

45
2y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EL GENERO *Leptospira*

Y SU IMPORTANCIA CLINICA EN HUMANOS

**TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLGA
P R E S E N T A :
LAURA GALLO SANCHEZ**



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Elda Peniche Quintana
Vocal: Prof. Ma. Elsa Escudero García
Secretario: Prof. Raúl Garza Velasco
1er. suplente: Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chávez
2do. suplente: Prof. Luciano Gómez Hernández

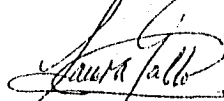
LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Biblioteca de la Facultad de Química
Hemerobiblioteca de la Facultad de Medicina
Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas
Centro de Información y documentación del INP

ASESOR DEL TEMA:


Q.F.B. Raúl Garza Velasco

SUSTENTANTE:


Laura Gallo Sánchez

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	
i. Taxonomía	5
ii. Ultraestructura y características microscópicas	9
iii. Propiedades culturales	17
II. IMPORTANCIA CLÍNICA	
i. Generalidades	33
ii. Patogenia y patología	36
iii. Características clínicas	40
iv. Fases de la enfermedad	41
III. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	
i. Diagnóstico directo	59
ii. Diagnóstico indirecto	75
iii. Otros datos de laboratorio	80
IV. CONCLUSIONES	82
V. BIBLIOGRAFÍA	84

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis que el humano llega a adquirir de forma accidental, generalmente a partir del contacto directo e indirecto con orina de animales infectados, afectando con mayor frecuencia a riñones e hígado, aunque también puede implicar a otros tejidos, incluyendo al Sistema Nervioso Central, al globo ocular y al torrente circulatorio.

El género *Leptospira*, agente etiológico de la leptospirosis, se subdivide en aproximadamente 180 serovariedades, varias de las cuales son patógenas, si bien, las agrