acometer los estudios de vigilancia microbiológica de la leptospirosis humana en Cuba

3.3. Procedimientos y características generales del trabajo

3.3.1. Evaluación y aplicación de los sistemas serológicos rápidos, para el pesquiasaje de la leptospirosis humana en Cuba

3.3.1.1. Universo de trabajo y muestras

La evaluación del sistema serológico rápido Lepto Tek Lateral Flow (anexo 4) se hizo en el período comprendido desde septiembre de 2001 hasta enero de 2002. En esta etapa se estudió un grupo de sueros obtenidos de individuos (enfermos y sospechosos) de leptospirosis y con los mismos se conformaron los siguientes grupos de estudio:

- Grupo I (controles positivos): 18 sueros de casos con leptospirosis confirmada.
- Grupo II (controles negativos): 10 sueros de pacientes con dengue, cinco de individuos con hepatitis B y cinco sueros de casos con enterovirosis.
- Grupo III: 47 sueros de pacientes con una sospecha clínica de leptospirosis.

Las evaluaciones de los sistemas LEPTO Dipstick (anexo 2) y Lepto Tek Dri Dot (anexo 3) se realizaron desde enero a mayo de 2002 y se aplicaron en muestras de sueros obtenidos de personas enfermas y sospechosas, con estas muestras se formaron los siguientes grupos de estudio:

- Grupo IV (controles positivos): 14 sueros de casos con leptospirosis confirmada.
- Grupo V (controles negativos): cinco sueros de pacientes con dengue, cinco de casos con hepatitis B, 5 de individuos con hepatitis C y cinco sueros de casos con enterovirosis.
- Grupo VI: 40 sueros de pacientes con sospecha de leptospirosis.

III. Materiales y Métodos

La evaluación del SD Leptospira IgM-IgG (anexo 5) se realizó en el período comprendido desde noviembre de 2007 a febrero de 2008. Los grupos se formaron con los sueros obtenidos de personas (enfermas y sospechosas) y para su estudio se distribuyeron como sigue:

- Grupo VII (controles positivos): 28 sueros de casos con leptospirosis confirmada.
- Grupo VIII (controles negativos): 15 sueros de pacientes con dengue, cinco de casos con hepatitis B y 10 sueros de individuos con sífilis.
- Grupo IX: 34 sueros de pacientes sospechosos de leptospirosis.

La información de la distribución del universo de trabajo, con sus muestras, así como los sistemas rápidos evaluados, se resume en la tabla 1.

III. Materiales y Métodos

Tabla 1. Distribución del universo de trabajo, de las muestras y los sistemas rápidos evaluados, para la pesquisa serológica rápida de leptospirosis humana en Cuba.

Sistemas	Período de evaluación	Grupos	Casos	Total
Lepto Tek Lateral Flow (Organon Technica LTD., Holanda)	Sept 2001 /	I Controles +	<i>Leptospiriosis confirmada</i>	18
		II Controles -	Dengue (10), hepatitis B (5), enterovirus (5)	20
	Enero 2002	III	<i>Sospechosos de leptospiriosis</i>	47
LEPTO Dipstick y Lepto Tek Dri Dot (Organon Technica LTD., Holanda)	Enero 2002	IV Controles +	<i>Leptospiriosis confirmada</i>	14
	/	V Controles -	Dengue (5), hepatitis B (5) – C (5) y enterovirus (5)	20
	Mayo 2002	VI	<i>Sospechosos de leptospiriosis</i>	40
SD Leptospira IgM-IgG (http://www.standardia.com , 2007)	Nov 2007	VII Controles +	<i>Leptospiriosis confirmada</i>	28
	/	VIII Controles -	Dengue (15) , hepatitis B (5) y sífilis (10)	30
	Feb 2008	IX	<i>Sospechosos de leptospiriosis</i>	34

3.3.1.2. Métodos

La metodología seguida en los acápites 3.3.1, 3.3.2., 3.3.3., 3.3.4., y en los subacápites 3.3.4.2.2. y 3.3.4.3.3. para la recolección, el procesamiento, la conservación de las muestras, la confirmación de los casos, así como el cultivo (anexo 6) y la identificación de los serogrupos de leptospiras (anexo 9) se realizó, según lo establecido en el Manual de Operaciones y Procedimientos (MOP) del LNRL del IPK, norma vigente según el año de realización de cada uno de los estudios. De igual manera, las cepas utilizadas para la identificación de los serogrupos de leptospiras, en los sueros de los casos clínicos presuntivos, de la tesis en general, aparecen en la tabla 2.

III. Materiales y Métodos

Tabla 2. Relación de las especies, serogrupos, serovares y cepas de leptospiras, empleadas en la técnica de referencia internacional de MAT.

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>Leptospira interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón 3
<i>Leptospira interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>Leptospira interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
<i>Leptospira kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
<i>Leptospira kirschneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
<i>Leptospira interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	V Batavia 46
<i>Leptospira noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
<i>Leptospira interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>Leptospira interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>Leptospira interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>Leptospira interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>Leptospira biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc I

Fuente: MOP del LNRL, IPK.

La técnica serológica de referencia internacional de MAT, referida por la OMS y la ILS (Faine *et al.*, 2003), fue utilizada para confirmar todos los casos de leptospirosis, incluidos en esta tesis. El cultivo como prueba de oro para el diagnóstico microbiológico de esta entidad clínica, no se realizó en la mayoría de los casos estudiados, por las dificultades que presenta este proceder para su ejecución sistemática.

De forma particular, los sueros de los casos controles positivos, incluidos en este acápite, se confirmaron por la técnica serológica de MAT (anexo 7); siguiendo las recomendaciones establecidas en el MOP de los años 2001 y 2008 del LNRL (IPK) y la metodología descrita por Hartskeerl *et al* (2008). Los sueros correspondientes a los casos de dengue se corroboraron por un ELISA de captura de IgM (diseñado en el IPK), los de sífilis, por las pruebas no treponémicas de la reagina plasmática rápida (RPR) (Reactivos *SPINREACT* S.A, España), el *Venereal Diseases Research Laboratory* (VDRL), producido por *HELFA*[®] - Diagnósticos de Quimefa en Cuba y la prueba treponémica de hemoaglutinación del

III. Materiales y Métodos

Treponema pallidum (HATP) (Human-Diagnostic Worldwide de Alemania); mientras que, los sueros correspondientes a los casos de hepatitis B y C se confirmaron mediante sus respectivos juegos diagnósticos de UMELISA - HBsAg y UMELISA anti - HCV, producidos por el Centro de Inmunoensayo (CIE) de La Habana, Cuba; para los sueros de los casos de meningitis aséptica por *enterovirus* se aplicó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, según el MOP de los años 2001 y 2002 del Laboratorio de *Enterovirus* del IPK. Todos los sueros se conservaron a -20° C, hasta su uso en el LNRL del IPK. Los sueros de los casos sospechosos de leptospirosis se obtuvieron de pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos de los siguientes hospitales clínicos - quirúrgicos de Ciudad de La Habana: “Enrique Cabrera”, “Salvador Allende” y del IPK.

Las tecnologías serológicas rápidas referidas en este acápite se realizaron, según las recomendaciones descritas por Smits *et al* (2000a, 2000b y 2001a) y el protocolo de trabajo publicado por BIO LINE SD Standard Diagnostics, INC (<http://www.standardia.com>).

Fue confeccionada una base de datos en Microsoft Excel y los resultados se procesaron mediante el paquete estadístico Epidat versión 3.1. Los sueros controles (positivos y negativos), se utilizaron para medir el valor diagnóstico de los sistemas serológicos rápidos con respecto al método de referencia de MAT, y sus resultados sirvieron para calcular los porcentajes de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo, el índice de concordancia o validez, el grado de acuerdo o reproducibilidad (índice de Kappa); así como la razón de verosimilitud para la fiabilidad de cada sistema, estimándose el intervalo de confianza (IC) del 95 % y el valor de $p \leq 0.05$.

3.3.2. Identificación de la infección por leptospiras en los casos clínicos asociados con dos brotes epidémicos ocurridos en Cuba.

3.3.2.1. Antecedentes de la investigación

Los dos brotes de leptospirosis se produjeron en regiones donde la situación epidemiológica existente contribuyó a su desarrollo: 1) En la Ciudad de Santa Clara: se presentó un marcado deterioro de las condiciones higiénico - sanitarias en esta comunidad, situación

favorecida, por la convivencia de animales domésticos y humanos en los hogares, así como la presencia de caninos abandonados en las calles y la utilización de equinos como el principal medio de transporte urbano y 2) En Ciudad de La Habana: se combatía con medidas higiénico - sanitarias la presencia del vector del virus del dengue, derivándose de estas acciones, la puesta en marcha de prácticas sanitarias en el medio ambiente, entre ellas la eliminación de residuos sólidos y de basureros. Ambas situaciones provocaron el desplazamiento de los hospederos de mantenimiento de estos microorganismos y con ello la diseminación de las leptospiras, lo que produjo la infección en los humanos (hospederos accidentales), observándose de forma alarmante, el incremento de enfermos con signos y síntomas compatibles con la leptospirosis humana, que acudían a las unidades asistenciales de salud pública. Debido a estas emergencias, las autoridades del MINSAP, decidieron identificar por métodos microbiológicos, si la enfermedad era la causa que ocasionaron las situaciones epidemiológicas declaradas en cada región.

3.3.2.2. Universo de trabajo y muestras

La información general de los dos brotes analizados fue la siguiente:

Brote 1

En el período comprendido entre la cuarta semana de junio y la primera de julio de 1997, el LNRL recibió 220 sueros, 16 muestras de orina y cinco de sangre, todas obtenidas en 215 casos sospechosos de leptospirosis, procedentes de la Ciudad de Santa Clara, provincia de Villa Clara.

Brote 2

El LNRL recibió, desde el 1 de enero al 30 de junio de 2002, un total de 264 sueros y 20 muestras de sangre obtenidas en 264 casos sospechosos de leptospirosis, procedentes de varios municipios de Ciudad de La Habana (Habana del Este, 10 de Octubre, La Lisa, Playa, Habana Vieja, Cerro, Cotorro, Marianao y Guanabacoa).

3.3.2.3. Métodos

Para el estudio de los dos brotes epidémicos no fueron usadas las mismas técnicas microbiológicas. Sin embargo, sí se utilizó la técnica de referencia internacional de MAT (anexo 7), para la confirmación serológica los casos presuntivos; siguiendo las recomendaciones establecidas en el MOP de los años 1997 y 2002 del LNRL (IPK).

La metodología de diagnóstico rápido que se utilizó para el estudio del brote epidémico número 1 fue la RCP, técnica donde se usaron los cebadores Lep-1 y Lep-2, específicos para amplificar un fragmento de 631 pares de bases (pb) correspondientes al gen del ARN ribosomal 16S de *L. interrogans* (Hookey *et al.*, 1992). Esta técnica se aplicó en las muestras de orina. Los productos amplificados se identificaron por la hibridación de los ácidos nucleicos (Johansson, 1996), mediante la sonda de oligonucleótidos (Lin-2) complementaria a la región variable V-2 del mismo gen. Se usaron como controles positivos, los cultivos de las siguientes cepas patógenas de referencia: Pomona, Hond Utrech IV y RGA y como control negativo, la cepa Patoc I de *L. biflexa*, todas descritas en el MOP del LNRL, del año 1997. Mientras que, en el brote epidémico número 2, se utilizaron los sistemas serológicos rápidos LEPTO Dipstick y Lepto Tek Dri Dot (Smits *et al.*, 2000a y 2000b).

Se calcularon los porcentajes de positividad serológica para los casos de los brotes 1 y 2, eligiéndose el ensayo de MAT, como el sistema de referencia internacional. Además, se utilizó el paquete estadístico de Epidat versión 3.1, para calcular el índice de concordancia (con un intervalo de confianza del 95%) entre los sistemas rápidos y los métodos tradicionales utilizados en el brote 2.

3.3.3. Verificación de la existencia de casos de leptospirosis humana en una provincia seleccionada para aplicar la vacuna vax-SPIRAL[®] y su relación con los serogrupos de leptospiras circulantes

3.3.3.1. Antecedentes de la investigación

La confirmación epidemiológica, clínica y microbiológica del brote de leptospirosis humana en la Ciudad de Santa Clara, motivó que se intensificara la vigilancia microbiológica por parte del laboratorio en esta zona del país, por lo que fueron estudiados los casos sospechosos ocurridos en la provincia de Villa Clara y además se identificaron los principales serogrupos de leptospiras circulantes en esta región geográfica.

3.3.3.2. Universo de trabajo y muestras

Durante el período comprendido entre mayo de 1998 y septiembre de 1999, el LNRL del IPK recibió muestras clínicas obtenidas de 219 casos sospechosos de leptospirosis de toda la provincia de Villa Clara. Entre las muestras, se recibieron: 219 sueros pareados y 103 muestras de sangre inoculadas en el medio líquido EMJH (Levett, 2001).

3.3.3.3. Métodos

En particular, el estudio serológico de los casos sospechosos de leptospirosis se realizó por el sistema rápido de LEPTO Dipstick, un ensayo recomendado por Smits *et al* (2000a), así como, por los sistemas tradicionales de MAT (sistema de referencia internacional) y la técnica de HAT. Se realizó, además, el cultivo de las muestras (anexo 6) y la identificación de los aislamientos obtenidos (anexo 9). La confirmación final de los pacientes con leptospirosis, fue realizada tomando en consideración principalmente, los resultados de la MAT y el cultivo; siguiendo las recomendaciones establecidas en el MOP de los años 1998 y 1999 del LNRL (IPK). Para la identificación de los serogrupos de leptospiras correspondientes a los casos clínicos positivos de leptospirosis, se utilizaron las cepas que se describen en la tabla 2.

Se determinaron los porcentajes de positividad serológica obtenida por cada sistema utilizado, así como la distribución de los serogrupos de leptospiras identificados.

3.3.4. Desarrollo, evaluación y aplicación de un sistema autóctono de laboratorio, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana

3.3.4.1. Antecedentes de la investigación

Previa a esta investigación se realizaron los protocolos preliminares para la selección del mejor método de obtención del antígeno de leptospira, así como la conjugación óptima del conjugado y la mejor dilución del suero. Para medir la reproducibilidad y estabilidad de los biológicos se adaptaron los métodos utilizados en los estudios realizados en el LNRL, durante el desarrollo y evaluación de otros sistemas serológicos. Estas actividades, no están contempladas en el documento de tesis.

3.3.4.2. Desarrollo y evaluación de cinco sistemas de aglutinación con partículas de látex, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana

3.3.4.2.1. Universo de trabajo y muestras

Se estudiaron 771 sueros pertenecientes a 645 personas enfermas o sospechosas de leptospirosis, todos se obtuvieron en el período comprendido entre el 1^{ero} de enero de 2002 y el 30 de julio de 2004. Los sueros de los casos investigados se dividieron en tres grupos de estudio. Los controles positivos (Grupo I) se formó por 65 sueros de casos confirmados de leptospirosis y los negativos (Grupo II), incluyó 88 muestras obtenidas de “personas supuestamente sanas”, 12 casos de sífilis, 10 con meningoencefalitis aséptica por *enterovirus*, 10 de casos con toxoplasmosis, 16 de pacientes con dengue, 10 de casos con hepatitis B y 10 sueros pertenecieron a individuos con hepatitis C. El Grupo III estuvo integrado por 424 casos sospechosos, con evidencias epidemiológicas de leptospirosis y signos clínicos.

3.3.4.2.2. Métodos

Los casos controles positivos de leptospirosis, se confirmaron por la técnica serológica de MAT (sistema de referencia internacional), descrita en el MOP de 2004, del LNRL, IPK. Los sueros de los 88 individuos “supuestamente sanos” procedieron de donantes del Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de La Habana y fueron negativos a leptospirosis por las

III. Materiales y Métodos

técnicas de MAT y HAT. Los 12 casos positivos de sífilis se confirmaron por las pruebas no treponémicas de la reagina plasmática rápida (RPR) (Reactivos SPINREACT S.A., España), el Venereal Diseases Research Laboratory (VDRL), producido por HELFA[®] - Diagnósticos de Quimefa en Cuba y la prueba treponémica de hemoaglutinación del *Treponema pallidum* (HATP) (Human - Diagnostic Worldwide de Alemania); los 10 sueros positivos de los casos de meningoencefalitis aséptica por *enterovirus*, se confirmaron por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (MOP de 2004 del Laboratorio de *Enterovirus* del IPK), los 10 sueros positivos de toxoplasmosis se confirmaron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (MOP de 2004 del Laboratorio de Parasitología del IPK); los 16 sueros de los casos de dengue presentaron anticuerpos IgM mediante el ELISA de captura (diseñado en el IPK) y los 20 sueros de los individuos con hepatitis B y C se confirmaron, utilizando sus respectivos juegos diagnósticos de UMELISA - HBsAg y UMELISA anti - HCV, producidos por el CIE de La Habana, Cuba. La confirmación final de los 424 pacientes sospechosos de leptospirosis, fue realizada tomando en consideración, los resultados de la MAT; siguiendo las recomendaciones establecidas en el MOP de 2004, del LNRL (IPK). Estos casos y sus muestras procedían de diferentes hospitales clínicos - quirúrgicos de Ciudad de La Habana y algunos CPHEM de Cuba.

3.3.4.2.2.1. Cepas utilizadas

Se realizó una selección de las cepas de referencia de leptospiras y para la misma, se tuvo en consideración que fueran aquellas cepas que tuvieron una mayor circulación en Cuba durante el primer quinquenio de la década del 2000; su relación se presenta a continuación:

Cepas	Serovares	Serogrupos
M 20	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae
Hond Utrech IV	Canicola	Canicola
5 621	Mozdok	Pomona
M 84	Sejroe	Sejroe

Fuente: MOP del LNRL, IPK (2004).

Resulta necesario destacar que la cepa Castellón 3, del serogrupo Ballum, serovar Ballum, no se incluyó en el momento de realizar esta investigación, a pesar de circular también en nuestro medio, ya que la misma presentó dificultades en su cultivo.

3.3.4.2.2.2. Obtención del antígeno

Para la obtención del antígeno, las cepas de leptospira seleccionadas se cultivaron en el medio líquido EMJH (Difco, lote 141734), suplementado con ácidos grasos y albúmina bovina fracción V (AFAS). Cada cepa se cultivó, según el protocolo descrito en el MOP del LNRL de 2004. Al término de los 15 días, los cultivos se centrifugaron (ultracentrífuga HIMAC-HITACHI de Japón) a 32 800 g. en condiciones de refrigeración (4⁰ C), durante 2h. Cada sedimento se resuspendió en un tampón fosfato alcalino (TFS), con glicina pH 8,2 y se centrifugó de nuevo con las mismas condiciones. Este proceso se repitió tres veces; el sedimento final se resuspendió en TFS y se dejó reposar durante 1h a la temperatura del laboratorio (20-25⁰ C). Posteriormente, las células se inactivaron con formaldehído hasta alcanzar una concentración final de 0,5%. La mezcla se dejó reposar de nuevo 30 min a la temperatura del laboratorio (20-25⁰ C) y transcurrido ese período, se tomó de forma aséptica una gota de cada cultivo, la que se observó por microscopía en campo oscuro. El proceso de inactivación se consideró como exitoso, si la célula de leptospira perdía su movilidad. En aquellos casos donde se observaron células móviles, se añadió una cantidad similar de formalina y se repitieron los pasos descritos con anterioridad.

Una vez concluidos los pasos anteriores, la concentración de células se ajustó hasta alcanzar un valor de transmitancia entre 25 y 35%, mediante un fotolorímetro (CIBA-CORNIG 257, de EE.UU), con un filtro equivalente a una longitud de onda de 420 nm, valor que se hizo corresponder, con su equivalente en densidad óptica y se logró extrapolar en la curva de crecimiento para leptospiras (Hartskeerl *et al.*, 2008). Se estimó como óptima la concentración final de 10⁸ leptospiras por mL. De esta manera se establecieron los cuatro antígenos de serogrupos, cuya denominación se muestra a continuación:

III. Materiales y Métodos

Antígeno - Canícula
Antígeno - Icterohaemorrhagiae
Antígeno - Pomona
Antígeno - Sejroe

Una alícuota de 1 mL de cada uno de éstos cuatro antígenos, se mezcló a partes iguales, para formar un quinto antígeno denominado “antígeno - mezclado”

3.3.4.2.2.3. Conjugación de cada antígeno con las partículas de látex

El método original del acoplamiento de cada uno de los antígenos con las partículas de látex se realizó, según la modificación de Newman *et al* (1970) y Severin (1972). Se utilizaron partículas de látex azul (SIGMA[®]-EE.UU), de 0,8 µm de diámetro y a una concentración del 10% (peso/volumen) para el acoplamiento con cada antígeno de forma independiente. Por cada mL de antígeno se adicionaron 30 µL de látex, para lograr una concentración final de 3%. La conjugación se realizó durante 2h a 37⁰ C, manteniendo un movimiento giratorio permanente a 400 g. Durante el proceso, se evitó la formación de espuma. Posteriormente, se centrifugaron los conjugados a 18 800 g, durante 10 min, descartándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1 000 µL de TFS glicina (pH 8,2) con albúmina bovina (fracción V) al 1% (SIGMA) y se colocó durante 30 min a una temperatura de 37⁰ C, manteniéndose en movimiento giratorio permanente a 400 g. Se realizó otra centrifugación a 18 800 g. durante 10 min, eliminándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1 000 uL de TFS glicina (pH 8,2) con Tiomersal (1: 100 000). Para concluir este proceso, los productos finales se estabilizaron durante 24h a 4⁰ C. De esta manera se obtuvieron cinco conjugados de látex, cuya denominación se describe a continuación:

Látex N°	Denominación
N° 1	Látex-Canícula
N° 2	Látex-Icterohaemorrhagiae
N° 3	Látex-Pomona
N° 4	Látex-Sejroe
N° 5	Látex - mezclado

3.3.4.2.2.4. Evaluación de la reactividad, estabilidad y reproducibilidad de los sistemas látex

La reactividad de los conjugados látex, se evaluó de acuerdo con su capacidad para aglutinar los anticuerpos existentes en los sueros controles positivos y en los obtenidos de los casos sospechosos de leptospirosis. Para ello, se mezclaron en una lámina de cristal y de forma independiente, 10 uL de cada uno de los látex conjugados, con la misma cantidad de suero a investigar. La mezcla se homogenizó con un palillo desechable y se rotó de forma manual, por un tiempo máximo de 3 min. Se consideró como una reacción positiva, aquellos sueros donde se produjo una aglutinación franca y visible antes de transcurrir tres min. Por el contrario, se consideraron negativos, los sueros donde no se observó aglutinación en ese período.

La estabilidad en las condiciones del laboratorio se evaluó todos los meses durante un semestre. Para cumplimentar esta actividad, se utilizaron 10 sueros con altos títulos contra leptospiras (≥ 160) (controles positivos) y 10 negativos, todos se seleccionaron de forma aleatoria de las serotecas conservadas en el LNRL del IPK. Los sueros seleccionados se mezclaron con cada uno de los cinco conjugados de látex y el proceso de evaluación se realizó con intervalos de 30 días entre cada una de estas evaluaciones. Se valoró la disminución o pérdida del efecto aglutinante, sobre todo, en los sueros controles positivos.

Se evaluó también la reproducibilidad en las condiciones del laboratorio, todos los meses durante un semestre, con la participación de cinco analistas, personal que fue previamente entrenado en la metodología del látex descrita en este sub-capítulo. A cada una de los evaluadores se le entregaron cinco sueros (tres positivos y dos negativos); además, se les entregó el protocolo de trabajo para la realización de la prueba, observándose la coincidencia o discrepancia de los resultados obtenidos por cada operador.

3.3.4.2.2.5. Sistemas serológicos de referencia

Para comparar los conjugados látex obtenidos e investigados en este trabajo de tesis, se empleó la metodología comercial rápida Lepto Tek Dri Dot (lotes 010 y 011 de 2004 distribuidos por Organon Tecknika de Holanda) (Smits *et al.*, 2000b) y el sistema

serológico de referencia (MAT), según lo descrito en el MOP de 2004, del LNRL del IPK. La identificación de los serogrupos de leptospiras (anexo 9), correspondientes a los casos clínicos positivos, se realizó, utilizando las cepas descritas en la tabla 2.

3.3.4.2.2.6. Análisis estadístico

Fue confeccionada una base de datos en Microsoft Excel y los resultados se procesaron mediante el paquete estadístico Epi Info versión 5.0. Los sueros controles (positivos y negativos) se utilizaron para medir el valor diagnóstico de los conjugados de látex autóctonos, con respecto al método de referencia de MAT, y sus resultados sirvieron para calcular los porcentajes de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo, el índice de concordancia (validez), estimándose el intervalo de confianza (IC) del 95 % y el valor de $p \leq 0.05$. Fue utilizado además, el método paramétrico de Mac-Nemar para muestras independientes, con el objetivo de identificar diferencias significativas entre los porcentajes de positividad de los conjugados de látex elaborados en el IPK y el sistema de látex comercial Lepto Tek Dri Dot, estimándose el valor de $p \leq 0.05$.

3.3.4.3. Aplicación del mejor sistema de aglutinación con partículas de látex, al pesquisaje rápido de la leptospirosis humana

3.3.4.3.1. Universo de trabajo y muestras

Se pesquisaron, por el látex-mezclado, 82 y 10 sueros obtenidos de casos sospechosos de leptospirosis, asociados con otras dos situaciones epidémicas ocurridas, en las ciudades de Guantánamo y Santiago de Cuba durante el año 2005. Estos brotes se denominaron como brotes tres y cuatro, respectivamente. Además, se investigaron 446 sueros de casos sospechosos de leptospirosis (recibidos del hospital del IPK y de los CPHEM), los que se enviaron al LNRL (IPK), como parte de la vigilancia y el servicio técnico especializado de diagnóstico, desde el año 2005 y hasta finales de 2007.

3.3.4.3.2. Método

La evaluación del sistema látex-mezclado autóctono, se basó en la realización de una prueba cualitativa de aglutinación simple, un ensayo que fue capaz de detectar anticuerpos específicos dirigidos hacia el mosaico antigénico de células completas del complejo *L. interrogans sensu lato*.

El estuche estuvo integrado por tres reactivos:

Reactivo A: “látex-mezclado” (cantidad: 1 mL). Conservado a una temperatura entre 2 - 8° C.

Reactivo B: control positivo (cantidad: 0,5 mL). Suero con un alto título de anticuerpos (≥ 160) contra leptospiras.

Reactivo C: control negativo (cantidad: 0,5 mL). Suero sin título de anticuerpos contra leptospiras. Los reactivos B y C se conservaron a -20° C.

Para la realización de la prueba, se identificó cada suero problema, previa su inscripción en el libro de registro del LNR del IPK. Posteriormente, los reactivos A, B, C y los sueros de los casos sospechosos, se dejaron a la temperatura del laboratorio (20-25° C). El frasco del reactivo A y los reactivos B y C se homogenizaron individualmente, evitando en todo momento la formación de espuma. Se emplearon láminas portaobjetos de cristal limpias y sin grasa, con ocho círculos grabados de 1,5 cm de diámetro. Se depositó una alícuota de 10 uL, de la muestra problema en un círculo de la lámina y el resto del suero se congeló para otros estudios. Posteriormente, se depositaron y en círculos independientes, 10 μ L de los reactivos B y C. A todas las alícuotas de sueros se les añadió de forma individual, 10 μ L del reactivo A (látex-mezclado), se mezcló con un palillo de madera, en forma circular durante un tiempo no menor de 3 min y se procedió a la lectura del resultado.

Se consideró como una reacción positiva cuando se observó una aglutinación franca y visible del conjugado de látex, el que formó grumos blancos sobre un fondo coloreado de azul (figura 2). Mientras que, en la reacción negativa no se visualizó la reacción de aglutinación entre el suero y el conjugado látex (figura 3). En aquellos casos donde se

mantenía la sospecha clínica de una leptospirosis y existió un resultado negativo, por el “látex-mezclado”, se recomendó estudiar una segunda y tercera muestra de suero.

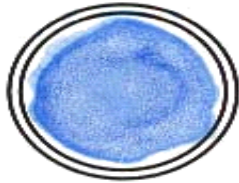


Fig. 2 Reacción positiva
por látex-mezclado

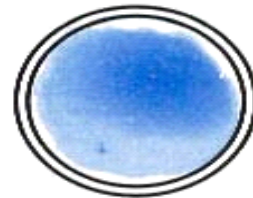


Fig. 3 Reacción negativa
por látex-mezclado

3.3.4.3.2. Sistema serológico de referencia

La confirmación serológica de los casos pesquisados se realizó por la técnica de referencia internacional (MAT), según lo descrito en el MOP del LNRL, IPK de los años 2005 y 2007. Para la identificación de los serogrupos de leptospiras (anexo 9), correspondientes a los casos clínicos positivos, se utilizaron las cepas descritas en la tabla 2.

Se realizaron tablas y se calcularon los porcentajes de positividad para los sistemas empleados, con respecto a la técnica de referencia utilizada (MAT).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y la discusión de este capítulo, se presentan en los acápites **4.1, 4.2, 4.3, y 4.4.**

4.1 Evaluación y aplicación de los sistemas serológicos rápidos, para el pesquiasaje de la leptospirosis humana en Cuba

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de los cuatro sistemas serológicos rápidos aplicados en esta investigación, para la pesquisa de la leptospirosis, utilizando los casos controles. Obsérvese que LEPTO Dipstick presentó los porcentajes de sensibilidad (92,86%), especificidad (90%) y concordancia (91,18%) más elevados. Los valores de Lepto Tek Lateral Flow fueron: 88,89; 85,5 y 86,84%, respectivamente y para el sistema SD Leptospira IgM/IgG se detectaron porcentajes más bajos de sensibilidad (89,29%), de especificidad (86,67%) y concordancia (87,93%). Cifras algo inferiores se observaron con Lepto Tek Dri Dot (85,71; 80 y 82,35%, respectivamente). Todos los sistemas serológicos evaluados mostraron porcentajes superiores del valor predictivo negativo con respecto al positivo.

El valor diagnóstico más fiable lo mostró el sistema LEPTO Dipstick ($LR+ = 9,29$ y $LR- = 0,08$), siguiéndole la técnica SD Leptospira IgM/IgG ($LR+ = 6,70$ y $LR- = 0,12$). Por su parte, los sistemas Lepto Tek Lateral Flow y Lepto Tek Dri Dot mostraron ser semejantes en cuanto a este criterio ($LR+ = 5,93$ y $LR- = 0,13$; $LR+ = 4,29$ y $LR- = 0,18$, respectivamente).

IV. Resultados y Discusión

Tabla 3. Evaluación de los sistemas serológicos rápidos utilizando sueros de los casos controles, para la pesquisa de leptospirosis humana

Parámetros	Sistemas							
	<u>LEPTO Dipstick</u>		<u>Lepto Tek Lateral Flow</u>		<u>SD Leptospira IgM/IgG</u>		<u>Lepto Tek Dri Dot</u>	
Sensibilidad % (n +/ n total +)	92,86 (13/14)		88,89 (16/18)		89,29 (25/28)		85,71 (12/14)	
IC	75,80	100,00	71,59	100,00	76,04	100,00	63,81	100,00
VPP + % (n +/total + por el sistema evaluado)	86,67 (13/15)		84,21 (16/19)		86,21 (25/29)		75 (12/16)	
IC	66,13	100,00	65,18	100,00	71,93	100,00	50,66	99,34
Especificidad % (n -/ n total -)	90 (18/20)		85,5 (17/20)		86,67 (27/30)		80 (16/20)	
IC	74,35	100,00	66,85	100,00	72,84	100,00	59,97	100,00
VPN - % (n -/total - por el sistema evaluado)	94,74 (18/19)		89,47 (17/19)		89,66 (26/29)		88,89 (16/18)	
IC	82,06	100,00	73,04	100,00	76,85	100,00	71,59	100,00
Concordancia % (+ y - / n total)	91,18 (31/34)		86,84 (33/38)		87,93 (51/58)		82,35 (28/34)	
IC	80,17	100,00	74,78	98,91	78,69	97,18	68,07	96,64
Índice de Kappa	0,83		0,74		0,76		0,66	
IC	0,64	1,02	0,53	0,95	0,59	0,93	0,40	0,91
LR+	9,29		5,93		6,70		4,29	
IC	2,47	34,86	2,06	17,04	2,67	16,83	1,74	10,56
LR -	0,08		0,13		0,12		0,18	
IC	0,01	0,53	0,03	0,49	0,04	0,36	0,05	0,66

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); n: casos; +: positivos; -: negativos; %: porcentaje; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; LR+: razón de verosimilitud positiva; LR-: razón de verosimilitud negativa; IC: intervalo de confianza del 95% para una $p \leq 0,05$

Desde el año 1997, Gussenhoven *et al.*, describen al método LEPTO Dipstick como uno de los sistemas diagnósticos más útiles para el pesquiasaje de la leptospirosis. Otros

IV. Resultados y Discusión

investigadores como Sehgal *et al.*, en la República de la India, se refieren también a las ventajas técnicas que ofrece este sistema para el diagnóstico rápido, propiedades inalcanzables por otros importantes métodos serológicos convencionales (ELISA-IgM y MAT) (Gussenhoven *et al.*, 1997; Sehgal *et al.*, 1999a).

En el estudio realizado por Gussenhoven *et al.*, se describe a LEPTO Dipstick como un método que proporciona una sensibilidad y especificidad entre 86,8 a 92,7%, respectivamente, cuando se le compara con la técnica de ELISA-IgM. La concordancia entre ambos métodos fue de 88,7% (Gussenhoven *et al.*, 1997). Mientras que, para Sehgal *et al.*, LEPTO Dipstick muestra valores de 78,7% (sensibilidad), 88,3% (especificidad) y 78% (concordancia) inferiores (Sehgal *et al.*, 1999a). Con el empleo de LEPTO Dipstick en esta tesis, los resultados obtenidos tuvieron valores superiores de sensibilidad (92,86%) y concordancia (91,18%), cuando se utilizaron los casos controles. La especificidad de esta técnica (90%) mostró un valor inferior al descrito por Gussenhoven *et al.*, (92,7%) y superior al señalado por Sehgal *et al.* (88,3%) (Gussenhoven *et al.*, 1997; Sehgal *et al.*, 1999a).

Existen dos evaluaciones multicéntricas que demuestran la utilidad del LEPTO Dipstick para el pesquaje de la leptospirosis. La primera involucra 2 665 sueros obtenidos en 2 057 pacientes sospechosos de leptospirosis procedentes de 12 países (regiones con variados grados de endemidad y diferentes sistemas de vigilancia). Entre 485 casos con aislamiento y serología positiva por la técnica de MAT, LEPTO Dipstick identificó 87,4% de sueros positivos, con una especificidad de 92,7% (Smits *et al.*, 1999). La concordancia entre el sistema rápido y la técnica de MAT es de 93,2%. En cuanto al porcentaje de sensibilidad obtenido en esta tesis, se constató que el valor obtenido en los casos controles, fue superior al notificado por Smits *et al* (1999). Mientras que, la especificidad y la concordancia mostraron resultados inferiores a los descritos por ese autor. En la tesis, se aplicaron los criterios normados por la OMS y las recomendaciones de Faine *et al* (2003) para definir los casos controles positivos. Al respecto, se utilizaron las técnicas tradicionales reconocidas en el ámbito internacional, métodos que establecen de forma estricta los parámetros a seguir para definir un caso positivo de leptospirosis (anexos 7 y 8).

IV. Resultados y Discusión

La segunda evaluación internacional del LEPTO Dipstick se realiza en el año 2000, en un trabajo que involucró a 27 laboratorios de 23 países y estudió 873 sueros obtenidos de 711 pacientes, divididos en: 329 casos de leptospirosis confirmados (por aislamiento y serología), así como a 239 no confirmados (Smits *et al.*, 2000a). El estudio incluyó también 69 pacientes con fiebre hemorrágica de etiología viral. La sensibilidad del sistema rápido fue de 84,5% en los sueros colectados antes del 10^{mo} día posterior a la aparición de los primeros síntomas y de 92,1% en los obtenidos después del 10^{mo} y hasta el 30^{mo} día. Por su parte, la especificidad presentó un comportamiento similar, incrementando su valor desde 87,5 a 94,4%, en ambos grupos de muestras. La concordancia entre el sistema rápido y la técnica de referencia (MAT) del estudio de Smits fue de 84%. Los resultados de la sensibilidad y concordancia obtenidos en esta tesis fueron similares o superiores a los descritos por Smits *et al* (2000a). Mientras que, el porcentaje correspondiente a la especificidad fue inferior (90%) a la notificada por ese autor (94,4%).

Bafani *et al.*, combinan el ensayo LEPTO Dipstick con las técnicas de HAT, el ELISA-IgM y el Dot-ELISA-Dipstick, observando que la sensibilidad de estos sistemas muestra valores de 83,6, 67,2, 75 y 93,5%, respectivamente. En general, este parámetro es mayor en las muestras de suero obtenidas después del 10^{mo} día del inicio de los síntomas, coincidiendo así, con los resultados de esta tesis. No se pudieron comparar los resultados de la especificidad y concordancia con los de Bafani *et al.*, ya que los mismos no aparecen descritos en su investigación (Bafani *et al.*, 2003).

En el año 2006 realizan en la India, una investigación que analiza al ensayo LEPTO Dipstick como un método rápido para el pesquisaje de la leptospirosis humana. En ese trabajo, detectan una sensibilidad y especificidad de 78,5 y 88,3%, respectivamente (Vijayachari y Sehgal, 2006). En ambos parámetros, los resultados de esta tesis superaron los valores publicados por los investigadores del Consejo Indio de Investigaciones Médicas (ICMR). Cifras inferiores de sensibilidad (82%) y especificidad (88%) se describen también en Tailandia cuando evalúan al ensayo LEPTO Dipstick para el pesquisaje de la leptospirosis y el dengue (Cohen *et al.*, 2007).

IV. Resultados y Discusión

La sensibilidad del Lepto Tek Lateral Flow en este trabajo de tesis, superó los valores descritos por Smits *et al.* (85,8%), Sehgal *et al.* (86%) y Vijayachari y Sehgal (82,6%) (Smits *et al.*, 2001a; Sehgal *et al.*, 2003; Vijayachari y Sehgal, 2006). Sin embargo, la especificidad fue inferior a la observada por Smits *et al.* (93,8%), Eapen *et al.* (93,6%), Vijayachari y Sehgal (95,2%) y Goris *et al.* (93%) (Smits *et al.*, 2001a; Eapen *et al.*, 2002; Vijayachari y Sehgal, 2006; Goris *et al.*, 2009). El índice de concordancia coincide con Sehgal *et al.* (86%), aunque fueron inferiores a los valores definidos por Smits *et al.* (91,9%) y Eapen *et al.* (94,3%) (Smits *et al.*, 2001a; Eapen *et al.*, 2002; Sehgal *et al.*, 2003).

No se encontró en la literatura revisada, alguna publicación que mostrara resultados sobre evaluaciones del método SD Leptospira IgM-IgG para el pesquisaje rápido de la leptospirosis, quizás, por ser el mismo, el sistema de diagnóstico más moderno y el menos divulgado entre todos. Se conoce, que además de Cuba, otros países centroamericanos (Honduras, Guatemala y República Dominicana) lo incorporan en la red de laboratorios de salud pública.

Lepto Tek Dri Dot es el sistema comercial más conocido en nuestro medio y está diseñado para la pesquisa rápida de leptospirosis humana en las muestras de sueros (Smits *et al.*, 2001b). Los porcentajes de sensibilidad (85,71%) y especificidad (80%) obtenidos en esta investigación fueron similares a los descritos por Vijayachari *et al.* (85,5 y 80%, respectivamente), Hull-Jackson *et al.* (88 y 81%, respectivamente) y Cohen *et al.* (81,5 y 81%, respectivamente). Aunque, el porcentaje de la sensibilidad (85,71%) de nuestra tesis, fue inferior al notificado por Dohe *et al.* (96,6%) y Goris *et al.* (98%). Cuando se comparó, el índice de concordancia alcanzado por Lepto Tek Dri Dot en la tesis, tomando en consideración los resultados de otros autores, este parámetro fue también inferior al señalado en dos trabajos de Smits *et al.* (2000 = 89,4% y 2001 = 92,6%) y Vijayachari *et al.* (89,5%), pero superaron a los resultados publicados por Dohe *et al.* (78%) (Smits *et al.*, 2000b; Smits *et al.*, 2001b; Vijayachari *et al.*, 2002; Hull-Jackson *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2007; Dohe *et al.*, 2009; Goris *et al.*, 2009).

IV. Resultados y Discusión

El porcentaje de reacciones cruzadas descritas para estos sistemas serológicos rápidos suele ser bajo. Los trabajos revisados, identifican la presencia de reacciones cruzadas en los sueros obtenidos de algunos pacientes con sífilis, hepatitis B, HIV, así como en individuos con *hantaviriosis* y la enfermedad de Lyme. Estos hallazgos se describen en estudios realizados en poblaciones de diferentes regiones geográficas (Gussenhoven *et al.*, 1997; Smits *et al.*, 1999, 2000a; Sehgal *et al.*, 2003). En sentido general, el número de casos controles negativos utilizados en esta tesis, fue inferior a los encontrados en la literatura científica internacional. Los pacientes cubanos tenían patologías confirmadas por técnicas de referencia, las que identifican otros agentes etiológicos (el virus del dengue, de la hepatitis, algunas *enteroviriosis* y al agente etiológico de la sífilis). Todo caso que muestre un resultado positivo, por los sistemas serológicos rápidos diseñados para la pesquisa rápida de leptospirosis, tiene que ser confirmado por la técnica de referencia internacional establecida por la OMS y la ILS para el diagnóstico de la leptospirosis humana. Las reacciones cruzadas detectadas en esta pequeña población de casos negativos cubanos, no indicó un resultado significativo que sirviera para realizar estimaciones reales, tal como se refiere en los trabajos referenciados.

Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) que se observaron en los sistemas serológicos rápidos evaluados en esta tesis, exceptuando el VPP de 75% descrito para el Lepto Tek Dri Dot, superaron el 80%. Se constató correlación entre éstos y los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos para cada técnica. Hallazgos similares se describen en la literatura consultada (Smits *et al.*, 2000a y b; Smits *et al.*, 2001b; Vijayachari *et al.*, 2002, Hull-Jackson *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2007; Dohe *et al.*, 2009; Goris *et al.*, 2009).

Se constató la fiabilidad diagnóstica de los cuatro sistemas serológicos comerciales usados para la pesquisa de leptospirosis humana, destacándose en particular el LEPTO Dipstick y el SD Leptospira IgM-IgG, según muestran los resultados de la tabla 3 y existió un sustancial grado de acuerdo o reproducibilidad (índice de Kappa en el rango desde 0,61 y hasta 0,80) para todos los sistemas rápidos, siendo casi perfecto para el LEPTO Dipstick (0,83).

IV. Resultados y Discusión

En la tabla 4 se presentan los resultados del pesquisaje de anticuerpos contra las leptospiras en los casos clínicos (grupo III), mediante la utilización de los sistemas serológicos rápidos. Obsérvese que los ensayos LEPTO Dipstick y Lepto Tek Lateral Flow mostraron valores de positividad iguales o superiores al 93,62%. Mientras que, con el sistema SD Leptospira IgM/IgG y Lepto Tek Dri Dot, los porcentajes estuvieron comprendidos entre 82,36 y 87,50%, respectivamente. La sensibilidad de los sistemas LEPTO Dipstick y Lepto Tek Lateral Flow, fue mayor que la correspondiente a la que se obtuvo con SD Leptospira IgM/IgG y Lepto Tek Dri Dot.

Tabla 4. Porcentajes de positividad identificados por los sistemas serológicos rápidos en los sueros de los casos sospechosos de leptospirosis

	Sistemas			
	<u>LEPTO Dipstick</u>	<u>Lepto Tek Lateral Flow</u>	<u>SD Leptospira IgM/IgG</u>	<u>Lepto Tek Dri Dot</u>
Positividad %	95	93,62	82,36	87,50
(n+/ n total)	(38/40)	(44/47)	(28/34)	(35/40)

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); n: casos; +: positivos; %: porcentaje

Entre los casos clínicos incluidos en este trabajo, no hubo aislamientos de leptospiras, ni se les extrajo (a la mayoría de los individuos) un segundo suero. Estos pacientes tuvieron una evolución clínica promedio entre 6 a 7 días, después de iniciados los primeros síntomas y signos de la enfermedad y todos cumplieron con la condición, de que las muestras (sueros) se extrajeran durante el estadio crítico de la infección, lo que permitió detectar, por los diferentes sistemas ensayados en la tesis, la presencia de IgM específicas contra leptospiras.

La tabla 5 muestra los serogrupos de leptospiras identificados por los diferentes sistemas rápidos utilizados en los casos clínicos positivos. Obsérvese que, a pesar de no haber pesquisado por cada sistema el mismo número de casos, los porcentajes pertenecientes a los serogrupos Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae predominaron en los resultados obtenidos con LEPTO Dipstick y Lepto Tek Lateral Flow. El serogrupo no patógeno

IV. Resultados y Discusión

Semarang, mostró un mayor porcentaje (82,15%) en los casos positivos por SD Leptospira IgM/IgG. De igual forma, predominó el serogrupo Sejroe (57,15%) en los pacientes positivos por el ensayo Lepto Tek Dri Dot.

Tabla 5. Serogrupos de leptospirosis identificados por la técnica de MAT en los casos clínicos de leptospirosis diagnosticados por los sistemas rápidos

Sistemas (cepa, serogrupo, serovar de la especie utilizada)	Serogrupo				
	C	Po	I	S	Se
	Positividad % (n+/ n total)				
<u>LEPTO DipStick</u> (Patoc I, Semarang, Patoc de <i>Leptospira biflexa</i>)	42,11 (16/38)	39,48 (15/38)	18,43 (7/38)	-	Nr
<u>Lepto Tek Lateral Flow</u> (Patoc I, Semarang, Patoc de <i>Leptospira biflexa</i>)	36,37 (16/44)	54,55 (24/44)	9,09 (4/44)	-	Nr
<u>SD Leptospira IgM/IgG</u> (Patoc I, Semarang, Patoc de <i>Leptospira biflexa</i>)	-	-	17,86 (5/28)	-	82,15 (23/28)
<u>Lepto Tek Dri Dot</u> (Lely 607, Sejroe, Hardjo de <i>L. interrogans</i>)	28,58 (10/35)	-	14,29 (5/35)	57,15 (20/35)	Nr

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); n: casos; %: porcentaje; +: positivo; -: ninguno; Nr: no realizada; C: Canicola; Po: Pomona; I: Icterohaemorrhagiae; Se: Semarang

En las evaluaciones de los sistemas Lepto Tek Lateral Flow y Lepto Tek Dri Dot realizadas por Smits *et al.*, se identificaron los serogrupos de leptospirosis presentes en los pacientes positivos. En estos trabajos y con respecto al primer sistema, se identifican como predominantes a los siguientes serogrupos: Australis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Pomona, Sejroe, Shermani, Tarassovi y el segundo se detectan: Australis, Bataviae, Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Shermani, Grippytyphosa, y Tarassovi, estos resultados mostraron la amplia reactividad existente en los sistemas serológicos analizados (Smits *et al.*, 2001a y 2001b).

Se sabe que los sistemas LEPTO Dipstick, Lepto Tek Lateral Flow y SD Leptospira IgM/IgG, están integrados por la cepa no patógena Patoc I, del serogrupo Semarang, serovar Patoc, mientras que el Lepto Tek Dri Dot, está constituido por la cepa Lely del serogrupo Sejroe, serovar Hardjo. Basándonos en los resultados de esta tesis, se debe destacar el alto porcentaje de casos clínicos positivos por SD Leptospira IgM-IgG y Lepto Tek Dri Dot identificados por la técnica de MAT frente a las cepas Patoc I (80%), del serogrupo Semarang, serovar Patoc y Lely (50%) del serogrupo Sejroe, serovar Hardjo, respectivamente, lo que muestra la amplia reactividad de estos sistemas en las muestras obtenidas de los pacientes cubanos.

4.2. Identificación de la infección por leptospiras en los casos asociados con dos brotes epidémicos ocurridos en Cuba

Brote 1

La organización de un grupo multidisciplinario, por parte de las autoridades del MINSAP, es la primera medida que se utiliza para confirmar la existencia de un brote de leptospirosis humana en la Ciudad de Santa Clara, provincia de Villa Clara.

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos en el estudio microbiológico de los casos asociados con el brote 1. En los pacientes que se hospitalizaron, se confirmaron por la técnica de HAT y la de referencia (MAT), 9 de los 13 casos investigados (69,23%). Prevalció el serogrupo Canicola (38,47%), seguido por Pomona e Icterohaemorrhagiae, ambos con el mismo porcentaje (15,39%). Mientras que, por cultivo, el serogrupo Ballum se confirmó en el 40% (2/5) de los casos.

IV. Resultados y Discusión

Tabla 6. Resultados obtenidos por las técnicas serológicas y el cultivo de las muestras de los casos hospitalizados, con sospecha de leptospirosis, correspondientes al brote 1

Casos (n)	Sistemas	Serogrupos			
		B	C	Po	I
		Positividad % (n +/ n total)			
Hospitalizados (13)	Cultivo	40 (2/5)	-	-	-
	MAT	-	38,47* (5/13)	15,39 (2/13)	15,39 (2/13)
	HAT	69,23 (9/13)			

HAT: hemoaglutinación indirecta; MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); n: casos; %: porcentaje; -: ninguno; *: incluye a los dos fallecidos; B: Ballum; C: Canicola; Po: Pomona; I: Icterohaemorrhagiae

La cantidad de pacientes ambulatorios sospechosos de leptospirosis superó a la encontrada con respecto a los hospitalizados. La MAT no se utilizó para confirmar los casos ambulatorios. En este sentido el 5,45% (11/202) de los casos que recibieron los servicios ambulatorios, se confirmaron por la técnica de HAT, mostrando la mayoría títulos elevados (≥ 160), incluyendo a los dos pacientes fallecidos.

De manera general, dentro de los individuos hospitalizados y aquellos con un tratamiento ambulatorio, asociados con el brote 1, se detectó que, por las técnicas serológicas se confirmaron como casos positivos de leptospirosis un 9,31% (20/215). Mientras que, por el cultivo se identificó al serogrupo Ballum en 40% de los pacientes hospitalizados. Tres cultivos (60%) no se lograron aislar, a pesar de los múltiples esfuerzos realizados.

El 12,5% (2/16) de las muestras de orina estudiadas entre los casos ambulatorios fueron positivas por el método rápido de la RCP, utilizando los cebadores de Hookey *et al.* (1992) y la hibridación de los ácidos nucleicos (Hookey, 1992 y Johansson, 1996). Entre estos pacientes, cinco (31,25%) se confirmaron por técnicas serológicas (MAT o HAT).

IV. Resultados y Discusión

Los procedimientos técnicos realizados en la tesis, para la liberación del ADN genómico tanto por la RCP como por la hibridación de los ácidos nucleicos, fueron sencillos y prácticos (Hookey, 1992 y Johansson, 1996). Particularmente, la sonda Lin-2, constituye una secuencia no descrita en la literatura hasta este momento, para diferenciar las cepas de leptospiras patógenas de las no patógenas. Esta sonda se diseñó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de Cuba y demuestra su alta especificidad en los estudios para diferenciar las cepas de *Micoplasma gallisepticum* y *Micoplasma synoviae* (Fernández *et al.*, 1993).

En los resultados de esta investigación, la RCP mostró una baja sensibilidad (2/5), cuando se estudiaron las muestras de orina de los pacientes ambulatorios confirmados con leptospirosis. Este comportamiento pudo estar influenciado por algunos factores, en primer lugar, la orina no está recomendada como una muestra ideal para el cultivo y el aislamiento de leptospiras en los casos que cursan con una fase clínica de leptospirúrica e inmune (Faine *et al.*, 2003). No obstante, en la literatura revisada, existe un trabajo que valida el uso de esta muestra en la RCP, para el diagnóstico temprano (fase de leptospiremia) de la leptospirosis humana (Levett, 2001). En segunda instancia, la orina como producto patológico, debe trasladarse de forma inmediata al laboratorio para utilizarse en cualquiera de los métodos de diagnóstico. En el caso de las muestras de orina investigadas en esta tesis, para poder hacer su procesamiento técnico se transportaron desde la Ciudad de Santa Clara, ubicada en el centro del país, hasta el LNRL. Sin embargo, a pesar de que se cumplieron las precauciones requeridas, la orina puede poseer inhibidores que lisan con facilidad a las leptospiras, además existen enzimas (nucleasas) que actúan directamente sobre el ADN genómico de la bacteria y son capaces de desnaturalizarlo (Levett, 2001). Por último, debe considerarse que el tratamiento con dosis elevadas de antimicrobianos durante la fase de leptospiremia, reduce la multiplicación celular en la sangre y hace más difícil la eliminación, por la orina, de las células de leptospiras intactas o algunos de sus productos (Faine *et al.*, 2003; Levett, 2001). Los pacientes relacionados con la situación epidémica de Villa Clara, se trataron con antibióticos específicos para leptospiras. Todos estos elementos pudieron incidir en la baja positividad detectada por la RCP que se realizó en este trabajo de tesis.

IV. Resultados y Discusión

La demostración directa o indirecta de las leptospiras en los casos confirmados, permitió la ejecución de un plan emergente por parte de las autoridades del MINSAP, este organismo estableció medidas para mejorar las condiciones higiénico - sanitarias de la población, así como para establecer estrategias dirigidas a la prevención y el control de la leptospirosis en el territorio de Villa Clara.

Brote 2

El primer resultado de esta investigación se relacionó con la activación del LNRL del IPK, como una unidad rectora de la vigilancia microbiológica sobre la leptospirosis humana en Cuba, unidad que se vinculó muy de cerca, con las áreas asistenciales y epidemiológicas, así como con las diversas instituciones nacionales, para dar respuesta de la confirmación microbiológica de los casos involucrados en esta situación epidemiológica.

La tabla 7 muestra la positividad que se obtuvo con los sistemas serológicos ensayados para la identificación de los casos asociados con el brote 2. Obsérvese, como a pesar de no haber estudiado el mismo número de casos por los cuatro sistemas, LEPTO Dipstick detectó el mayor porcentaje de muestras positivas.

Tabla 7. Resultados positivos obtenidos por las técnicas serológicas en los casos con sospecha de leptospirosis, correspondientes al brote 2

Sistemas	Casos estudiados				
	Total	Positivos		Reactivos	
		n	%	n	%
<u>LeptoTek Dri Dot</u>	118	39	33,05	-	-
<u>LEPTO Dipstick</u>	83	35	42,16	-	-
HAT	264	18	6,81	16	6,06
MAT	140	23	16,42	14	10

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); HAT: hemoaglutinación indirecta; n: casos; %: porcentaje; -: ninguno

IV. Resultados y Discusión

El índice de concordancia entre los sistemas rápidos (LEPTO Dipstick y Lepto Tek Dri Dot) y la técnica de referencia utilizada (MAT) fue de 81% (67/83) y 85% (100/118), respectivamente. Mientras que, el índice de concordancia entre los mismos sistemas rápidos y la técnica tradicional (HAT) fue de 75% (62/83) para LEPTO Dipstick y 79% (93/118) para Lepto Tek Dri Dot (figura 4).

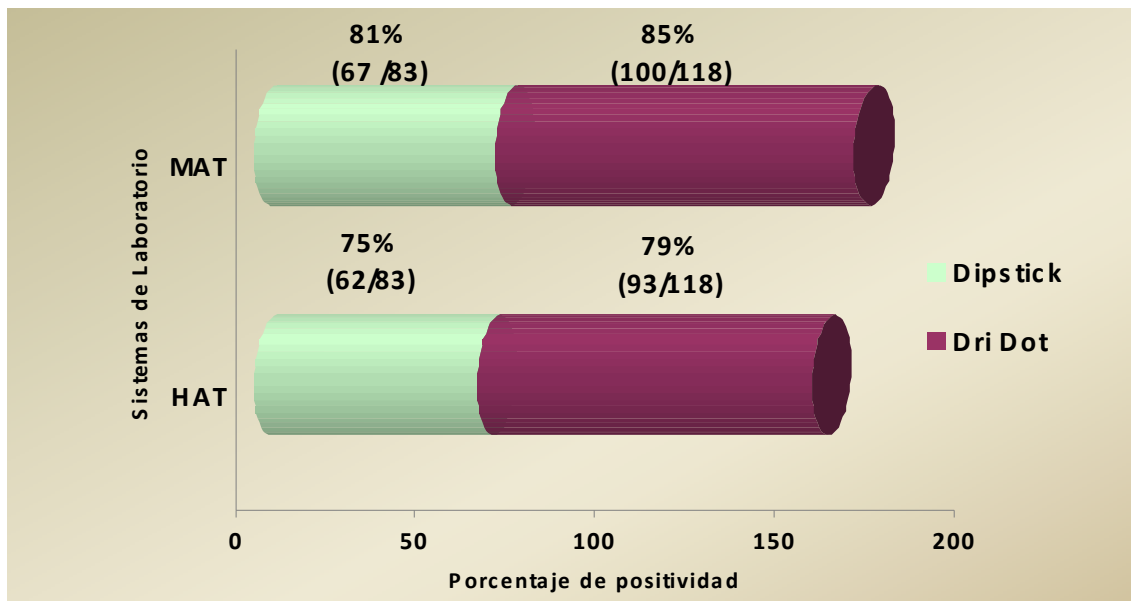


Figura 4. Correspondencia entre los resultados obtenidos por los sistemas rápidos (LEPTO Dipstick y Lepto Tek Dri Dot) y las técnicas de MAT y HAT

Existió correspondencia entre un título elevado obtenido por MAT (≥ 640) y por HAT (≥ 80) y el hallazgo de la mayoría de los casos positivos por LEPTO Dipstick y Lepto Tek Dri Dot (tabla 8).

IV. Resultados y Discusión

Tabla 8. Relación entre el título serológico detectado y la positividad obtenida por los sistemas rápidos en los casos de leptospirosis del brote 2

Sistemas	Títulos												
	MAT (n = 37)						HAT (n = 34)						
	20	40	80	160	320	≥640	10	20	40	80	160	320	≥640
<u>Lepto Tek Dri Dot (+)</u>	8	2	4	7	7	9	4	4	7	8	4	4	3
<u>LEPTO Dipstick (+)</u>	3	2	3	7	6	8	5	2	6	8	4	4	2

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); HAT: hemoaglutinación indirecta; n: casos; +: positivo

La aplicación de los métodos serológicos (rápidos y tradicionales) permitió confirmar el 12,5% (33/264) de los casos asociados con el brote 2. Mientras que, por cultivo se diagnosticó el 20% de los pacientes.

Los serogrupos de leptospiras identificados en los 33 casos confirmados por la técnica de MAT (positivos por LEPTO Dipstick y Lepto Tek Dri Dot) y los cuatro pacientes ratificados por el cultivo, se muestran en la tabla 9. El serogrupo Ballum predominó en 50% (2/4) de las muestras cultivadas; mientras que, por las técnicas serológicas fueron los serogrupos Canicola (51,52%) y Sejroe (27,28%) los más frecuentes. No obstante, ellos se identificaron también por cultivo, aunque con porcentajes inferiores (25%). Además, por la técnica de MAT, se observaron resultados positivos a los serogrupos Pomona (6,06%), Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes, estos dos últimos con el mismo valor de identificación (3,03%).

Tabla 9. Serogrupos identificados por el cultivo y las técnicas serológicas en los casos de leptospirosis confirmados, correspondientes al brote 2

Sistemas	Serogrupo					
	B	S	C	Po	I	P
	Positividad % (n +/total +)					
Cultivo	50 (2/4)	25 (1/4)	25 (1/4)	-	-	-
MAT	9,09 (3/33)	27,28 (9/33)	51,52 (17/33)	6,06 (2/33)	3,03 (1/33)	3,03 (1/33)

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); n: casos; %: porcentaje; +: positivo; -: ninguno; B: Ballum; S: Sejroe; C: Canicola; Po: Pomona; I: Icterohaemorrhagiae; P: Pyrogenes

La patogenia de la leptospirosis es poco comprendida y los hallazgos científicos existentes hasta la fecha, sólo han podido liderar el desarrollo de algunas estrategias eficaces dirigidas a la prevención y el control de esta entidad clínica (Bolin, 2000; Levett, 2001).

Para los países pobres, la leptospirosis constituye una patología que ocasiona daños graves en los humanos y provoca también pérdidas significativas en la esfera socioeconómica. Esta incomprensión, requiere de la cooperación y los esfuerzos para prevenir el aumento de la incidencia de la enfermedad, así como, profundizar en el conocimiento de su agente etiológico (Ginebra, 2001; Levett, 2001; Barochi *et al.*, 2001).

Pocas veces, los métodos tradicionales utilizados en el laboratorio para la caracterización de los brotes epidémicos de leptospirosis, permiten identificar directamente las leptospiras a partir de las muestras clínicas, a no ser que se logre su aislamiento o identificación (Sehgal *et al.*, 2002b). El éxito del aislamiento es bajo cuando se le compara con la respuesta obtenida mediante los métodos serológicos. El tiempo que se consume en el aislamiento, la identificación y la clasificación es mayor. Por otro lado, la RCP constituye un método laborioso, costoso y que requiere de un equipamiento sofisticado. El éxito de esta tecnología

IV. Resultados y Discusión

dependerá, sobre todo, del tipo de muestra utilizada en el ensayo y de su vinculación con el momento de la fase clínica por la que transita el paciente sospechoso. Mientras que, los métodos serológicos, por su rapidez y factibilidad, mantienen su vigencia en la caracterización de estos eventos epidemiológicos (Sehgal *et al.*, 2002b; Sharma *et al.*, 2003).

La confirmación de los casos correspondientes a los dos brotes ocurridos en Cuba y descritos en esta investigación, se realizó principalmente por pruebas serológicas, incluyendo los sistemas rápidos. La técnica de MAT brindó una información útil sobre la presunta etiología responsable de la infección en los casos graves y del fallecimiento de los dos pacientes del brote 1. Por su parte, el cultivo, también brindó una información valiosa para la confirmación de ambas situaciones epidémicas y permitió identificar las cepas que infectaron a los pacientes y que circulaban en las regiones estudiadas. En estos estudios no existieron lamentablemente, casos positivos coincidentes por serología y por cultivo.

La respuesta diagnóstica ofrecida por los sistemas rápidos fue significativa y permitió una orientación oportuna y la toma adecuada de decisiones terapéuticas. Los serogrupos de leptospiras identificados en los casos positivos, coincidieron con los descritos por otros autores (Sehgal *et al.*, 1999a y 1999b, 2000 y 2002b; Sharma *et al.*, 2003).

La positividad detectada en las pruebas serológicas realizadas a los casos de los brotes epidémicos 1 (9,3%) y 2 (12,5%), coincidió con la descrita por Sehgal *et al.* y Sharma *et al.* en la India (9,1%, respectivamente) (Sehgal *et al.*, 1999a y 1999b, 2000 y 2002b; Sharma *et al.*, 2003).

Una comunicación científica realizada en la India describe el estudio de un brote epidémico de leptospirosis ocurrido en las tribus indígenas de las islas Adamán y Nicobar, región con un alto nivel de exposición al medio ambiente contaminado con leptospiras. Ese estudio, en particular, investiga la seroprevalencia de leptospirosis por la técnica de MAT en 1 557 sueros. El artículo puntualiza que, en las técnicas serológicas observan 19,1% de positividad. Las tasas de seroprevalencia se relacionan con la edad, alcanzando su pico

IV. Resultados y Discusión

máximo en los individuos con edades comprendidas entre 21 a 40 años y con un predominio del sexo masculino. Mientras que, al realizar la seroagrupación, señalan como prevalentes a los serogrupos Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Canicola (Sehgal *et al.*, 1999b). En esta tesis los valores detectados en los ensayos serológicos fueron inferiores al descrito por Sehgal *et al.* (Sehgal *et al.*, 1999b). En este sentido se observó, que los resultados se correspondieron con los descritos en la India (Sehgal *et al.*, 1999b).

Otro estudio clínico y epidemiológico realizado en la ciudad de Port Blair, capital administrativa de Adamán, la India, señala en 80 casos hospitalizados, con una sospecha clínica de leptospirosis, 73% de positividad (58/80) mediante las técnicas de MAT y IgM-ELISA. Aunque, el estudio refiere también la realización del cultivo, no obtienen aislamientos de leptospirosis. Este evento permite mejorar el conocimiento clínico-patológico, así como las anomalías bioquímicas y la importancia del pronóstico de la leptospirosis humana en esa región (Singh *et al.*, 1999). Al comparar nuestros resultados con los descritos por esos autores, se constató que ellos describen una positividad mayor en ambas pruebas serológicas.

En otro brote de leptospirosis ocurrido en una escuela primaria, se detecta 23,6% de positividad con los métodos serológicos utilizados. Sobre todo, entre los casos con sueros negativos, alumnos donde la prevalencia de leptospirosis muestra un valor de 33,5%, cifra superior a la revelada en los casos positivos (Vijayachary *et al.*, 2004). La positividad serológica que se identificó en este trabajo de tesis fue inferior.

En Orissa, estado situado al este de la República de la India, ocurre un brote epidémico de leptospirosis humana después de sufrir un ciclón devastador que afecta a cuatro importantes ciudades de esa región. La situación epidémica existente conduce al estudio de 142 personas, entre las cuales, 80 se vinculan con diferentes actividades agrícolas después de finalizar la catástrofe atmosférica. En el estudio se utilizan las técnicas de MAT, IgM-ELISA y LEPTO Dipstick, con el objetivo de detectar anticuerpos IgM. Entre las 80 personas vinculadas con las actividades agrícolas, 20 (25%) se confirman como leptospirosis por técnicas serológicas. Mientras que, en los casos sin fiebre, dos muestran las

pruebas serológicas positivas (Jena *et al.*, 2004). El serovar Lai constituye el principal agente causal de las complicaciones hemorrágicas pulmonares y respiratorias presentes en nueve de los 14 fallecidos por leptospirosis, una situación similar ocurre en Nicaragua en el año 1995. La positividad serológica detectada en este trabajo de tesis fue inferior a la descrita en los dos estudios anteriores (Zaki *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000; Jena *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2009; Goarant *et al.*, 2009).

En la literatura se describen también otros métodos de diagnóstico rápido para la confirmación de brotes epidémicos de leptospirosis. Uno de ellos, la prueba de aglutinación de la microcápsula (MCAT), se evalúa y compara con el ensayo de MAT, en 180 sueros obtenidos de 120 pacientes sospechosos de leptospirosis, casos relacionados también con un brote epidémico. La aplicación del ensayo de MCAT en ese brote, muestra una sensibilidad general de 84,7% y una especificidad de 87%. Este resultado sugiere la utilidad de la técnica en el pesquijaje temprano de la leptospirosis, recomendándose para situaciones similares, por la sencillez de su ejecución y por no requerir de un personal técnico experimentado ni un equipamiento sofisticado (Sehgal *et al.*, 1997). Al no estar incluida la MCAT entre las técnicas diagnósticas que se utilizaron en este trabajo de tesis, no se pudo comparar este aspecto con los descritos por Sehgal *et al* (1997).

En los dos brotes de leptospirosis estudiados y ocurridos en Cuba, el serogrupo Ballum obtuvo el mayor porcentaje de identificación, tanto por las pruebas serológicas como por el cultivo. A partir de ese momento, su predominio sugirió que se debía extremar la vigilancia activa del laboratorio sobre el mismo y sobre el resto de las cepas patógenas de leptospiras.

4.3. Verificación de la existencia de casos de leptospirosis humana en una provincia seleccionada para aplicar la vacuna vax-SPIRAL[®] y relacionar en éstos, los serogrupos de leptospiras circulantes

En la tabla 10 se reflejan los serogrupos de leptospiras identificados en los casos positivos de la provincia de Villa Clara, región seleccionada para inmunizar con vaxSPIRAL[®]. El análisis de los resultados mostró que el sistema LEPTO Dipstick, aplicado para la pesquisa

IV. Resultados y Discusión

de leptospirosis en 10 casos sospechosos, fue el método que proporcionó el mayor porcentaje de positividad (90%) y le siguieron en orden de frecuencia, los obtenidos con las técnicas de referencia MAT (81,11%) y la HAT (18,88%). Entre los nueve casos positivos por LEPTO Dipstick, predominó el serogrupo Ballum (33,3%), aunque, en dos casos se identificaron también los serogrupos Pomona y Sejroe, ambos con porcentajes idénticos (22,2%). Mientras que, al estudiar los resultados de todos los casos después de aplicar la técnica de MAT, correspondió de nuevo al serogrupo Ballum, el mayor porcentaje de identificación (32,75%), el resto mostró valores inferiores: Pomona (26,72%), Sejroe (15,51%), Canicola (13,79%), Icterohaemorrhagiae (8,62%), Hebdomadis (1,72%) y Pyrogenes (0,86%). Como se muestra en la tabla 10, entre los 53 casos confirmados por cultivo, el serogrupo Ballum fue el más frecuente (52,83%), seguido por Pomona (22,64%), Canicola (11,32%), Icterohaemorrhagiae (7,54%) y Tarassovi (3,77%).

Tabla 10. Serogrupos identificados en los casos positivos de leptospirosis de la provincia inmunizada con vax-SPIRAL®

Sistemas	Positividad % (+ / n total)	Serogrupo							
		B	Po	C	I	S	H	P	T
		Positividad % n +							
<u>LEPTO Dipstick</u>	90 (9/10)	33,3 3	22,2 2	11,1 1	11,1 1	22,2 2	-	-	-
MAT	81,11 (116/143)	32,7 38	26,7 31	13,7 16	8,6 10	15,5 18	1,72 2	0,86 1	-
Cultivo	51,45 (53/103)	52,8 28	22,6 12	11,3 6	7,5 4	-	1,8 1	-	3,7 2
HAT	18,88 (27/143)	-							
Total	87,21 (191/219)	-							

HAT: hemoaglutinación indirecta; MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); n: casos; %: porcentaje; +: positivo; -: ninguno; B: Ballum; Po: Pomona; C: Canicola; I: Icterohaemorrhagiae; S: Sejroe; H: Hebdomadis; P: Pyrogenes; T: Tarassovi

IV. Resultados y Discusión

No abundan en la literatura trabajos que describan estudios de laboratorios sistemáticos y que estén dirigidos a la identificación de los serogrupos y serovares de leptospiras circulantes en las diferentes regiones geográficas de un país, con el objetivo de formular o aplicar posteriormente vacunas de leptospirosis para uso en los seres humanos o los animales.

La población cubana se inmuniza, por primera vez, contra la leptospirosis a partir de 1983. En esa etapa se aplica la vacuna Vaccinum Leptospirorum (producida por el Instituto de Sueros y Vacunas de Stávropol), integrada por cinco serovares de leptospiras circulantes en la antigua región de la Unión Soviética. En ese momento, se desconocían los serovares circulantes en Cuba y si esta vacuna protegería a la población contra la leptospirosis, ya que no se realizan ensayos de terrenos previos a la inmunización. Después de su aplicación en Cuba se demuestra su capacidad protectora en los grupos de riesgo inmunizados, ya que reduce de forma significativa la incidencia de la leptospirosis en estas poblaciones (Cruz *et al.*, 1986).

Al ocurrir el colapso del campo socialista, Cuba deja de importar nuevos lotes de la vacuna Vaccinum Leptospirorum. Este hecho afecta las condiciones creadas para la prevención y el control de la leptospirosis, lo que facilita el incremento de la incidencia de la enfermedad de forma significativa, ocurriendo en el año 1994, el pico epidémico más alto notificado en Cuba (Cruz, 2002). Por esta razón, el gobierno y las autoridades del MINSAP, responsabilizan al Instituto Finlay, para la investigación, el desarrollo y la obtención de una vacuna contra esta enfermedad para aplicar en los humanos (González *et al.*, 1997). Para llevar a cabo esta actividad se toman en consideración los informes de las encuestas serológicas realizadas por especialistas del Instituto de Medicina Veterinaria, así como los serovares de leptospiras identificados hasta ese momento, en los aislamientos obtenidos de los animales y los humanos. Después del trabajo realizado, se confecciona la primera bacteria trivalente cubana (vax-SPIRAL[®]), un fármaco integrado por las cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serovariedades Canicola, Copenhageni y Mozdok, demostrándose su capacidad inmunogénica y protectora por González *et al* (1997). Los resultados obtenidos permiten iniciar los ensayos clínicos de Fase I (seguridad y

IV. Resultados y Discusión

reactogenicidad) en humanos y de Fase II (evaluación de la inmunogenicidad y reactogenicidad), seguidos por los de Fase IV (vigilancia poscomercialización), ensayos que muestran también resultados satisfactorios (Martínez *et al.*, 2000 y 2001)

Según el criterio de algunos investigadores (Iagovkin *et al.*, 1990; Branger *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2009; Chagas-Junior *et al.*, 2009), el éxito de las vacunas contra la leptospirosis humana depende de la selección de las cepas, algo que se logra con la correcta identificación de los serovares circulantes y de los estudios de seroprevalencia asociados con los diferentes grupos de riesgo en los humanos y en los reservorios de la enfermedad (Koizumi *et al.*, 2009c).

Los resultados que se presentan en esta tesis, formaron parte de una de las investigaciones más completas desarrolladas en Cuba sobre este tema en particular. Estos hallazgos aportaron elementos valiosos para la implementación de nuevas estrategias encaminadas a la reformulación de la actual vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Como se observó en esta investigación, el serogrupo Ballum predominó en los cultivos y ensayos serológicos realizados. Este hallazgo, junto con la presencia de otros serogrupos (Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae), sirvieron para desarrollar otros estudios epidemiológicos relacionados con vax-SPIRAL[®] en Cuba (Hernández *et al.*, 2004) y constituyen importantes evidencias a tener en cuenta en las futuras estrategias de producción de vacunas para uso humano o animal.

Está descrito en la literatura que la protección frente a una vacuna depende del serovar utilizado en su elaboración (Iagovkin *et al.*, 1990; Branger *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2009). Sin embargo, para otros autores, la protección frente a los serovares de leptospiras puede manifestarse de forma cruzada (Sonrier *et al.*, 2000).

La identificación serológica y por cultivo de los serogrupos Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae (componentes actuales de la vacuna vax-SPIRAL[®]), constituyeron importantes evidencias detectadas en este trabajo, resultados que pudieron avalar los

criterios mencionados con anterioridad, a pesar de la no existencia de casos positivos coincidentes por serología y por cultivo.

Está bien documentado que vax-SPIRAL[®] constituye un inmunógeno protector en los diferentes estudios de terrenos realizados en Cuba (Martínez *et al.*, 2000, 2001; Machado *et al.*, 2007). Por otra parte, la emergencia y el predominio del serogrupo Ballum en los cultivos y ensayos serológicos realizados, sugirieron mantener una activa vigilancia microbiológica por parte del laboratorio, para en un futuro cercano, realizar, si fuera necesario, una reformulación de la vacuna existente en Cuba.

4.4. Desarrollo, evaluación y aplicación de un sistema autóctono de laboratorio, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana

4.4.1. Desarrollo y evaluación de cinco sistemas de aglutinación con partículas de látex, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana

De los 65 casos confirmados de leptospirosis, los conjugados de látex para los serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona y Sejroe reconocieron como positivos 62 (95,4%), 62 (95,4%), 61 (93,8%) y 58 (89,2%) sueros, respectivamente; mientras que, el conjugado látex-mezclado reconoció 61 (93,8%). El sistema comercial Lepto Tek Dri Dot detectó 56 (86,2%) de los casos positivos. Se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el látex-Sejroe y el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot, respecto a la técnica de MAT, cuando se aplicó el estadígrafo (valor de $Z = 5,98$), con un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0,05$) (tabla 11).

IV. Resultados y Discusión

Tabla 11. Valores de sensibilidad obtenidas con el empleo de los diferentes sistemas látex investigados y el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot

Sistemas	n +	Sensibilidad %	Estadígrafo (Valor Z)
Látex-Canicola	62	95,4	5,98
Látex-Icterohaemorrhagiae	62	95,4	
Látex-Pomona	61	93,8	
Látex-Sejroe	58	89,2	
Látex-mezclado	61	93,8	
<u>Lepto Tek Dri Dot</u>	56	86,1	

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); c: casos; %: porcentaje; +: positivos; IC: intervalo de confianza del 95% para una $p \leq 0,05$

El mayor porcentaje de especificidad se logró con el sistema látex-Sejroe (96,2%) y el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot (95,5%). Los valores de especificidad de los sistemas látex-mezclado (90,4%), látex-Canicola (87,8%), látex-Pomona (87,2%) y látex-Icterohaemorrhagiae (84,6%), fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los obtenidos con las técnicas tradicionales y el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot.

El látex-mezclado mostró la mejor combinación entre los valores de sensibilidad (93,8%) y especificidad (90,4%). Mientras que, con el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot se alcanzó una especificidad de 95,9%, aunque su sensibilidad fue inferior (86,2%). El látex-mezclado mostró también la mejor combinación de valores predictivos positivo (94,2%) y negativo (96,6%), seguido por el sistema látex-Sejroe (90,9% y 95,8%), respectivamente. Los valores predictivos positivo (78,5%) y negativos (88,4%) del sistema comercial Lepto Tek Dri Dot fueron inferiores.

El porcentaje de concordancia con respecto a la técnica de MAT fue mayor cuando se emplearon los sistemas látex-Sejroe (94,2%) y látex-mezclado (90,2%); mientras que, mostraron valores inferiores, los sistemas látex específicos de los serogrupos Canicola (89,2%), Icterohaemorrhagiae (86,7%) y Pomona (84,4%).

IV. Resultados y Discusión

De los 424 casos presuntivos de leptospirosis humana, 172 (40,57%) se diagnosticaron por la técnica de MAT y por el sistema comercial Lepto Tek Dri Dot, el número de casos identificados fue inferior (134/31,61%). Al analizar los resultados obtenidos con los sistemas de látex estudiados, el mayor porcentaje de muestras positivas (34,91%) se obtuvo con el látex-mezclado (148/242); mientras que, con los sistemas de látex restantes, disminuyeron las reacciones positivas; sus resultados se muestran a continuación: Icterohaemorrhagiae (146/34,44%), Canicola (140/33,03%), Pomona (123/29,01%) y Sejroe (103/24,03%). Al aplicar el estadígrafo de Mac-Nemar, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por MAT y los del sistema látex-mezclado.

Los resultados relacionados con la concordancia detectada entre la técnica de MAT y los sistemas de látex estudiados pusieron en evidencia que, el látex-mezclado identificó un mayor número de casos positivos (266/62,74%) y le siguieron en orden decreciente las muestras positivas de Icterohaemorrhagiae (256/60,38%), Pomona (253/59,67%), Canicola (251/59,2%) y Sejroe (247/58,26%). En general el sistema látex-mezclado mostró un mayor porcentaje de falsos biológicos positivos. Este sistema es más sensible que específico. Sin embargo, de forma general, no se demostraron reacciones cruzadas entre los diferentes sistemas de látex investigados y los sueros de pacientes con dengue, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis B y C y meningo encefalitis aséptica por *enterovirus*.

Los sistemas de látex en estudio mantuvieron su estabilidad durante los seis meses que abarcó la investigación. La reactividad serológica no disminuyó al enfrentarse a los sueros controles seleccionados.

Los resultados de los ensayos de reproducibilidad coincidieron en los meses de junio, julio y septiembre. En todas las pruebas hubo aglutinaciones visibles, con reacciones positivas que se observaron entre los 30 seg. a 1 min de iniciada la mezcla y en los meses de agosto, octubre y noviembre, las reacciones positivas se constataron antes de los 30 seg. Durante los seis meses evaluados, hubo 100% de coincidencia entre los cinco operadores que participaron en su valoración.

4.4.2. Aplicación del mejor sistema de aglutinación con partículas de látex, al pesquisaje rápido de la leptospirosis humana

La tabla 12 muestra los casos pesquisados, con resultados positivos por el látex-mezclado, así como los que se confirmaron también por la técnica de MAT. Obsérvese que, a pesar de existir diferencias en cuanto al total de los casos correspondientes a los brotes (3 y 4) y las muestras recibidas, como parte de la vigilancia del laboratorio durante tres años, se identificaron entre el 20 al 68,3% de los casos confirmados por la técnica de MAT.

Tabla 12. Casos pesquisados como positivos por el látex mezclado y confirmados por la técnica de MAT

Evento (n) año	Pesquisados (+) por látex-mezclado	Positividad de confirmados % (MAT+/pesquisados)
Brote 3 (84) 2005	41	68,3 (28/41)
Brote 4 (162) 2005	5	20 (1/5)
Vigilancia (1 340) 2005 – 2007	85	21,1 (18/85)

MAT: microaglutinación con antígenos vivos y técnica de referencia utilizada (identifica los serogrupos); %: porcentaje; n: casos estudiados; +: positivos

Los serogrupos de leptospiras identificados en los casos pesquisados y confirmados por la técnica de MAT desde el año 2005 a 2007, se muestran en la figura 5. Como se puede observar, se identificaron otros serogrupos (Ballum, Pyrogenes, Hebdomadis, Shermani y Semaranga), cepas que no están incluidos en la formulación del látex-mezclado, hecho que avala la amplia reactividad de este sistema.

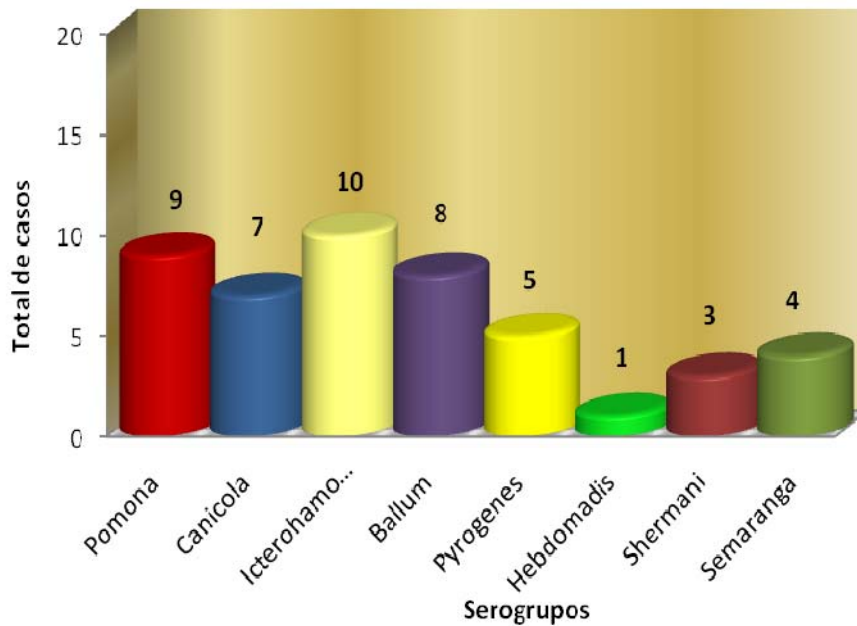


Figura 5. Serogrupos de leptospiras identificados en los casos pesquisados por el látex – mezclado y confirmados por la técnica de MAT (2005-2007)

Con esta investigación se logró desarrollar, evaluar y aplicar a escala de laboratorio, el primer sistema cubano de diagnóstico para la leptospirosis, un método basado en la aglutinación con partículas de látex. La utilización de este reactivo facilita la pesquisa clínica oportuna de los casos sospechosos.

El diseño del látex-mezclado permitió un mejor acercamiento con la técnica de referencia internacional (MAT). Como se demostró en esta tesis, se puede realizar un amplio reconocimiento de los anticuerpos producidos contra la mayoría de los serovares de leptospiras, debido a la amplia reactividad del látex-mezclado, exhibida frente a los sueros de pacientes infectados por otros serogrupos de leptospiras, no incluidos en la formulación original de este biológico.

Los valores de sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos (positivo y negativo) del látex-mezclado superaron a los identificados por el sistema comercial Lepto

Tek Dri Dot y a los descritos por otros investigadores (Smits *et al.*, 2000b; Smits *et al.* 2001b; Vijayachari *et al.*, 2002; Hull Jackson *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2007).

En general, todos los sistemas de pesquisaje rápidos existentes pueden ocasionar falsos biológicos negativos y positivos. Se debe recordar que estos métodos no se utilizan para la confirmación del caso, su aplicación sirve para una mejor orientación clínica y para un diagnóstico más rápido por parte del laboratorio. Los resultados obtenidos con los sistemas látex siempre deben confirmarse por los métodos convencionales (principalmente por la técnica de MAT).

Los resultados del estudio de la estabilidad y reproducibilidad, confirmaron la facilidad y calidad de los sistemas propuestos. Algunos investigadores describen que el sistema Lepto Tek Dri Dot mantiene su estabilidad hasta dos años después de evaluado (Smits *et al.*, 2001b).

4.5. Consideraciones generales finales

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos sobre el diagnóstico microbiológico de la leptospirosis en Cuba durante 10 años (1997 - 2007). A pesar de las condiciones existentes en el país, la búsqueda de nuevos métodos, la incorporación o la transferencia de tecnologías y el desarrollo de sistemas autóctonos útiles, fue posible gracias a la voluntad humana y política que caracteriza a la ciencia cubana y a sus investigadores.

Los sistemas serológicos rápidos que se evaluaron e introdujeron en Cuba y formaron parte de este trabajo, mostraron ventajas técnicas cuando se les comparó, con los métodos de referencia y los tradicionales (Chappel *et al.*, 2004). Ninguno de estos procedimientos fue superado en cuanto a su sencillez, rapidez, simplicidad técnica y grado de ejecución. La mayoría de las técnicas empleadas pueden realizarse por personas no experimentadas y sin la necesidad de requerir equipos sofisticados.

IV. Resultados y Discusión

El diagnóstico de laboratorio y el rigor científico se incrementa con el empleo de los sistemas rápidos. No obstante, no es recomendable utilizarlos para el pesquisaje de la leptospirosis humana en muestras extraídas antes del 5^{to} ó 6^{to} día del inicio de los primeros síntomas clínicos (Levett et al. 2001; Cumberland *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2007).

Las referencias bibliográficas que se utilizaron para la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis, respecto a la evaluación de los sistemas serológicos rápidos, abarcaron trabajos realizados durante los períodos correspondientes a su descripción y comercialización, por sus respectivas casas comerciales. En estos momentos no se producen los sistemas LEPTO Dipstick y Lepto Tek Lateral Flow. Además, se puede añadir que Lepto Tek Dri Dot, no se comercializa para Cuba, desde finales de 2008 y sólo está disponible SD Leptospira IgM-IgG, para la pesquisa de leptospirosis humana.

La sensibilidad de los métodos serológicos rápidos se asocia de manera proporcional, con la cepa de leptospira acoplada al sistema. La mayoría de éstos, están integrados por la cepa no patógena de leptospira conocida como Patoc I, del serogrupo Semaranga y serovar Patoc, microorganismo que posee todos los antígenos que comparten la mayoría de los serovares del género *Leptospira* (Yersin *et al.*, 1999; Goris *et al.*, 2009). Los sistemas con partículas de látex (Lepto Tek Dri Dot y látex-mezclado) tienen en su composición cepas patógenas de leptospirosis y demostraron también su utilidad para el pesquisaje de la enfermedad en los humanos.

El porcentaje de sensibilidad de las pruebas serológicas depende del tipo de población o grupo de riesgo donde se apliquen, así como de la situación clínica epidemiológica de la enfermedad. Se demuestra que el tratamiento de la leptospirosis con antimicrobianos específicos, afecta la respuesta inmune humoral, respuesta que suele ser más crítica cuando se utilizan sueros extraídos en los estadios muy tempranos de la infección (Eapen *et al.*, 2002). La mayoría de los autores señalan que la sensibilidad de los sistemas de diagnóstico rápido es superior cuando se estudian los sueros correspondientes al 10^{mo} día posterior al inicio de la infección (Gussenhoven *et al.*, 1997; Sehgal *et al.*, 1999a; Smits *et al.*, 2000a; Eapen *et al.*, 2002; Bafani *et al.*, 2003; Goris *et al.*, 2009).

IV. Resultados y Discusión

La especificidad de los sistemas serológicos rápidos depende, en gran medida, de la prevalencia de la enfermedad. Se observa que, en las zonas con elevada endemicidad, la especificidad de los sistemas es muy baja, debido a que la población posee anticuerpos IgM producidos contra otros patógenos circulantes en la misma zona geográfica. (Vijayachari *et al.*, 2001a; Eapen *et al.*, 2002). En una comunicación personal realizada por Smits (2005), este investigador nos refiere que la especificidad del sistema Lepto Tek Dri Dot se reduce (8,9 qué %?), cuando se aplica en poblaciones con una elevada prevalencia de citomegalovirus, dengue, HIV y malaria (Smits HL. [comunicación personal]. Koninkluk Instituut voor de Tropen. Amsterdam, The Netherlands. 2005).

Recientes investigaciones describen el uso de nuevos métodos rápidos para el pesquisaje serológico de la leptospirosis, pero ninguno ha sido validado internacionalmente, todos son muy complejos desde el punto de vista técnico y ninguno supera en sencillez y rapidez a los sistemas diagnósticos descritos en esta investigación (Croda *et al.*, 2007, Coutinho *et al.*, 2007, Cohen *et al.*, 2007). Por otra parte, existen también avances en el diagnóstico molecular. Se introduce de forma continua el sistema de RCP en tiempo real, técnica con una compleja ejecución y un elevado costo, sobre todo para los países pobres (Sehgal *et al.*, 2002b; Branger *et al.*, 2005, Merien *et al.*, 2005; Levett *et al.*, 2005; Slack *et al.*, 2006; Ganoza *et al.*, 2006; Slack *et al.*, 2007).

Los brotes epidémicos de leptospirosis ocurridos en el mundo se atribuyen principalmente a los cambios climáticos, a los efectos potenciales de la actividad del hombre sobre la naturaleza, a la vinculación por la profesión o por la actividad realizada, así como a la recreación, al deporte y al turismo. Una exposición directa o indirecta con la fuente de infección puede traer consigo la aparición de casos clínicos de variable intensidad (Cruz *et al.*, 2002; Jena *et al.*, 2004; Bruce *et al.*, 2005). Algunos investigadores demuestran que, dentro de una epidemia ocasionada por leptospiras, la mortalidad puede ser superior a la del dengue (La Rocque *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 2005; Vinetz *et al.*, 2005; Mathur *et al.*, 2009; Sohan *et al.*, 2008; Sugunan *et al.*, 2009). En países como la India, donde la enfermedad es bien conocida, se describe que la emergencia de los brotes está relacionada de forma directa, con una elevada infestación por roedores, particularmente con la rata, una fuente de

infección importante para el medio ambiente y los seres humanos (Sehgal *et al.*, 2002a; Suepaul *et al.*, 2009).

El método de laboratorio más antiguo y descrito para el estudio de los brotes epidémicos de leptospirosis es el examen directo en campo oscuro, un procedimiento que, hasta la fecha, algunos autores lo catalogan como el sistema bacteriológico más simple, para el pesquisaje rápido de la leptospirosis humana y que jamás podrá ser automatizado. En una evaluación realizada en el 2001, se demuestra una vez más, que el examen directo en campo oscuro sigue siendo rápido, aunque no totalmente confiable para la confirmación de esta entidad clínica. Por esta característica, no se recomienda como prueba única para el diagnóstico del laboratorio, aún cuando se requiera de una respuesta rápida ante la sospecha de la misma. Los parámetros de sensibilidad (40,2%), especificidad (61,5%) y valores predictivos positivo (55,2%) y negativo (46,6%) se consideran bajos en su totalidad, así como el 50% de concordancia identificado con respecto a la técnica de MAT (Vijayachari *et al.*, 2001b).

En esta investigación las técnicas serológicas tradicionales, particularmente la MAT, unidas a los métodos rápidos, jugaron un papel importante para la confirmación de los casos de leptospirosis asociados con los brotes estudiados, a pesar de no haber empleado las mismas metodologías en las dos situaciones epidémicas, ni haber incluido el ELISA-IgM y la técnica de aglutinación de la microcápsula (MCAT), por no estar ambas disponibles en Cuba. En el ámbito internacional no existen lineamientos o reglamentos que establezca el uso de determinadas metodologías de laboratorio para estudiar los eventos epidémicos de leptospirosis. Cada país utilizará los sistemas que tiene disponibles, apoyados por la voluntad política y las estrategias incluidas en los programas de prevención y control existentes. El porcentaje bajo obtenido en los casos asociados a los brotes epidémicos, aunque similar a los descritos en la literatura internacional, estuvieron quizás relacionados no sólo con la eficacia del método utilizado, sino que pudieron intervenir también otros factores como: la selección adecuada y el momento de extracción de la muestra, el tiempo que se demora en procesarse y la forma de trasladarse al laboratorio de microbiología, entre otros factores. Además, por último, habrá que tener presente, la cantidad del producto

patológico disponible para poder realizar las repeticiones necesarias que permitan esclarecer los resultados dudosos.

Con los resultados obtenidos en esta tesis se demostró que la confirmación microbiológica del brote epidémico 1 ocurrido en Ciudad Santa Clara, constituyó la antesala de un estudio posterior que se relacionó con la identificación de los serogrupos de leptospiras presentes en la provincia de Villa Clara. Desde el punto de vista serológico, en esta región circularon los mismos serogrupos de leptospiras que están incluidos en la vacuna vax-SPIRAL®, resultado que puede avalar su efecto protector. Sin embargo, también se observó un hallazgo interesante y fue el relacionado con la presencia del serogrupo Ballum, microorganismo no incluido en la formulación de la vacuna, lo que sugiere mantener una vigilancia activa de laboratorio sobre éste y en general sobre todos los serogrupos de leptospiras circulantes en el país.

No existen en la literatura consultada, trabajos que describan la obtención de un sistema con partículas de látex similar al descrito en esta investigación, aunque se revisó el estudio publicado por Mc Bride *et al.* (2007), quienes evalúan cuatro sistemas de látex, utilizando las células completas de leptospiras como antígenos (Mc Bride *et al.*, 2007).

Se debe señalar que, en el diseño del látex autóctono, se incluyeron las cepas de leptospiras de mayor circulación en Cuba, en el período de tiempo en que fue realizada esta investigación y no se utilizó el serogrupo Ballum, a pesar de su identificación como predominante en otros resultados de la tesis. Se mencionó, por ejemplo, que en el estudio de Villa Clara, el serogrupo Ballum se identificó en el 40% de los casos positivos de leptospirosis, cifra que debe tenerse presente para futuras estrategias de prevención y control. Cuando se planificó y organizó esta investigación, había dificultades técnicas con la obtención de la biomasa del serogrupo Ballum de forma estable, no siendo de igual manera con los restantes serogrupos seleccionados.

La técnica de MAT sirvió en todos los experimentos de la tesis, como técnica de confirmación serológica, ya que es el sistema de referencia internacional, recomendada por

IV. Resultados y Discusión

el Comité de Expertos en Leptospirosis de la ILS y la OMS. Por estar disponible en Cuba el sistema Lepto Tek Dri Dot, se empleó en la tesis, como sistema de látex comercial para comparar los resultados de los conjugados látex autóctonos. La metodología comercial citada, presenta remarcada aproximación con el sistema de látex autóctono. Se quiere destacar una vez más, que los casos pesquisados por cualquiera de los sistemas rápidos presentados en el día de hoy, tienen que ser confirmados serológicamente por la técnica de MAT.

De manera general, es importante destacar el papel del cultivo como prueba de oro para el diagnóstico del laboratorio. Este método brinda una valiosa e irrefutable información en los casos confirmados de leptospirosis (Levett, 2001). En nuestra investigación se obtuvieron resultados positivos, aunque en una menor proporción, cuando se le comparó con las serologías realizadas por las técnicas de MAT o HAT. El éxito del cultivo y el aislamiento de las leptospiras dependerán de los factores objetivos mencionados durante toda la exposición de este trabajo. Resulta indiscutible la información que brinda esta metodología bacteriológica, la que enriquecerá el conocimiento científico sobre la leptospirosis humana y los futuros estudios clínicos y epidemiológicos factibles de ejecutar.

Con respecto a la estabilidad del sistema látex comercial Lepto Tek Dri Dot, como se mencionó con antelación, se observó que su estabilidad superó los dos años posteriores a su producción. El sistema de látex autóctono, demostró ser estable en similares condiciones con respecto al comercial, hasta 6 meses después de su producción.

En el estudio realizado en 2004, acerca del desarrollo y la evaluación de los sistemas látex autóctonos, se utilizó el sistema comercial disponible Lepto Tek Dri Dot. En esos momentos no existía otro sistema serológico rápido comercial en Cuba.

El número de reacciones cruzadas que se detectó en los sueros de los pacientes con sífilis, hepatitis y dengue, cuando se estudiaron por los diferentes sistemas serológicos rápidos, fue ínfimo y no significativo. Sin embargo una vez más, se demostró la amplia reactividad de estos sistemas de pesquisa para la leptospirosis, destacándose al látex-mezclado

IV. Resultados y Discusión

autóctono, como un método útil que fue capaz de reconocer anticuerpos presentes en los sueros de los individuos con la enfermedad e infectados por otros serogrupos de leptospiras no presentes en su formulación. De igual manera sucedió con el resto de los sistemas serológicos rápidos comerciales evaluados en esta investigación.

El futuro inmediato del látex-mezclado está dirigido a su producción en mayor escala, de manera que pueda utilizarse en la pesquisa de la leptospirosis en Cuba. Para ello, se deben concluir los ensayos necesarios para su registro y comercialización. Esta tecnología continuará perfeccionando la vigilancia microbiológica del laboratorio y brindará una orientación oportuna a la asistencia médica, ejerciendo así su papel de forma directa en la prevención y el control de la leptospirosis en Cuba.

V. CONCLUSIONES

- Se incrementa el rigor científico del diagnóstico de laboratorio, al demostrar la utilidad e importancia de los sistemas serológicos rápidos usados para el pesquiasaje de la leptospirosis humana en Cuba, los que presentan valores aceptables de sensibilidad, especificidad y concordancia en comparación con el método de referencia.

- El uso combinado de sistemas de diagnóstico microbiológico permite identificar la etiología de la leptospirosis humana, así como los principales serogrupos de leptospiras, en los casos confirmados de los brotes epidémicos ocurridos en Cuba.

- Los serogrupos de leptospiras presentes en los casos confirmados con leptospirosis humana coinciden con los presentes en vax-SPIRAL[®], lo que puede avalar su efecto protector, aunque la detección de Ballum, sugiere mantener una vigilancia activa de laboratorio, con vistas a su futura inclusión en la vacuna cubana.

V. Conclusiones

- El nuevo sistema de látex autóctono diseñado para la pesquisa rápida y sensible de leptospirosis humana, está disponible como diagnosticador, en los laboratorios que integran la Red Nacional de Cuba, contribuyendo así con la prevención y el control de la enfermedad a nivel nacional.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar los sistemas serológicos rápidos para la pesquisa clínica de la leptospirosis humana, previa instrucción de su correcta realización, lectura e interpretación de los resultados.

- Ampliar en Cuba, la cobertura del cultivo en las muestras obtenidas de los casos con una sospecha clínica de leptospirosis, esta medida permitirá perfeccionar la vigilancia microbiológica y la caracterización de las cepas de leptospiras circulantes.

- Concluir la transferencia tecnológica del látex-mezclado al centro productor para cumplimentar su registro y distribución nacional, así como su introducción al Sistema Nacional de Salud.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulkader RC, Sabbaga E, Meireles L, Radu A. Vascular injury in acute renal failure due to leptospirosis is not associated with antineutrophil cytoplasmic antibody. *Nephron* 1993; 65: 156-58.
- Abdulkader RC, Daré EF, Camargo ED, Spinosa C, Silva MV, Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; 44: 79-83.
- Abgueguen P, Pichard E. Leptospirosis. *Rev Prat* 2009; 59: 665-73.
- Acha PN, Seyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3^{era} ed. Washington, DC: OPS; 2001.
- Adler H, Vonstein S, Deplazes C, Stieger C, Frei R. Prevalence of *Leptospira spp.* in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland *Epidemiol Infect* 2002; 128: 107-9.
- Agampodi S, Peacock SJ, Thevanesam V. The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 524-6.
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One* 2009; 4: 70-93.

- Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, Ojkic D, Prescott JF. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998-2006. *Can J Vet Res* 2009; 73: 167-75.
- Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 340-43.
- Arias Miranda IM, Fonseca Aizpuru EM, González García ME, Barrero López AG. Emerging zoonosis. *An Med Interna* 2008; 25: 314.
- Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL, Thorin C, Andre-Fontaine G. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 18: 12-18.
- Bafani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods WC, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant S. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 803-9.
- Barochi MA, Ko A, Ramos S, Tucunduva M, Galvao M, Riley L. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR based differentiation of Leptospire serogroups. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 191-95.
- Baverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzén P, Egenvall A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Vet Scand* 2009; 51: 15.

- Blanco RM, Takei K, Romero EC. Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 267-73.
- BIO LINE Standard Diagnostics INC. Corea. SD *Leptospira* IgM-IgG [citado en el Taller Internacional de Laboratorio para el Diagnóstico de Leptospirosis humana, Ciudad de Tegucigalpa, Honduras, el 15 de mayo de 2007]. Disponible en: www.standardia.com
- Bolin C. Leptospirosis. En: Brown C, Bolin C, editores. *Emerging diseases of animals*. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 185-200.
- Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immunol* 2001; 69: 6831-38.
- Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, Andre-Fontaine G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243: 437-45.
- Braunwald E, Franci AS, Kasper DL, Hanser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*. Vol. 2. 15th ed. New York: Mc Graw-Hill. 2001.
- Brett-Major DM, Lipnick RJ. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 8: 7342.
- Bruce MG, Sanders EJ, Leake JA, Zaidel O, Bragg SL, Aye T, Shutt KA, Deseda CC, Rigau-Perez JG, Tappero JW, Perkins BA, Spiegel RA, Ashford DA

Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. *Acta Tropica* 2005; 96: 36-46.

- Bulach DM, Kalambaheti T, de La Peña-Moctezuma A, Adler B. Functional analysis of genes in the rfb locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype hardjobovis. *Infect Immun* 2000; 68: 3793-98.
- Carrizo A, Brihuega B, Etchechoury I, Arese A, Romero S, Gioffré A, Romano MI, Caimi K. Identification of immunoreactive antigens of *Leptospira interrogans*. *Rev Argent Microbiol* 2009; 41:129-33.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 760-8.
- Chagas-Junior AD, McBride AJ, Athanzio DA, Figueira CP, Medeiros MA, Reis MG, Ko AI, McBride FW. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1632-7.
- Champagne MJ, Higgins R, Fairbrother JM, Dubreuil D. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *Can J Vet Res* 1991; 55: 239-45.
- Chandy S, Boorugu H, Chrispal A, Thomas K, Abraham P, Sridharan G. Hantavirus infection: a case report from India. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 267-70.
- Chappel RJ, Goris MG, Palmer MF, Hartskeerl RA. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5484-88.

- Chin J. El control de las enfermedades transmisibles. 17^{ma}. ed. Washington, DC.: OPS; 2001.
- Cohen AL, Dowell SF, Nisalak A, Mammen MP, Petkanchanapong W, Fisk TL. Rapid diagnostic tests for dengue and leptospirosis: antibody detection is insensitive at presentation. *Trop Med Int Health* 2007; 12: 47-51.
- Coutinho ML, Vasconcellos FA, Fernandes CP, Seyffert N, Seixas FK, Ko AI, Dellagostin OA, Aleixo JA. Evaluation of the anti-LipL32 monoclonal antibodies potential for use in leptospirosis immunodiagnostic tests. *J Immunoassay Immunochem* 2007; 28: 279-88.
- Craig SB, Graham GC, Burns MA, Dohnt MF, Smythe LD, McKay DB. Lymphopenia is observed regularly in the acute (leptospiroemic) phase but not the immune phase of leptospirosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 958-60.
- Croda J, Ramos JG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, Haake D, Reis MG, Ko AI. Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1528-34.
- Cruz R, Rodríguez P, López C, Atienzar E, Abreus J, Aldama F. Reactogenicidad de la vacuna antileptospirósica en Cuba. *Rev Cub Hig Epidemiol* 1986; 24: 407-12.
- Cruz R. Estrategia cubana para el control y prevención de la leptospirosis en Cuba. *Rev Latinoam Microbiol* 2002; 44 (Supl): 22.
- Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethn Dis* 2009; 19 (1 Suppl 1): S1-37-41.

- Cui JJ, Xiao GX, Chen TZ, Zhu GF, Sato T, Seki M, Kobayashi S, Arimitsu Y. Further evaluation of one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Epidemiol Infect* 1991; 106: 561-65.
- Cumberland PC, Everard COR, Wheeler JG, Levett PN. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 601-08.
- Da Silva MV, Batista L, Camargo ED, Leitao PA, Szalkay VG, Rosenthal C, Vaz A J, de Souza AM. Leptospirosis in patients with anti-HIV antibodies: report of 2 cases. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990; 23: 229-31.
- Dassanayake DL, Wimalaratna H, Agampodi SB, Liyanapathirana VC, Piyarathna TA, Goonapienuwala BL. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 48.
- De Souza L, Kourí MC. Chemical and biological properties of endotoxin from *Leptospira interrogans* serovars Canicola and Icterohamorrhagiae. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25: 467-75.
- Dohe VB, Pol SS, Karmarkar AP, Bharadwaj RS. Two test strategy for diagnosis of Leptospirosis. *Bombay Hosp J* 2009; 51: 18-21.
- Dirección Nacional de Estadísticas. Ministerio de Salud Pública. Ciudad de La Habana. Cuba. 2009.
- Djadid ND, Ganji ZF, Gouya MM, Rezvani M, Zakeri S. A simple and rapid nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira spp.* *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 251-56.

- Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Abdoel T, Smits HL. Evaluation of the clinical utility of a rapid blood test for human leptospirosis. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 221-25.
- Effler PV, Domen HY, Bragg SL, Aye T, Sasaki DM. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1081-84.
- Ellis WA. *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection in domestic animal. En: Kobashi Y, editor. *Leptospirosis: Proceedings of Leptospirosis Research Conference*. Tokio: Hokusen – Sha; 1991. p. 20-33.
- Estavoyer JM, Racadot E, Couetdic G, Leroy J, Groperrin L. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. *Rev Infect Dis* 1993; 13: 1245-46.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Australia: MedSci; 1999.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 2003.
- Fernández C, Mattsson JG, Bölske G, Levinsohn S, Johansson K. Species-specific oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Res Vet Sci* 1993. 55:130-36.
- Fialho RN, Martins L, Pinheiro JP, Bettencourt BF, Couto AR, Santos MR, Peixoto MJ, Garrett F, Leal J, Tomás AM, Bruges-Armas J. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. *Hum Immunol* 2009; 70: 915-20.
- Fitzgerald J. Availability of leptospirosis vaccine. *Vet Rec* 2009; 164:157.

- Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, Gilman RH, Gotuzzo E, Vinetz JM. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. PLOS Med 2006; 3: 1329-40.
- Garrity GM, Winters M, Searles DB. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Bergey's Manual Trust; 2001.
- Ginebra OA. Microorganismos espirales: Leptospirosis. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL, editores. Microbiología y parasitología médica. Vol. I. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencia Médicas; 2001. p. 405-15.
- Goarant C, Laumond-Barny S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. Trop Med Int Health 2009; 14: 926-9.
- Góngora A, Parra J, Aponte L, Gómez L. Seroprevalence of *Leptospira spp* in population groups of Villavicencio, Colombia. Rev Salud Pública (Bogotá) 2008; 10: 269-78.
- González M, Naranjo M, Rodríguez Y, Bebelagua Y, Oliva R. Vacuna antileptospirósica trivalente adsorbida para uso humano. Primer ensayo evaluativo de reactogenicidad e inmunogenicidad en un grupo de voluntarios adultos. VaccinMonitor 1997; 6: 2-10.
- Goris MGA, Wagenaar JFP, Sakundarno Adi 3, Engelberts MFM, van de Ven AWED, Hartskeerl RA. Prospective evaluation of Lepto Tek Lateral Flow and Lepto Tek Dri Dot in the serodiagnosis of human leptospirosis. KIT-Indonesia [citado en: <http://www.kit.nl>]. 2009.

- Gouvela EL, Metcalfe J, Carvalho ANL, Aires SF, Villas-Bisneto JC, Queiros A, Santos Ac, Salgado K, Reis AC, Ko A. Leptospirosis associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008;14: 505-08.
- Gravekamp C, van de Kemp H, Carrington D, van Eys GJJM, Everard COR, Terpstra WJ. Detection of leptospiral DNA by PCR in serum from patients with *copenhageni* infections. En: Kobayashi Y, editor. *Leptospirosis: proceedings of the Leptospirosis Research Conference*. Tokio: University of Tokyo Press; 1991. p. 151-64.
- Gravekamp C, van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1691-700.
- Guerra MA. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 472-8.
- Guidugli F, Castro AA, Atallah AN. WITHDRAWN: Antibiotics for preventing leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 8: 1305.
- Gunawardhana SA, Sellahewa KH. Clinical features of leptospirosis: a prospective descriptive study at the National Hospital of Sri Lanka (NHSL) in 2007. *Ceylon Med J* 2008; 53: 155-56.
- Gussenhoven GC, van der Hoorn AWG, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, van Ingen CW, Smits HL. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 92-97.
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000; 146: 1491-504.

- Haake DA, Chao AG, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68: 2276-85.
- Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002; 70: 4936-45.
- Haake DA, Suchard MA, Kelly MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 2004; 186: 2818-28.
- Haake DA, Matsunaga J. Leptospiral membrane proteins - variations on a theme? *Indian J Med Res* 2005; 121: 143-45.
- Hartskeerl RA, Smits H, Goris MGA, Terpstra WJ. Manual of International course on laboratory methods for the diagnosis "Leptospirosis Habana 2008". 4^{ta} Edición. Ciudad de La Habana. Cuba. PALCOGRAF - Palacio de Convenciones. 2008. p: 1-109.
- Hartskeerl RA. Leptospirosis: a prototype neglected infectious disease. [disertación]. Citado en: Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso/Cubano de Microbiología y Parasitología y IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Palacio de Convenciones. Ciudad de La Habana. Cuba. 2009.
- Hernández J, Cuevas I, Casanueva V, Montero R, Beoto S. Inmunoprofilaxis de una vacuna trivalente contra la leptospirosis desarrollada por el Instituto Finlay. *Bioquímica* 2004; 29: Supl 1, 88.

- Hesterberg UW, Bagnall R, Bosch B, Perrett K, Horner R, Gummow B. A serological survey of leptospirosis in cattle of rural communities in the province of KwaZulu-Natal, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2009; 80: 45-49.
- Hookey JV. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 90: 267-74.
- Houwers DJ, Wagenaar JA, Hartskeerl RA, Hautvast JL, Stinis HP, Ruijs WL, Lenaers SJ. Leptospirosis (Weil disease) in a dog: a risk for people?. *Tijdschr Diergeneeskd* 2009; 134: 392-94.
- Hu YQ, Pang ZF. Epidemiological investigation on an outbreak of leptospirosis involving 36 patients. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2009; 30: 204.
- Hull-Jackson C, Glass MB, Ari MD, Bragg SL, Branch SL, Whittington CU, Edwards. CN, Levett PN. Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1853-55.
- Hurst FP, Neff RT, Katz AR, Buchholz AE, Sasaki DM, Berg BW, Abbott KC. Acute kidney injury requiring hemodialysis in patients with anicteric leptospirosis. *Clin Nephrol* 2009; 72: 186-92.
- Iagovkin EA, Kostina NI, Vachaev BF, Romantsova T, Kondratenko VF, Bunin IE. The improvement of immunobiological preparations against leptospirosis. An experimental study of a new concentrated purified vaccine against icterohemorrhagic leptospirosis for human immunization. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1990; 2: 4751.
- Illangasekera VL, Kularatne SA, Kumarasiri PV, Pussepitiya D, Premaratne MD. Is oral penicillin an effective chemoprophylaxis against leptospirosis? A placebo

controlled field study in the Kandy District, Sri Lanka. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; 39: 882-84.

- Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, Mizuno T, Itamoto K, Maeda K, Iwata H, Okuda M. Nationwide survey of leptospira antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 1191-99.
- Jena AB, Mohanty KC, Devadasan N. An outbreak of leptospirosis in Orissa, India: The importance of surveillance. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 1016-21.
- Jiang JK, Lin XA, Yan J. Prediction and immunologic identification of antigenic epitopes in genus-specific outer membrane protein LipL41 of *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008; 37: 585-91.
- Jin D, Ojcius DM, Sun D, Dong H, Luo Y, Mao Y, Yan J. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8- and caspase-3-dependent pathways. *Infect Immun* 2009; 77: 799-809.
- Johansson KE. Oligonucleotide probes complementary to 16 s rRNA. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. II.* Academic Press. INC. Edit J.G. Tully and S. Razin. A-Z. 1996. 29.
- Johnston V, Stockley JM, Dockrell D, Warrell D, Bailey R, Pasvol G, Klein J, Ustianowski A, Jones M, Beeching NJ, Brown M, Chapman AL, Sanderson F, Whitty CJ. Fever in returned travellers presenting in the United Kingdom: recommendations for investigation and initial management. *J Infect* 2009; 59: 1-18.
- Jongyota W, Wigraipat C, Nontapa S, Taweechaisupapong S, Wara-Aswapati NC, Wongratanacheewin S, Sermswan RW. Differential response of cytokines induced

by *Leptospira interrogans*, serogroup Pomona, serovar Pomona, in mouse and human cell lines. Asian Pac J Allergy Immunol 2008; 26: 229-36.

- Kalsow CM, Dwyer AE. Retinal immunopathology in horses with uveitis. Ocul Immunol Inflamm 1998; 6: 239-51.
- Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Lancet 1999; 354: 820-25.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 736-47.
- Koizumi N, Gamage CD, Muto M, Kularatne SA, Budagoda BD, Rajapakse RP, Tamashiro H, Watanabe H. Serological and genetic analysis of leptospirosis in patients with acute febrile illness in kandy, sri lanka. Jpn J Infect Dis 2009a; 62: 474-75.
- Koizumi N, Muto M, Yamada A, Watanabe H. Prevalence of Leptospira spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. J Vet Med Sci 2009b; 71: 797-99.
- Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. J Med Microbiol 2009c; 58: 1227-30.
- Kokudo T, Nakamura I, Nakamura-Uchiyama F, Komiya N, Ohnishi K. Weil's disease in a patient living in Tokyo. Intern Med 2009; 48: 1707-10.
- Krojgaard LH, Villumsen S, Markussen MD, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. High prevalence of *Leptospira spp.* in sewer rats (*Rattus norvegicus*). Epidemiol Infect 2009; 137: 1586-92.

- LaRocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, Hayes JM, Hossain MA, Brooks WA, Levett PN. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 766-69.
- Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Gene* 2000; 254: 19-28.
- Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 11-14.
- Levett PN. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease. *J Med Microbiol* 1999a; 48: 417-18.
- Levett PN. Leptospirosis. [disertación]. Second International Leptospirosis Society Meeting (ILS). Australia. 1999b.
- Levett PN. Leptospirosis: *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 296-320.
- Levett PN, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, Paxton H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 349-51.
- Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infectious Dis* 2003; 36: 447-52.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005; 54: 45-49.

- Levett PN. Recientes cambios en la nomenclatura de las genomaespecies de leptospiras. [disertación]. Five International Leptospirosis Society Meeting (ILS). Quito, Ecuador, octubre de 2006.
- Lilenbaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Identification of *Leptospira spp.* carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 2009; 87: 16-9.
- Lin X, Chen Y, Lu Y, Yan J, Yan J. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 237-42.
- Lo M, Cordwell SJ, Bulach DM, Adler B. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 8: 12.
- Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 641-45.
- Lourdault K, Aviat F, Picardeau M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol* 2009; 58: 648-55.
- Luo D, Xue F, Ojcius DM, Zhao J, Mao Y, Li L, Lin X, Yan J. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira spp.* and characterization of their immunogenicity. *Vaccine* 2009; 28: 243-55.
- Machado M, Naranjo N, González M, Batista N, González A, Abreu Y, Torres V, Pérez Amat V, Infante JF. Inmunoprotección de componentes de membrana externa de *Leptospira Pomona* serovar Mozdok. *VacciMonitor* 2007; 16: 7-15.

- Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature* 2009; 460: 762-65.
- Maneewatch S, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Saengjaruk P, Songserm T, Wongratanachewin S, Tongtawe P, Srimanote P, Chaisri U, Chaicumpa W. Humanized-monoclonal antibody against heterologous *Leptospira* infection. *Protein Eng Des Sel* 2009; 22: 305-12.
- Manu V, Roy S, DuttaRoy AR, Sharma S, Vijayachari P, Kataria VK, Seghal SC. PCR on formalin-fixed necropsy tissues to diagnose leptospirosis. *Indian J Med Res* 2009; 129: 105-07.
- Martínez R, Pérez A, Baró M, Alvarez A, Menéndez J, Díaz M. Evaluación de la efectividad de una nueva vacuna contra la leptospirosis humana en grupos de riesgo. *Pan Am J Public Health* 2000; 8: 385-91.
- Martínez R, Pérez A, Baly A, Baró M, Menéndez R, Ruiz A. Reactogenicidad de la vacuna cubana trivalente contra la leptospirosis humana en un ensayo clínico de fase II. *VacciMonitor* 2001; 10: 15.
- Mathur M, De A, Turbadkar D. Leptospirosis outbreak in 2005: L.T.M.G. hospital experience. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 153-55.
- Masusawa T, Nakamura T, Shimizu T, Yanagihara Y. Biological activities and endotoxic activities of protective antigens (PAgs) of *Leptospira interrogans*. *Zentbl Bakteriol* 1990; 274: 109-17.
- McBride AJ, Santos BL, Queiroz A, Santos AC, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI. Evaluation of four whole-cell leptospira based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1245-48.

- McBride AJ, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, Reis MG, Haake DA, Ko AI, Dellagostin OA. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira spp.* Infect Genet Evol 2009; 9: 196-205.
- McCurry J. Philippines struggles to recover from typhoons. Lancet 2009; 374: 1489.
- Merien F, Perolat P, Mancel E, Persan D, Baranton G. Detection of leptospiral DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis. J Infect Dis 1993; 168: 1335-36.
- Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995; 172: 281-85.
- Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol Lett 2000; 185: 17-22.
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett 2005; 249: 139-47.
- Midwinter A, Vinh T, Faine S, Adler B. Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar Pomona and its role in immunity. Infect Immun 1994; 62: 5477-82.
- Mohan AR, Cumberbatch A, Adesiyun AA, Chadee DD. Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996-2007: a retrospective study. Acta Trop 2009; 112: 260-65.

- Monahan AM, Miller IS, Nally JE. Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol* 2009; 107: 707-16.
- Murray GL, Morel V, Cerqueira GM, Croda J, Srikrum A, Henry R, Ko AI, Dellagostin OA, Bulach DM, Sermswan RW, Adler B, Picardeau M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2009; 77: 810-16.
- Nicholson VM, Prescott JF. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. *Vet Microbiol* 1993; 36: 123-38.
- Niwattayakul K, Kaewtasi S, Chueasuwanchai S, Hoontrakul S, Chareonwat S, Suttinont C, Phimda K, Chierakul W, Silpasakorn S, Suputtamongkol Y. An Open Randomized Controlled Trial of Desmopressin, and Pulse Dexamethasone as Adjunctive Therapy in Patients with Pulmonary Involvement Associated with Severe Leptospirosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 2: 34-40.
- Newman BR, Stevens WR, Gaafar AH. Latex agglutination test for the diagnosis of *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Lab Clin Med* 1970; 79: 107-13.
- Oliveira DS, Guimarães MJ, Portugal JL, Medeiros Z. The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 2009; 103: 149-57.
- Paganin F, Bourdin A, Borgherini G, Dalban C, Poubeau P, Tixier F, Gouix A, Noel JB, Cotte L, Arvin-Berod C. Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Rev Mal Respir* 2009; 26: 971-79.
- Palmer M, Hookey J. The chemiluminescent detection of leptospiral antigen. *Zentbl Bakteriolog* 1992; 277: 300-08.

- Pavli A, Maltezou HC. Travel-acquired leptospirosis. *J Travel Med* 2008; 15: 447-53.
- Payne KS, Klein TA, Otto JL, Kim HC, Chong ST, Ha SJ, Gu SH, Jeong JH, Baek LJ, Song JW. Seasonal and environmental determinants of leptospirosis and scrub typhus in small mammals captured at a U.S. military training site (Dagmar North), Republic of Korea, 2001-2004. *Mil Med* 2009; 174: 1061-67.
- Petchclai B, Hiranras S, Potha U. Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 672-75.
- Pol S, Bharadwaj R. Evaluation of high performance liquid chromatography purified leptospiral antigen for the diagnosis of leptospirosis. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62: 428-31.
- Qiu XF, Xu HF, Guo ZQ, Wang J, Yan J. Establishment and application of ELISAs based on rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of *Leptospira interrogans*. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008; 37: 592-98.
- Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 215-19.
- Renesto P, Lorvellec-Guillon K, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2200-03.
- Ribeiro RL, Machry L, Brazil JM, Ramos TM, Avelar KE, Pereira MM. Technical improvement to prevent DNA degradation of *Leptospira spp.* in pulsed field gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 289-91.

- Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48: 623-27.
- Roura J. A clinical study of human leptospirosis: A report of 215 cases. *Rev Clin Epidemiol* 1990; 8: 389-92.
- Santín M. Visión de la leptospirosis a escala internacional. *Rev Latinoam Microbiología* 2002; 44 (4 supl): 15.
- Sehgal SC, Vijayachari P, Subramaniam V. Evaluation of leptospira micro capsule agglutination test (MCAT) for serodiagnosis of leptospirosis. *Indian J Med Res* 1997; 106: 504-07.
- Sehgal SC, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP. LEPTO dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999a; 93: 161-64.
- Sehgal SC, Vijayachari P, Murhekar MV, Sugunan AP, Sharma S, Singh SS. Leptospiral infection among primitive tribes of Andamana and Nicobar Islands. *Epidemiol Infect* 1999b; 122: 423-28.
- Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13: 249-55.
- Sehgal SC. Leptospirosis in the horizon. *Natl Med J India* 2000; 13: 228-29.
- Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P. Leptospirosis disease burden estimation and surveillance network in India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002a; 33: 1-8.

- Sehgal SC, Biswas D, Vijayachari P, Sagunan AP, Roy S. Molecular tools in leptospirosis diagnosis and characterization of isolates. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002b; 34: 1-7.
- Sehgal SC, Vijayachari P, Sagunan AP, Umapathi T. Field application of Lepto Lateral Flow for rapid diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 2003; 52: 897-901.
- Senthilkumar TM, Subathra M, Ramadass P, Ramaswamy V. Serodiagnosis of bovine leptospirosis by IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex Agglutination Test. *Trop Anim Health Prod* 2009; 14: 34-40.
- Severin WP. Látex agglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis. *J Clin Path* 1972; 25: 1079-82.
- Sharma S, Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Leptospiral carrier state and seroprevalence among animal population a cross sectional sample survey in Andaman and Niccobar Islands. *Epidemiol Infect* 2003; 131: 985-89.
- Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 650-55.
- Singh SS, Vijayachari P, Sinha A, Sugunan AP, Rasheed MA, Sehgal SC. Clinico-epidemiological study of hospitalized cases of severe leptospirosis. *Indian J Med Res* 1999; 109: 94-99.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 2006; 6: 95.

- Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira spp.* against culture and Leptospira-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 361-66.
- Slack AT, Galloway RL, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Reclassification of *Leptospira meyeri* serovar Perameles to *Leptospira interrogans* serovar Perameles through serological and molecular analysis: evidence of a need for changes to current procedures in *Leptospira* taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59: 1199-203.
- Smits HL, Ananyina YV, Cheresky A, Dancel L, Lai AFRF, Chee HD, Levett PN, Masuzawa T, Yanagihara Y, Muthusethupathi MA, Sanders EJ, Sasaki DM, Domen H, Yersin C, Aye T, Braag sl, Gussenhoven GC, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. International multicentre evaluation of clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2904-09.
- Smits HL, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. International multicentre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. *Trop Med Int Health* 2000a; 5: 124-28.
- Smits HL, van der Hoorn MAWG, Goris MGA, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2000b; 38: 1272-75.
- Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gasem MH, Yersin C, Sasaki D, Pujianto B, Vestering M, Abdoel TH, Gussenhoven GC. Lateral Flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immun* 2001a; 8: 166-69.
- Smits HL, Chee HD, Eapen K, Kuirakose M, Sugathan S, Gasem MH, Yersin C, Sasaki D, Lai-a-Fat RF, Hartskeerl RA, Liesdek B, Abdoel TH, Goris MAG,

Gussenhoven GC. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Trop Med Int Health* 2001b; 6: 114-18.

- Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwattanaporn A, Chueasuwanchai S, Day NP, Peacock SJ. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 695-97.
- Sohan L, Shyamal B, Kumar TS, Malini M, Ravi K, Venkatesh V, Veena M, Lal S. Studies on leptospirosis outbreaks in Peddamandem Mandal of Chittoor district, Andhra Pradesh. *J Commun Dis* 2008; 40: 127-32.
- Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 2000; 19: 86-94.
- Speelman P. Leptospirosis. En: *Principios de medicina interna de Harrison*. 14 ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2000. p. 1187-90.
- Spichler AS, Vilaça PJ, Athanazio DA, Albuquerque JO, Buzzar M, Castro B, Seguro A, Vinetz JM. Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 911-14.
- Stark K, Niedrig M, Biederbick W, Merkert H, Hacker J. Climate changes and emerging diseases. What new infectious diseases and health problem can be expected? *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2009; 52: 699-714.
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 247-55.

- Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiol Infect* 2009; 8: 1-12.
- Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Roy S, Manickam P, Natarajaseenivasan K, Gupte MD, Sehgal SC. Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. *Indian J Med Res* 2009; 130: 67-73.
- Svircev Z, Marković SB, Vukadinov J, Stefan-Mikić S, Ruzić M, Doder R, Fabri M, Canak G, Turkulov V, Stojanović DB, Draganić M. Leptospirosis distribution related to freshwater habitats in the Vojvodina region (Republic of Serbia). *Sci China C Life Sci* 2009; 52: 965-71.
- Takashima I, Ngoma M, Hashimoto N. Antimicrobial effects of a new carboxyquinolone drug, Q-35, on five serogroups of *Leptospira interrogans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 901-02.
- Topic MB, Habus J, Milas Z, Tosev EC, Stritof Z, Turk N. Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 21: 15-23.
- Trivedi SV, Vasava AH, Patel TC, Bhatia LC. Cyclophosphamide in pulmonary alveolar hemorrhage due to leptospirosis. *Indian J Crit Care Med* 2009; 13: 79-84.
- Trueba GA, Bolin CA, Zuerner RL. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1992; 174: 4761-68.
- Tullu MS, Karande S. Leptospirosis in children: A review for family physicians. *Indian J Med Sci* 2009; 63: 368-78.
- Van Eys GJJM, Gerritsen MJ, Korver H, Schoone GJ, Kroon CCM, Terpstra WJ. Characterization of serovars of the genus *Leptospira* by DNA hybridization with

hardjobovis and icterohaemorrhagiae recombinant probes with special attention to serogroup Sejroe. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1042-48.

- Vasconcellos FA, Coutinho ML, da Silva EF, Fernandes CP, Monte LG, Seyffert N, Dellagostin OA, Aleixo JA. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 24: 29-34.
- Verdasquera D. Algunos estudios de campo sobre Leptospirosis realizados en la Ciudad de La Habana como parte del TCC. [disertación]. Citado en el Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso/Cubano de Microbiología y Parasitología y IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Palacio de Convenciones. Ciudad de La Habana. Cuba. 2009.
- Victoriano AF, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong BL, Gongal G, Hall J, Coulombe CA, Yanagihara Y, Yoshida S, Adler B. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 147.
- Vieira ML, Pimenta DC, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, Nascimento AL. Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* Virulent Strain. *Open Microbiol J* 2009; 7: 69-74.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Evaluation of microscopic agglutination test as a diagnostic tool during acute stage of leptospirosis in high & low endemic areas. *Indian J Med Res* 2001a; 114: 99-106.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Umaphathi T, Sehgal SC. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. *Indian J Med Res* 2001b; 114: 54-58.

- Vijayachari P, Sugunan AP, Sehgal SC. Evaluation of Lepto Tek Dri Dot as a rapid test for the diagnosis of leptospirosis. *Epidemiol Infect* 2002; 129: 617-21.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Murhekar AR, Sharma S, Sehgal SC. Leptospirosis among schoolchildren of the Andaman - Nicobar Islands, India: low levels of morbidity and mortality among pre-exposed children durin an epidemic. *Epidemiol Infect* 2004; 141: 1-6.
- Vijayachari P, Sehgal SC. Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospire. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 320-22.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 2008; 33: 557-69.
- Vinetz JM, Wilcox BA, Aguirre A, Gollin LX, Katz AR, Fujioka RS, Maly K, Horwitz P, Chang H. Beyond disciplinary boundaries of leptospirosis as a model of incorporating transdisciplinary approaches to understand infectious disease emergence. *EcoHealth* 2005; 2: 1-16.
- Whitney EA, Ailes E, Myers LM, Saliki JT, Berkelman RL. Prevalence of and risk factors for serum antibodies against *Leptospira* serovars in US veterinarians. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 938-44.
- Woo THS, Patel BKC, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF. Identification of pathogenic *Leptospira* by TaqMan probe in a lightcycler. *Anal Biochem* 1998a; 256: 132-34.
- Woo THS, Patel BKC, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Weyant RS. Identification of *Leptospira inadai* by continuous monitoring of fluorescence during rapid cycle PCR. *System Appl Microbiol* 1998b; 21: 89-96.

- Woo THS, Patel BKC, Cinco M, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML. Identification of *Leptospira biflexa* by real time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. J Microbiol Meth 1999; 35: 23-30.
- Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira spp.*: lessons learned from the genomes. Microbes Infect 2009; 11: 328-33.
- Yamashiro-Kanashiro EH, Benard G, Sato MN, Seguro AC, Duarte AJS. Cellular immune response analysis of patients with leptospirosis. Am J Trop Med Hyg 1991; 45: 138-45.
- Yan W, Faisal SM, McDonough SP, Divers TJ, Barr SC, Chang CF, Pan MJ, Chang YF. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. Microbes Infect 2009; 11: 230-37.
- Yasuda PH, Sakata EE, Shikanai-Yasuda MA, Vasconcelos S.A, Romero E. C., da Silva M. V., Carrasco S. Evaluation of counterimmunoelectrophoresis with antigens of *Icterohaemorrhagiae* and Patoc serovars in the serodiagnosis of human leptospirosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1991; 33: 497-502.
- Yersin C, Bovet P, Smits HL, Perolat P. Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. Trop. Med Int Health 1999; 4: 38-45.
- Yersin C, Bovet P, Mérien F, Clément J, Laille M, Van Ranst M, Perolat P. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 71-76.

- Yuri K, Takamoto Y, Okada M, Hiramune T, Kikuchi N, Yanagawa R. Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. *Infect Immun* 1993; 61: 2270-72.
- Zhao W, Chen CY, Zhang XY, Lai WQ, Hu BY, Zhao GP, Qin JH, Guo XK. Molecular characterization of the pL40 protein in *Leptospira interrogans*. *Can J Microbiol* 2009; 55: 739-49.
- Zaki SR, Shieh WJ. The Epidemic Working Group. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet* 1996; 347: 535.
- Zuerner RL, Alt D, Bolin CA. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensu lato*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3284-89.
- Zuerner RL, Bolin CA. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2612-17.

Producción científica de la autora, relacionada con el tema de tesis (2002-2009)

- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Pérez M. Valor práctico de la MAT en pacientes con bajos títulos de anticuerpos IgG a leptospirosas. *Rev Latinoamericana de Microbiología* 2002; 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- Hurtado I, **Obregón AM**, Fernández C. Caracterización clínica epidemiológica y de laboratorio en pacientes con sospecha de Leptospirosis ingresados en el IPK (enero-junio de 2002). *Rev Latinoamericana de Microbiología* 2002; 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández N, Enrique G. Importancia de la confirmación microbiológica en un brote de leptospirosis humana en la ciudad de Villa Clara. *Rev Latinoamericana de Microbiología* 2002; 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez I. Confirmación microbiológica de un brote de leptospirosis humana en la provincia de Villa Clara. *Rev Cubana Med Trop* 2003. 55 (2): 96 - 99.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Impacto práctico del uso de la técnica de MAT en la detección de bajos títulos de anticuerpos IgM e IgG en pacientes con Leptospirosis confirmada. *Rev Bioquímica* 2004. 29 (No especial): 89.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B. Lepto Dip stick y Lepto Tek Dri Dot técnicas útiles en el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana en Cuba. *Rev Bioquímica* 2004. 29 (No especial): 90.
- **Obregón AM**, Martínez B, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Lepto Tek Lateral Flow: tecnología serológica de avanzada para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana en Cuba. *Rev Bioquímica* 2004. 29 (No especial): 91.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez J, Rodríguez I, Martínez B, Barrios R. Application of advanced serological technologies in Cuba, to confirm human leptospirosis. *Int J Infect Dis* 2004; 8 (suppl. 1): S129 - S130.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B, Balbis Y. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de leptospirosis en Cuba. *J Public Health* 2004;16 (4): 259-265.
- Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, **Obregón AM**, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE, Martínez MB. Manual for the International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. KIT-IPK, 2004: 1-109.

- Martínez R, Pérez A, Quiñones MC, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, Fernández C, Menéndez J, Rodríguez I, Baró M, Díaz M, Rodríguez J, Sierra G, **Obregón AM**, Toledo ME, Fernández N. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *J Public Health* 2004. 15 (4): 249-55.
- Martínez B, **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez J, Rodríguez I. Lepto Tek Lateral Flow: un método para el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2005; 43 (1): 0-0. [Disponible en: World Wide Web:<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-17512005000100010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0253-1751].
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Viera J. "Aglutinación en látex un método de pesquisaje para la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Bioquímica* 2005. 30, Suplemento 2.
- Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, **Obregón AM**, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE, Martínez MB. Manual for the International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. KIT-IPK, 2006: 1-109.
- Fernández C; **Obregón AM**, Editorial. Tercer Taller y Tercera Reunión Científica Internacional "Leptospirosis Habana 2006". *Rev Cubana Med Trop* 2007. 59 (1).
- Rodríguez I; Fernández C; **Obregon AM**; Rodríguez J; Rodríguez N; Berdasquera D; Llop A. Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 2007. 59 (1).
- Berdasquera D; Rodríguez I; **Obregon AM**; Fernández C; Segura R; Bistaball EC; Sanchez C. Brote de leptospirosis humana en la provincia de Guantánamo. *Rev Cubana Med Trop* 2007. 59 (1).
- Zamora Y; Fernández C; Rodríguez I; **Obregon AM**; Rodríguez J; Rodríguez N. Método de la PCR en la detección temprana de *Leptospira spp* en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* 2007. 59 (1).
- **Obregon AM**; Fernández C; Rodríguez I; Rodríguez J; Zamora Y; Berdasquera D. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 2007. 59 (1).
- Berdasquera D; Fernández C; **Obregon AM**; Galindo B. Leptospirosis humana en la atención primaria de salud: pautas para su prevención y control. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2007. 23 (3).

- Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, **Obregón AM**, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE, Martínez MB. Manual for the International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. KIT-IPK, 2008: 1-109.
- Berdasquera D, Barrera YB, Barroso Y, **Obregón AM**, Fernández C. Factores asociados a la morbilidad por leptospirosis. Ciudad de La Habana 2005 – 2006. Rev Panamericana de Infectología 2009. (aceptada).

Producción científica de la autora, no incluida en el tema de tesis (1999-2005)

- **Obregón AM**, López C, Martell M. Evaluación de tres variantes de la técnica de Hemaglutinación indirecta para el diagnóstico de la leptospirosis humana. Rev Cub Med Trop 1999. 51 (1).
- Arzola A, Arias R, Fernández C, Rodríguez J, Rodríguez I, **Obregón AM**, Díaz R, Zamora Y, Duarte C, Victoria B. Identificación de leptospiras patógenas y no patógenas por PCR-REA. Avances en Biotecnología Moderna 1999. 5: D32.
- Arzola A, Lezcano M, Fernández C, Rodríguez J, **Obregón AM**, Rodríguez I, Díaz R, Zamora Y, Victoria B. Diferentes métodos de extracción del ADN leptospiral, útiles en ensayos de PCR. Avances en Biotecnología Moderna 1999. 5: D33.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Victoria B, Rodríguez J, Arzola A, Martínez G, Llop A, Martínez R. Revolución Científico Técnica en el conocimiento etiológico de la leptospirosis humana en Cuba. Avances en el último quinquenio del siglo XX. Boletín Epidemiológico Semanal IPK 1999. 9(41): 321.
- Rodríguez I, **Obregón AM**, Rodríguez J, Arzola A, Martínez R, Fernández C, Victoria B, Martínez G. Detección de anticuerpos involucrados en la respuesta inmune contra la leptospirosis humana durante una infección natural y la aplicación de una vacuna de producción nacional. Avances en Biotecnología Moderna 1999. 5: V12.
- **Obregón AM**, Martínez R, Martínez G, Rodríguez J, Rodríguez I, Arzola A, Fernández C, Victoria B, Llop A, Bravo J. Estudio inmunogénico de las fases I y II de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Avances en Biotecnología Moderna 1999. 5: V5.
- Victoria B, Fernández C, **Obregón AM**, Rodríguez I, Rodríguez J, Arzola A, Martínez G. Antígenos involucrados en la respuesta inmune contra la infección por *Leptospira interrogans* serovar canicola. Avances en Biotecnología Moderna 1999. 5: D16.

- Rodríguez I, Rodríguez JE, Fernández C, **Obregon AM**. Leptospirosis humana en Cuba. Un acercamiento al conocimiento de sus principales reservorios. Boletín Epidemiológico Semanal IPK 2002. 12 (1).
- Victoria B, Fernández C, Rodríguez J, **Obregon AM**, Rodriguez I. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. Rev Cubana Med Trop **2002**. 54(1): 48-51.
- **Obregon AM**, Martinez R, Martinez G, Llop A. Respuesta serológica por ELISA y MAT en voluntarios inmunizados con vax SPIRAL. Rev Latinoamericana de Microbiología. **2002**. 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- **Obregon AM**, Rodriguez I., Fernandez C, Rodríguez J, Saltarén A. Estudio de cepas cubanas de *L. interrogans* sensu lato usando anticuerpos monoclonales. Relevancia de esta tecnología en el diagnostico microbiológico y epidemiológico en Cuba. Rev Latinoamericana de Microbiología. **2002**. 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- Martínez R, Pérez A, **Obregon AM**, Rodríguez I, Baly A, Baró M, Rodríguez J, Bermond D. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna cubana inactivada trivalente contra la leptospirosis humana según diferentes esquemas. Rev Cubana Med Trop 2002. 54 (1): 37-43.
- Rodríguez I, **Obregon AM**, Rodríguez JE, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas de pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol 2002. 40(1): 11-15.
- Rodríguez I, Fernández C, Llerena C, Victoria B, Rodríguez JE, **Obregon AM**. Lepto dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop 2002. 54(1): 44-7.
- Rodríguez J, **Obregon AM**, Fernández C, Rodríguez I. Nuevas tecnologías introducidas en función de la prevencion y control de la Leptospirosis humana en Cuba. Rev Latinoamericana de Microbiología 2002. 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- Martínez B, **Obregon AM**, Fernández C, Rodríguez I. Leptospirosis Humana. Diagnóstico mediante tres técnicas serológicas en Cuba. Rev Latinoamericana de Microbiología 2002. 44 (4): Oct-Dic Suppl.
- Rodriguez I, Yundart A, Otero A, Rodriguez J, Fernandez C, **Obregon AM**. Standarization and evaluation o fan UMELISA test for detecting IgG antibodies associated with Human Leptospirosis. Rev. Biotecnología Aplicada 2003. Suppl. No especial, ID: 60.

- **Obregón AM**, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C. Resultados de laboratorio de la evaluación de la inmunogenicidad por ELISA y MAT de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Bioquímica* 2004. 29 (No especial): 92.
- **Obregón AM**, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C. Primer estudio serológico de evaluación de la inmunogenicidad por ELISA y MAT de los voluntarios de Fases I y II incluidos en el protocolo de la vacuna cubana contra la Leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 2004. 56 (2). 148-51.
- **Obregón AM**, Saltarén A, Rodríguez J, Rodríguez I, Fernández C. First approach in Cuba about the classification of leptospire strains by monoclonal antibodies. *Int J Infect Dis* 2004. 8 (suppl. 1): S129.
- Rodríguez I, Martínez R, Zamora Y, Rodríguez JE, Fernández C, **Obregón AM**. Respuesta de anticuerpos IgG antileptospira en individuos inmunizados con vax-SPIRAL. *Rev Cubana Med Trop* 2005. 57 (1): 32-7
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, LLanes R, Hernández I. Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana en serovares de referencia de leptospiras. *Bioquímica* 2005. 30, Suplemento 2.
- **Obregón AM.**, Fernández C., Rodríguez I., Rodríguez J., LLanes R., Hernández I. Desarrollo de un método para determinar la CMI en cepas de referencia de leptospiras. *Rev Cubana Med Trop* 2005. 57 (1): 11-6.

Presentaciones en eventos científicos, relacionados con el tema

Nacionales:

- V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, 1997.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Papel del LNR: de leptospiras del IPK, en la red diagnóstica de microbiología.
- XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 2002.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Nuevas tecnologías desarrolladas e introducidas al diagnóstico de leptospirosis humana en Cuba.
- Reunión Nacional "Leptospirosis 2007", LABIOFAM, 2007.
Obregón AM. (Conferencia): Métodos microbiológicos para el diagnóstico de la leptospirosis humana y animal.
- Congreso 70 Aniversario del IPK. VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical, 2009.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez Y, Rodríguez J, Valdes Y. (Mesa Redonda). Abordaje clínico, epidemiológico y microbiológico de la leptospirosis humana en Cuba.

Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez Y, Rodríguez J, Valdes Y. Impacto de las tecnologías serológicas rápidas en el diagnóstico de la leptospirosis humana.

Internacionales:

- VIII Congreso Panamericano. X Congreso Brasileiro de Infectología, 1997.
Martínez R, **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I. Evaluación de la reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana.
- I Simposio Internacional de Control Biológico y Taller Leptospira 97, 1997.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Mesa Redonda: Leptospirosis humana y su importancia en la salud humana. Diagnóstico convencional.
- I Congreso Internacional de Infectología. IV Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología, 1999.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Mesa Redonda: Diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana. Situación en Cuba.
- Biotecnología Habana 99, 1999.
Obregón AM, Martínez R, Llop A, Martínez G, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Estudio inmunogénico de las Fases I y II de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana.
- Taller y Reunión Científica Internacional “Leptospirosis 2001”, 2001.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B. Lepto Dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B, Perez M. Papel de la técnica de MAT en el diagnóstico serológico de la leptospirosis humana.
- III Internacional Meeting of Leptospirosis Society, 2002.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B. Evaluation of a rapid Lepto Tek Lateral Flow, Lepto Dipstick and Lepto Tek Dri Dot Technologies for detection of immunoglobulin M, and G in sera.
- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical, 2002 y en el XXVII Congreso Mexicano de Química Clínica y Expolab XXVII, 2004.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B, Perez M. Valor práctico de la técnica de MAT en pacientes con bajos títulos de anticuerpos IgM e IgG a leptospirosis.
- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical, 2002.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Confirmación microbiológica de un brote emergente de leptospirosis humana en la provincia de Villa Clara.
- XXVII Congreso Mexicano de Química Clínica y Expolab XXVII, 2004.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Barrios R. Lepto Dipstick y Lepto Tek Dri Dot: técnicas útiles en el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba.
- **Obregón AM**, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B. Lepto Tek Lateral Flow: tecnología serológica rápida en el diagnóstico de la leptospirosis humana.

- II International Congress on Infectious Diseases (ISID), 2004.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Application of advanced serological Technologies in Cuba to confirm human leptospirosis.
- II Taller y Reunión Científica Internacional “Leptospirosis Habana 2004”, 2004.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Balbis Y. Sistema latex una tecnología útil para el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana.
- XXVIII Congreso Mexicano de Química Clínica y Expolab XXVIII, 2005.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Balbis Y. Sistema de aglutinación con látex, para el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba.
- 5th Meeting of the Internacional Leptospirosis Society, 2006.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Balbis Y. Evaluation of a latex-pool for the screening of human leptospirosis in Cuba.
- III Taller y Reunión Científica Internacional “Leptospirosis Habana 2006”, 2006.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Balbis Y. Avances de laboratorio en el diagnóstico serológico y la investigación de la leptospirosis humana en Cuba.
- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, 2007.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J. Técnicas novedosas para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis humana.
- VI Congreso Argentino de Zoonosis. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis, 2008.
Zamora Y, Fernández C, Rodríguez I, **Obregón AM**, Rodríguez J. Amplificación de un fragmento de ADN leptospiral extraído de muestras clínicas procedentes de pacientes con leptospirosis.
- IV Taller y Reunión Científica Internacional “Leptospirosis Habana 2008”, 2008.
Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Balbis Y. Impacto de las tecnologías rápidas para el diagnóstico de la leptospirosis humana en Cuba.

Resultados científicos relacionados con el tema

- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Caracterización de un brote emergente de Leptospirosis humana en la provincia de Villa Clara. **1997. Autora principal.**
- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Caracterización serológica de cepas de *Leptospira interrogans* aisladas de procesos invasivos. **1998. Autora**
- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Revolución científica técnica en el conocimiento etiológico de la Leptospirosis humana en Cuba. Avances en el último quinquenio del siglo XX. **1999. Autora principal.**
- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Evaluación de la eficacia de la vacuna cubana vax Spiral contra la leptospirosis humana en municipios seleccionados de la provincia de Villa Clara. Habana. Cuba. **2001. Autora.**
- **Logro de la ACC (2003).** vax-SPIRAL®, vacuna antileptospirósica trivalente para uso en humanos, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. **2003. Autora.**

- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Contribución de laboratorio al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. **2006. Autora principal.**
- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Alerta Epidemiológica sobre el potencial zoonótico de mórvidos. **2007. Resultado Clasificado. Autora.**
- **Resultado Relevante Consejo Científico del IPK.** Contribuciones a la prevención y control de la leptospirosis humana y otros países de la región. **2008. Autora.**

Premios

- **Ponencia Relevante en el XI Forum de Ciencia y Técnica del IPK (2001).** Evaluación de la eficacia de la vacuna cubana vax Spiral contra la leptospirosis humana en municipios seleccionados de la provincia de Villa Clara. Habana. Cuba. **2001. Autora.**
- **Ponencia Relevante en el XI Forum de Ciencia y Técnica Municipal (2001).** Evaluación de la eficacia de la vacuna cubana vax Spiral contra la leptospirosis humana en municipios seleccionados de la provincia de Villa Clara. Habana. Cuba. **2001. Autora.**
- **Premio en el Evento Provincial de las BTJ-CENEDI (2002).** Caracterización serológica de cepas de *Leptospira interrogans* aisladas de procesos invasivos. **Autora.**
- **Premio al Mejor Trabajo Científico en el Simposio sobre Leptospiras del Congreso Internacional de la ALAM (2002).** Estudio de variantes de MAT para el diagnóstico de la leptospirosis humana. **Autora principal.**
- **Logro Academia de Ciencias de Cuba: Vax –SPIRAL®** vacuna cubana trivalente antileptospirósica para uso en humanos. **(2003). Autora.**
- **Ponencia Relevante en el XVI Forum de Ciencia y Técnica del IPK (2006).** Primer sistema de aluminación con látex útil en la pesquisa rápida de la leptospirosis humana en Cuba. Ponencia RELEVANTE. **Autora principal.**
- **Ponencia Relevante en el XVI Forum de Ciencia y Técnica Municipal (2006).** Primer sistema de aluminación con látex útil en la pesquisa rápida de la leptospirosis humana en Cuba. Ponencia RELEVANTE. **Autora principal.**
- **Ponencia Relevante en el XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica (2006).** Primer sistema de aluminación con látex útil en la pesquisa rápida de la leptospirosis humana en Cuba. Ponencia RELEVANTE. **Autora principal.**
- **Ponencia Relevante en el XVIII Forum de Ciencia y Técnica del IPK (2008).** Contribuciones a la prevención y control de la leptospirosis humana y otros países de la región. **Autora.**
- **Ponencia Relevante en el XVIII Forum de Ciencia y Técnica Municipal (2008).** Contribuciones a la prevención y control de la leptospirosis humana y otros países de la región. **Autora.**
- **Ponencia Relevante en el XVIII Forum de Ciencia y Técnica Provincial (2008).** Contribuciones a la prevención y control de la leptospirosis humana y otros países de la región. **Autora**

Tesis relacionadas con el tema presentado:

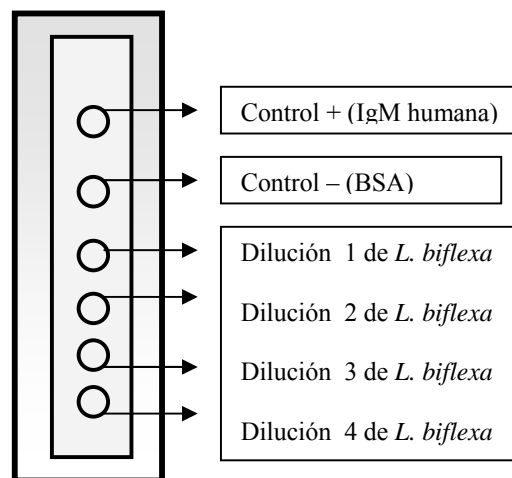
- Estudio de una variante de la técnica de MAT y su uso en el diagnóstico de la Leptospirosis humana. Habana. 2002. Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología Micología. Cuba.
- Elaboración de un látex de producción nacional para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana. Habana. 2002. Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología Micología. Cuba.
- Estudio clínico, epidemiológico y de laboratorio de pacientes sospechosos de Leptospirosis humana ingresados en el hospital IPK. (enero- junio del 2002) Habana. 2002. Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología Micología Cuba.
- Validación del sistema látex para el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana. Habana. 2002. Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología Micología. Cuba.
- LEPTOVIM: una nueva herramienta para la vigilancia de laboratorio de la Leptospirosis humana. Habana. 2002. Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología Micología. Cuba.
- Estudio de diferentes sistemas látex útiles para el diagnóstico de la Leptospirosis humana en Cuba. 2004. Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología Micología. Cuba.
- Aplicación del primer diagnosticador cubano Lepto-Cuba, en la pesquisa rápida de leptospirosis humana. 2006. Proyecto de Grado. Cuba.
- Aplicación del método del calentamiento para la extracción de ADN genómico en cepas de referencias de leptospiras. Cuba. 2006. Proyecto de grado. Cuba.

Anexo 1

Instructivo del estuche comercial: Dip-S-Ticks[®]-IgM , para la pesquisa rápida de leptospirosis humana

(PANBIO INDX, INC. 1756 Sulphur Spring Road, Baltimore, MD. 21227, USA)

Dip-S-Ticks[®]-IgM constituye un ensayo inmunoenzimático, donde se acopla un antígeno específico para leptospiras (obtenido a partir de la cepa Patoc I del serovar Patoc, de la especie *L. biflexa*) en una membrana de nitrocelulosa. El antígeno usado reconoce una amplia gama de anticuerpos producidos por la mayoría de los serovares de leptospiras. Al añadir las muestras clínicas al soporte se observan bandas de variables coloraciones que permiten definir la existencia de los anticuerpos específicos. El estuche comercial de Dip-S-Ticks[®]-IgM tiene de 10 a 15 tirillas conservadas en bolsas con preservantes (PANBIO INDX, INC. 1756 Sulphur Spring Road, Baltimore, MD. 21227, USA), también contiene un suero control positivo y otro negativo (albúmina bovina fracción V (BSA), un frasco con el diluyente de la muestra (líquido # 1), el tampón estabilizador (líquido # 2), el conjugado anti-IgM humana unido con la fosfatasa alcalina (líquido # 3) y el sustrato revelador (líquido # 4). Se recomienda almacenar el estuche a una temperatura entre 2 a 8°C, mientras que las laminillas o tirillas se conservan entre 15 a 30°C. En este ensayo no se deben utilizar muestras lipémicas, hemolíticas o contaminadas. La realización de la técnica es compleja, laboriosa, empleando como equipamiento adicional baño de agua de 51°C.



Reactivos

- Tirillas: incluye un control positivo (IgM humana), un control negativo (BSA), y pocillos absorbidos con diferentes concentraciones del antígeno de *L. biflexa*.
- Reactivo 1: diluyente de la muestra: contiene una anti IgG humana obtenida en carnero, con azida sódica como preservante.
- Reactivo 2: líquido lavador: contiene cloruro de sodio y azida sódica como preservante. Se usa para eliminar el material no específico absorbido a la tirilla. Además tiene la función de estabilizar la unión del antígeno y el anticuerpo.
- Reactivo 3: conjugado: contiene la enzima fosfatasa alcalina conjugada con una anti IgM humana (específica a leptospira). El biológico es obtenido en carnero. El conjugado tiene un buffer con un estabilizador comercial.
- Reactivo 4: líquido revelador: contiene 5 bromo - 4 cloro - indol fosfato y el p-nitro azul cloruro de tetrazolio, ambos diluidos con azida sódica como preservante.

Marcha técnica

- Sacar los reactivos del refrigerador y colocarlos por 15 min a temperatura de laboratorio.
- Identificar la tira con el # del suero.
- Rotular 4 cubetas, con los números: 1, 2, 3, y 4.
- Adicionar a la
 - cubeta # 1 : 2 mL del reactivo 1.
 - cubeta # 2 : 2 mL del reactivo 2.
 - cubeta # 3 : 2 mL del reactivo 3.
 - cubeta # 4 : 2 mL del reactivo 4.
- En un Beaker colocar suficiente agua destilada para cubrir la tirilla por encima de la inserción (el agua se cambiará en cada lavado).
- Humedecer la tirilla por inmersión durante tres min, moviéndola de 10 a 15 veces de arriba para abajo.
- Sacudir la tirilla y eliminar el exceso de agua.
- Adicionar según el hoyuelo, 10 μ L de suero control positivo, 10 μ L del negativo, y 10 μ L de la muestra (adicionar 20 μ L si se trata de sangre total).

- Sumergir la tirilla en la cubeta 1, por 5 min.
- Enjuagar la tirilla con suficiente agua destilada, introduciendo y retirando la misma varias veces (de 6 a 10 seg cada vez).
- Sumergir la tirilla en la cubeta 2, introduciéndola y retirándola durante 5 min.
- Enjuagar la tirilla con suficiente agua destilada, introduciendo y retirando la misma varias veces (de 6 a 10 seg cada vez).
- Sumergir la tirilla en la cubeta 3, introduciéndola y retirándola por 6 a 10 veces durante 15 min.
- Enjuagar la tirilla en el Beaker con agua destilada, introduciendo y retirando varias veces (de 6 a 10 seg cada vez).
- Dejar la tirilla en agua destilada durante 5 min.
- Sumergir la tirilla en la cubeta 4, introduciéndola y retirándola de 6 a 10 veces durante 5 min.
- Enjuagar la tirilla con agua destilada, introduciéndola y retirándola varias veces, de 6 a 10 seg cada una.
- Esperar que se seque la tirilla.

NOTA: Toda la reacción serológica se realiza a la temperatura de 51°C. Las lecturas deben realizarse cuando estén secas las tirillas. No usar medios artificiales para el secado de la tirilla, solo un ventilador es aceptable.

Interpretación

Resultado positivo: observación fácil de un punto de color azul púrpura. El perímetro exterior del círculo debe ser de color gris blanco.

Resultado intermedio: observación de un punto de color azul púrpura de tonalidad débil. El perímetro exterior del círculo debe ser alrededor de 0,5mm (ejm: prueba positiva cuando el punto es mayor que 2,0 pero menor que 3,0; o mayor que 3,0 y menor que 4,0 mm)

Resultado negativo: si no se observa ningún punto con coloración.

Nota: para que la prueba sea válida, se tomaran en consideración los controles (positivo y negativo) de la tirilla.

Anexo 2

Instructivo del estuche comercial: LEPTO Dipstick, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana

(Organon Tecknika Ltd. Farnham Drive. Finglas Road. Finglas. Dublín 11. Holanda)

Reactivos

Vial A: fluido de reconstitución.

Vial B: reactivo de detección liofilizado.

Vial C: fluido LEPTO Dipstick

Tirillas

Utensilios necesarios

Microtubos

Contenido de cada estuche

Cada estuche contiene 20 tirillas y tres frascos (viales A, B y C). Estas cantidades están fijadas para el análisis de 20 sueros.

Almacenamiento

Los reactivos del estuche deben ser preferentemente guardados a temperaturas de 4°C y hasta 25°C, en un lugar seco y protegidos de la acción directa de la luz. Si el almacenamiento es a temperaturas de 37°C, se aconseja como tiempo de vida límite del estuche seis meses. El reactivo de reconstitución (vial A) puede ser almacenado a 4°C y hasta 25°C por 6 meses. En general no son aconsejables exposiciones a temperaturas de 37°C, ni siquiera por cortos períodos de tiempos.

Fecha de vencimiento

La fecha de vencimiento aparece impresa en el borde derecho inferior de cada estuche.

Precauciones para su uso

Las muestras clínicas (sangre y suero) deben ser cuidadosamente manipuladas por ser un gran potencial infeccioso. Todo el equipamiento y los materiales del estuche después de terminada la

prueba, deben ser eliminados, según las normas establecidas en el laboratorio. Los sueros inactivados a 56°C pueden ser empleados en este ensayo.

Colección de las muestras

Los sueros deben ser colectados de la forma rutinaria que se realiza en los laboratorios clínicos.

Marcha técnica

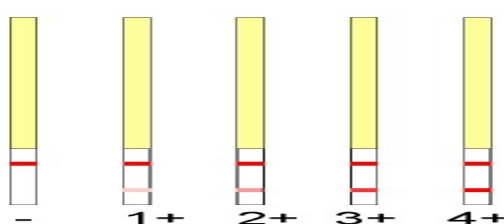
1. Abrir los viales A y B. Añadir 5 mL del fluido de reconstitución (vial A) y adicionarlos en el vial B (reactivo de detección liofilizado). Cerrar el vial B y mezclar suavemente hasta lograr una suspensión homogénea (debe realizarse por 5 ó 10 min).
2. Transferir 250 µL del reactivo de detección reconstituido al microtubo.
3. Añadir 5 µL de suero en el microtubo y mezclar suavemente.
4. Abrir el vial C.
5. Tomar por la parte amarilla la tirilla.
6. Sumergir la tirilla en el vial C durante 1 min. Eliminar el exceso de líquido escurriendo o sacudiendo la tirilla suavemente, no usar ni papel de filtro, ni servilletas de laboratorio.
7. Transferir y sumergir la tirilla al microtubo (donde están el reactivo de detección y el suero). Incubar a temperatura de laboratorio por dos horas a 37°C. Jamás por más tiempo.
8. Los viales B y C deben ser guardados por su uso posterior.
9. Después de terminado el tiempo de incubación, sacar la tirilla y lavarla cuidadosamente con agua, asegurando haber eliminado todas las trazas adheridas a la misma.
10. Dejar secar la tirilla colocándola en papel de filtro a temperatura de laboratorio.
11. Realizar la lectura e interpretación de los resultados. Si la zona control de la tirilla no aparece coloreada, no es válida la reacción. La intensidad de coloración de la zona control, variará en dependencia de la muestra, pero en la mayoría debe estar en el rango desde las tres cruces.

Para interpretar la reacción del LEPTO Dipstick, se toma en cuenta la intensidad de la coloración de la banda inferior. Cuando la intensidad de esa banda es de dos, tres o cuatro cruces, se confirma la existencia de una leptospirosis reciente, pero si es de una cruz o existe una ausencia total de coloración, la reacción se interpreta como negativa. No obstante, sí la sospecha clínica

persiste, se tomará una segunda muestra y se repetirá el ensayo, empleando ambas muestras de forma simultánea. Si la zona control de la tirilla no aparece coloreada, la reacción se considera no válida. La intensidad de coloración de la zona control variará de muestra en muestra, pero en la mayoría se observará en el rango de las tres cruces (Sehgal *et al.*, 1999a; Smits *et al.*, 2000a).

Resumiendo:

- ⇒ La observación de dos, tres y cuatro cruces, definen una leptospirosis reciente.
- ⇒ La observación de una cruz o ninguna coloración es equivalente a una reacción negativa.



- y 1+: resultado negativo

2, 3 y 4+: resultado positivo

Limitaciones para su uso

Como sucede para cualquier diagnóstico de laboratorio, el resultado por esta prueba, debe estar acompañado por las consideraciones clínicas, epidemiológicas y el uso de la técnica de referencia internacional (MAT).

Los anticuerpos a leptospiras usualmente comienzan a ser detectables a partir del quinto día después de la aparición de los primeros síntomas. Hay que tener presente que en algunos pacientes este fenómeno ocurre más tardíamente, y que el tratamiento temprano con altas dosis de antibióticos, puede suprimir la producción de anticuerpos y afectar la sensibilidad del método.

Las reacciones falsas positivas pueden ocasionalmente ocurrir, en sueros de pacientes con otras patologías. En estos casos, aparece una coloración muy débil en la banda inferior de la tirilla. Por todo lo anteriormente expuesto, resulta aconsejable utilizar la técnica de MAT para la confirmación final del diagnóstico.

Anexo 3

Instructivo del estuche comercial: Lepto Tek Dri Dot, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana

(Organon TecknikaLtd. Farnham Drive. Finglas Road. Finglas. Dublín 11. Holanda)

Presentación

Cada estuche contiene 30 tarjetas y 30 espátulas, que permitirán el análisis de 30 sueros.

Almacenamiento

Los estuches deben ser almacenados a temperaturas de 2°C y hasta 25°C, en un lugar seco y protegidos de la exposición a la luz solar.

Fecha de vencimiento

Cada lote de producción presenta la fecha de vencimiento, impresa en la cubierta de cada caja.

Precauciones para su uso

Las muestras deben ser cuidadosamente manipuladas, ya que son un gran potencial infeccioso. Todo el equipamiento y los materiales del estuche después de terminada la prueba, deben ser eliminados según las normas establecidas en el laboratorio.

Colección de las muestras

Los sueros deben ser preparados de la misma forma que rutinariamente se obtienen para otros ensayos serológicos. Se recomienda el empleo de muestras frescas, las que pueden almacenarse a -20°C.

Marcha técnica

1. Tomar una tarjeta de Lepto Tek Dri Dot y extraer una espátula plástica del estuche.
2. Añadir 10 µL de suero (cercanamente al botón azul) dentro del área circulada.
3. Homogenizar la mezcla suavemente con la espátula, garantizando que la misma no sobrepase la zona del círculo.
4. rotar suavemente el líquido en suspensión (manteniendo la tarjeta horizontalmente), lo que permitirá la unión entre el conjugado - látex y el suero.

5. Leer los resultados a los 30 seg de haber iniciado la reacción. Nunca leer la prueba después de este tiempo, porque pueden surgir falsos biológicos positivos.

Interpretación de los resultados

La agregación de las partículas de látex, revela que existió aglutinación franca, entre el antígeno y los anticuerpos específicos contra leptospiras del suero problema. Un caso positivo se consideró cuando haya existido aglutinación franca e instantánea antes de los 30 seg de montada la prueba. El negativo se consideró cuando no se evidencia aglutinación entre antígeno y anticuerpo.

5 segundos



15 segundos



45 segundos



>60 segundos



La sensibilidad del sistema es superior para las muestras obtenidas entre el 10^{mo} al 30^{mo} día, de aparecidos los primeros síntomas clínicos de la infección. En estos casos, se observan aglutinaciones muy fuertes a los 30 seg. Los sueros correspondientes a la primera semana de la infección, pudieran falsear el resultado. Si el resultado es negativo (a pesar de haber relación entre la fecha de toma de muestra y de fecha de inicio de los síntomas) y el paciente clínicamente continua con la sospecha, es recomendable el estudio de segunda o terceras muestras. Como sucede para cualquier diagnóstico de laboratorio, el resultado por Lepto Tek Dri Dot, debe estar acompañado por las consideraciones clínicas, epidemiológicas y los hallazgos de laboratorio clínico. Los casos pesquisados por este sistema, deben ser confirmados por la técnica de referencia internacional de MAT.

Anexo 4

Instructivo del estuche comercial: Lepto Tek Lateral Flow, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana

(Organon Tecknika Ltd. Farnham Drive. Finglas Road. Finglas. Dublín 11. Holanda)

Presentación del estuche

Cada bolsa contiene 25 tablillas plásticas y una botella con el reactivo de detección (buffer de corrida) suficiente para el análisis de 25 muestras.

Almacenamiento

Los reactivos de este sistema (según el productor) deben estar conservados a temperaturas desde 2°C y hasta 25°C, en un lugar preferentemente seco y protegido de la exposición directa de la luz.

Fecha de vencimiento

En cada bolsa aparece impresa la fecha en que vencen los reactivos.

Precauciones para su uso

Las muestras deben ser trabajadas cuidadosamente, ya que son fuentes potenciales infecciosas. Los sueros pueden ser usados puros, o inactivados a 56°C por 30 min. La sangre total se emplea en su estado natural. Al finalizar cada ensayo, el equipamiento y los reactivos suministrados, deben ser eliminados según los tratamientos existentes en cada laboratorio.

Colección de las muestras

Los sueros deben ser obtenidos por los métodos rutinarios de laboratorio. Las muestras deben estar frescas y sin contaminaciones.

Marcha técnica

1. Tomar cuidadosamente la tablilla plástica de la bolsa, y colocarla en la meseta de trabajo, donde exista suficiente iluminación.
2. Tomar 5 µL de suero (o 10 µL de sangre total) y colocarlo en la zona "portamuestra" (identificada en la tablilla).
3. Adicionar 130 µL de reactivo de detección (buffer de corrida).

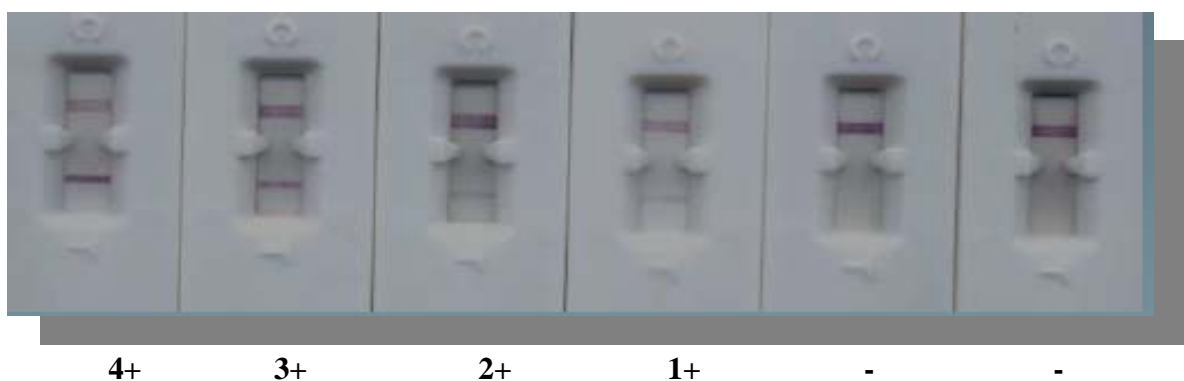
4. Leer los resultados a los 10 min. Los resultados se estabilizan después de transcurrido los 10 min, por lo que se sugiere confirmar la lectura un tiempo después, para evitar los resultados falsos.

Interpretación de los resultados

Si la zona control de la tablilla plástica no aparece coloreada (línea superior), no es válida la reacción. La intensidad de coloración de la zona control variará en dependencia de la muestra, pero en la mayoría de éstas, debe corresponderse con las tres cruces.

Un resultado negativo indica la ausencia de la línea roja en la zona "Test" (observar la presencia de una línea roja en la zona "Control"). En estos casos y si aún existe la sospecha clínica de la enfermedad, deben tomarse una segunda muestra y repetir el ensayo utilizando las dos muestras de forma simultánea.

Un resultado positivo indica la presencia de una línea roja en la zona "Test" (línea inferior) y también coloración roja en la zona "Control". Pueden obtenerse en la zona "Test", dos, tres y cuatro cruces, que definen una leptospirosis reciente. Los resultados obtenidos por esta prueba deben confirmarse por la técnica de referencia internacional (MAT).



- y 1+: resultado negativo

2, 3 y 4+: resultados positivos

Limitaciones de su uso

- ⇒ La sensibilidad de la prueba esta estrechamente relacionada con la intensidad de coloración de la línea "Test", lo cual dependerá de la fase de la enfermedad por la que cursa el paciente y de otros factores técnicos.
- ⇒ Mediante este ensayo se detectan anticuerpos específicos (IgM) contra leptospiras, producidos una semana después de haber aparecido los primeros síntomas de la enfermedad. Una muestra colectada antes de este período puede resultar negativa.
- ⇒ Raramente se han encontrado falsos positivos. Se han visto principalmente en muestras de pacientes con factor reumatoideo.

Anexo 5

Instructivo del estuche comercial: SD Leptospira IgM-IgG, para la pesquisa rápida de leptospirosis humana

(BIO-LINE Standard Diagnostics, INC, 2007, <http://www.standardia.com>)

Principio

La prueba SD Leptospira IgM-IgG, es un ensayo inmunocromatográfico cualitativo y diferencial que detecta anticuerpos IgG o IgM en sueros o plasma humano. Este sistema es propuesto para uso profesional y ayuda a la orientación de los diagnósticos clínicos en pacientes que presenten síntomas clínicos sugerentes de leptospirosis. El resultado obtenido por la prueba debe confirmarse por MAT o ELISA, principalmente.

SD Leptospira IgM-IgG, tiene tres líneas pre-revestidas (línea “G”(línea con anticuerpo anti IgG humano), línea “M”)(línea con anticuerpo anti IgM humano) y línea “C” (línea control)), todas colocadas en la superficie de la membrana.

La línea de control “C” es usada para indicar la validez de la técnica. Una línea con coloración púrpura en “G” o “M” puede ser visible, si existe en la muestra suficiente cantidad de anticuerpos IgG o IgM, respectivamente. Si los anticuerpos de las clases IgG o IgM, no están presentes en la muestra, no aparecerá de coloraciones en las líneas “G” o “M”.

Muestras

- Plasma: colocar la sangre total en tubo de serología (sin anticoagulantes) y centrifugar para obtener el plasma.
- Suero: colocar la sangre total en tubo de serología (sin anticoagulantes) dejar reposar por 30 min para facilitar la coagulación, y centrifugar para obtener el suero.
- Si el plasma y el suero no van a usarse de forma inmediata, refrigerar a temperatura de 2-8⁰C, por un período no mayor de 2 semanas. Las muestras deben llevarse a las temperaturas de 1-30⁰C, antes de su uso.
- El plasma y el suero con precipitados no se recomiendan usar por este método.

Materiales

1. Dispositivos de pruebas individualmente embolsados con desinfectante.
2. Diluyente del ensayo.
3. Micropipeta o capilares de 5 μ L.
4. Instrucciones para su uso.

Marcha técnica

- Adicionar 5 μ L de suero o plasma, dentro de la zona marcada con una “S”.
- Adicionar cuatro gotas del diluyente dentro de la zona identificada para el.
- Incubar durante 20 min (importante no leer los resultados antes de los 20 min para evitar falsos positivos).

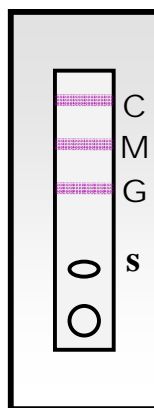
Lectura e interpretación de los resultados

Muestra negativa: Una línea de color púrpura en el sitio “C” únicamente.

Prueba no válida: No existencia de línea color púrpura en la zona control.

Muestra Positiva:

1. IgG positiva: dos líneas de color púrpura (una en la zona control y otra en la zona “G”).
2. IgM positiva: dos líneas de color púrpura (una en la zona control y otra en la zona “M”).
3. IgG y IgM positivas: tres líneas de color púrpura (una en la zona control, otra en la zona “G” y otra en la zona “M”).



Precauciones para su uso

- SD LEPTOSPIRA IgM-IgG, debe ser guardado a temperaturas de 1-30⁰C.
- Los dispositivos de prueba son sensibles a la humedad, así como al calor e incidencia directa de la luz del sol.
- Realizar la prueba inmediatamente después de remover la tablilla de su estuche.
- No usar los estuches vencidos.
- No congelar ninguno de los componentes.
- Sistema válido para diagnóstico "in vitro".
- Usar guantes mientras se trabajan con las muestras.
- Lavarse las manos después de culminar el trabajo.
- Limpiar los derrames correctamente usando un desinfectante apropiado.
- Todos los materiales y muestras deben ser manipulados correctamente, ya que son un potencial infeccioso y deben ser eliminados al final de la prueba.

Limitaciones

Esta prueba detecta anticuerpos de IgG y/o IgM en suero y plasma, y no deben ser usados como un único criterio para el diagnóstico de leptospirosis. Los casos positivos deben ser confirmados por la técnica de referencia internacional de MAT. Como todas las pruebas de diagnóstico, los resultados deben ser considerados con las informaciones clínicas y epidemiológicas. Si el resultado de la prueba es negativo y persisten los síntomas clínicos, otras muestras deben ser estudiadas. Un resultado negativo, no debe excluir la posibilidad de una infección por *Leptospira interrogans*.

Anexo 6
Protocolo para el cultivo de leptospiras
Hemocultivo

- 1) Tomar asépticamente la muestra de sangre, antes de la administración de antibióticos y preferentemente durante el estado febril del paciente.
- 2) Esta muestra puede ser adicionada en solución anticoagulante (1% de oxalato de sodio (0.5mL de oxalato de sodio al 1% por cada 5mL de sangre) para su transporte al laboratorio.
- 3) Sembrar una gota de sangre directamente en el primer tubo con medio de cultivo para leptospiras, dos gotas en el segundo y tres gotas en el tercero, cuarto y quinto tubo respectivamente.
- 4) Los cultivos se incuban a 28°C, durante un período no menor de 40 días. Se verifica la presencia o ausencia de leptospiras, por observación directa en campo oscuro cada cinco días posterior a la siembra. Si se logra el aislamiento se informará como *Leptospira spp.*, hasta su identificación. Algunos autores recomiendan no descartar los hemocultivos hasta 6 meses después de sembrados (Sehgal *et al.*, 2003).

Anexo 7

Protocolo de la técnica de Microaglutinación (MAT) con antígenos vivos de leptospiras usada para el diagnóstico de leptospirosis humana

Hacer selección adecuada del panel de cepas de referencia (preferiblemente autóctonas), tomando en consideración la circulación de serogrupos en la región. Ver a continuación, las cepas de referencia recomendadas por OPS-OMS, para la región de las Américas:

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón 3
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	H. Utrecht IV
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
<i>L. kirschneri</i>	Grippothyphosa	Grippothyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGa
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	V Batavia 46
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin

Hacer el protocolo por escrito (por serogrupo), en una plantilla de trabajo, que se corresponda con la cantidad de muestras y las diluciones por placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1. Tomar la placa de 96 pocillos fondo plano o en U.

2. Rotular la placa con números de las muestras y serogrupo según protocolo diseñado en el punto #1.
3. Adicionar un volumen de 50 μ L de TFS (pH 7.2) a todos los pocillos
4. Adicionar un volumen de 40 μ L más de TFS (pH 7.2) sólo al primer pocillo para completar 90 μ L de TFS, como volumen final.
5. Adicionar un volumen de 10 μ L del suero puro en el primer pocillo, quedando un volumen final de 100 μ L (dilución inicial 1:10).
6. Tomar un volumen de 50 μ L del primer pocillo y pasarlo al segundo pocillo, donde ya habían servido previamente 50 μ L de TFS (ver paso 4). Homogenizar, y tomar nuevamente 50 μ L de este pocillo y pasarlo al tercer pocillo, y así sucesivamente hasta el pocillo 8 ó mas, según el estudio solicitado. Descartar 50 μ L del último pocillo. Quedando realizadas las diluciones siguientes: pocillo 1: 1/10, pocillo 2: 1/20, pocillo 3: 1/40, pocillo 4: 1/80, pocillo 5: 1/160, pocillo 6: 1/320, y así sucesivamente.
7. Adicionar a todos los pocillos un volumen de 50 μ L del cultivo de leptospiras del serogrupo crecido en medio líquido (EMJH) a 28°C, en fase logarítmica (concentración aproximada de 2×10^8 leptospiras/mL, equivalente a 200 células por campo). Evitar utilizar cultivos envejecidos con autoaglutinación. Quedando las diluciones finales como: pocillo 1: 1/20, pocillo 2: 1/40, pocillo 3: 1/80, pocillo 4: 1/160, pocillo 5: 1/320, pocillo 6: 1/640, y así sucesivamente.
8. Controles positivos y negativos:
 - Control de cepa: En un pocillo aparte colocar un volumen de 50 μ L de TFS y 50 μ L del cultivo del serogrupo de referencia.
 - Suero control positivo: En una hilera de pocillos realizar los pasos del 4 al 7, utilizando como muestra un suero con título altos de anticuerpos ($\geq 1/160$) frente al serogrupo que se evalúa en esa placa.
 - Suero control negativo: En una hilera de pocillos realizar los pasos del 4 al 7, utilizando como muestra un suero sin título de anticuerpos reconocidos por MAT.
9. Homogenizar muy suavemente la placa.
10. Incubar a 37°C por 1 hora, o de 28 – 30°C por 2 horas.
11. Realizar la lectura resultados utilizando microscopio de contraste de fase con condensador de campo, preferiblemente con ocular de 20X y objetivo 10X. El título final del suero será la mayor dilución donde se observe el 50% de leptospiras aglutinadas y el 50% de leptospiras libres. Comparar siempre con el control de cepa.

Anexo 8

Protocolo de la Técnica de Hemoaglutinación Indirecta (HAT)

Fundamento:

Se basa en la unión del antígeno sustancia sensibilizante de eritrocitos (ESS) con anticuerpos aglutinantes específicos (IgM), producidos contra leptospira o sus productos. La aglutinación es indirecta. El antígeno ESS se une de forma artificial a la superficie del soporte biológico (hematíes de carnero) y espera el encuentro con el anticuerpo. Al proceso de cubrir el soporte, con el antígeno, se le conoce como sensibilización. Los hematíes de carnero resultan fáciles de obtener. Ver a continuación el fundamento esquematizado:

La reacción de hemoaglutinación dependerá del título, expresado como la máxima dilución del suero, en la que aparece el efecto biológico deseado. En particular en este caso, el efecto se traduce por la observación de mayas o enrejados de hemoaglutinación. Las mayas se expresan en función de cruces (4+, 3+, y 2+). Toda reacción de 1+ hacia debajo, se considera negativa (-). El sedimento globular del control de anticuerpos heterófilos valida el ensayo. El antígeno ESS, es género específico, de naturaleza polisacárida y se obtiene a partir de la cepa Patoc I, del serovar Patoc de la especie *Leptospira biflexa*.

La técnica, semicuantifica los niveles de anticuerpos de la clase IgM, no requiere de equipamiento sofisticado, y es rápida, ya que el tiempo de ejecución máximo es de 4,5 h.

Los factores que pueden influir en el éxito de los resultados son: la concentración del soporte (eritrocitos), si ésta es alta, provocará la obtención de títulos más bajos y viceversa. El rango del pH, que debe oscilar entre 4 y 8.4, pero el óptimo es de 7.2. Otro valor de pH producirá resultados negativos. De la concentración de anticuerpos (alta concentración con respecto a la del antígeno produce efecto de prozona e inhibe la aglutinación de las diluciones bajas, debido a la unión de algunos componentes séricos con las partículas antigénicas). La concentración de antígeno, deberá ser calculada o titulada sobre la base del peso seco, o por la dilución óptima de trabajo. Si se usa una exceso de antígeno se corre el riesgo de obtener falsos biológicos positivos.

Marcha técnica

Eritrocitos: Se utilizan eritrocitos frescos de carneros conservados en solución de anticoagulante al 50% (ALSEVER, ver al final del texto su composición). Los eritrocitos de carneros, son lavados mediante centrifugación a 1 500 r.p.m. durante 15 min, por tres veces en TFS, pH 7.2.

Suero: El suero se diluye 1:10 en TFS pH 7.2, y se inactiva a 56⁰C durante 30 min. Posteriormente se le adicionan eritrocitos de carnero puros hasta alcanzar una concentración del 1%. La mezcla suero con eritrocitos, es colocada en baño de agua, a 37⁰C por 30 min y posteriormente centrifugados a 1 500 r.p.m. por 15 min.

Sensibilización del antígeno con los eritrocitos: Se prepara suficiente cantidad del antígeno ESS, diluido en su dilución de trabajo Ej. [1:8]. Posteriormente se adicionan eritrocitos de carnero hasta lograr alcanzar una concentración final del 1%. La reacción se incuba a 37⁰C durante 1h, en baño de agua. La mezcla antígeno más eritrocitos, se homogeniza cada 15 min evitando la formación de sedimentos.

Eritrocitos controles: Se prepara suficiente cantidad de eritrocitos de carnero al 1%. Estos eritrocitos también son incubados a 37⁰C durante 1h en baño de agua.

Marcha técnica.

1. En la placa de poliestireno de 96 pocillos y fondo en U, se depositan 50 µL de TFS a partir del tercer hoyuelo y hasta el duodécimo. Posteriormente se adicionan 50µL de la dilución 1: 10 del suero tratado (sólo en los 3 primeros hoyuelos).
2. A continuación se realizan diluciones seriadas partiendo del tercer hoyuelo (dilución 1/20) hasta el duodécimo hoyuelo (dilución 1/2560), descartándose los últimos 50 uL.
3. Se depositan después, 25 µL de eritrocitos no sensibilizados en el primer hoyuelo y 25 µL de eritrocitos sensibilizados en los restantes hoyuelos.
4. La placa se incuba a 30⁰C durante 1h.

Interpretación de los resultados.

Título de suero: La mayor dilución en el que se observe hemoaglutinación (4+, 3+, ó 2+) (efecto biológico deseado).

Muestras pareadas:

Caso positivo: Todo paciente (estudiado con muestras pareadas) que se ajuste a los siguientes criterios:

- ❖ Seroconversión entre muestras pareadas (suero no reactivo a suero reactivo, en cualquier dilución).
- ❖ Seroconversión cuatuplicada del título del segundo suero reactivo con respecto al primero también reactivo. Es decir que el título del segundo suero reactivo, haya aumentado en al menos dos diluciones o más al título del primer suero.

Caso negativo: Todo paciente (estudiado con muestras pareadas) que se ajuste a los siguientes criterios:

- ❖ No observación de títulos, en las muestras pareadas.
- ❖ Aparición de títulos estacionarios entre las muestras pareadas.
- ❖ Disminución del título del primer suero en dos o más diluciones con respecto al primero.

Cuando se disponga de un solo suero:

Caso positivo: Todo paciente estudiado con un suero, cuyo título sea mayor o igual a 80.

Caso reactivo: Todo paciente estudiado con un suero, cuyo título fluctúe entre 10 y 40.

Caso no reactivo: Todo paciente estudiado con un suero, donde no se haya observado ningún título.

Se mezcla los componentes homogéneamente y se distribuyen en cantidades de 25 mL por frasco. Se esterilizan los frascos a 121°C por 15 min.

Anexo 9

Protocolo de Microaglutinación (MAT), para la serotipificación de aislamientos de leptospiras utilizando sueros policlonales

Hacer selección adecuada de los sueros policlonales de referencia, tomando en consideración la circulación de serogrupos en la región. (Ver tabla siguiente con el panel de sueros policlonales).

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa	Título
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	800*
<i>L.borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127	51 200
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart	204 800
<i>L. kirschneri</i>	Pomona	Mozdok	5621	6 400
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno	51 200
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	6 400
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	3 200
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C	125 600
<i>L.borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	12 800

*: Título obtenido al enfrentar la cepa de referencia de *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae RGA con el policlonal homólogo.

Hacer el protocolo por escrito en una plantilla de la MAT con la distribución de los de sueros policlonales de referencia, sus diluciones, y la cepa autóctona en estudio:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1. Tomar una placa de 96 pocillos fondo plano o en U.
2. Rotular la placa según protocolo diseñado en el paso # 2
3. En un tubo con capacidad de 0,5 mL se prepara la dilución del suero policlonal 1/50 (245 µL de TFS más 5 µL del suero policlonal).
4. En la placa de microtitulación a partir del pocillo 2 y hasta el pocillo 12 adicionar un volumen de 50 µL de TFS (pH 7.2).

5. En los pocillos 1 y 2, adicionar un volumen de 50 μ L del suero policlonal de referencia 1/50 (paso # 5). Realizar diluciones al doble; tomando un volumen de 50 μ L del segundo pocillo, y pasarlo al tercer pocillo, nuevamente 50 μ L de este pocillo y pasarlo al cuarto pocillo, y así sucesivamente hasta el pocillo 12 ó mas. Descartar 50 μ L del último pocillo. Quedando realizadas las diluciones siguientes: pocillo 1: 1/50, pocillo 2: 1/100, pocillo 3: 1/200, pocillo 4: 1/400, pocillo 5: 1/800, pocillo 6: 1/1 600, y así sucesivamente.
6. Adicionar a todos los pocillos un volumen de 50 μ L de la cepa autóctona en estudio, crecida en medio líquido (EMJH) a 28°C, en fase logarítmica (concentración aproximada de 2×10^8 leptospiras/mL, equivalente a 200 células por campo). Evitar utilizar cultivos envejecidos con autoaglutinación. Quedando las diluciones finales como: pocillo 1: 1/100, pocillo 2: 1/200, pocillo 3: 1/400, pocillo 4: 1/800, pocillo 5: 1/1600, pocillo 6: 1/3200, y así sucesivamente.
7. Control de cepa: En un pocillo aparte colocar un volumen de 50 μ L de TFS y 50 μ L la cepa autóctona en estudio.
8. Homogenizar muy suavemente la placa.
9. Incubar a 37°C por 1 hora, o de 28 – 30°C por 2 horas.
10. Realizar la lectura de los resultados utilizando microscopio de contraste de fase con condensador de campo, preferiblemente con ocular de 20X y objetivo 10X. El título final del suero policlonal frente la cepa autóctona en estudio, será la mayor dilución donde se observe el 50% de leptospiras aglutinadas y el 50% de leptospiras libres. Comparar siempre con el control de cepa.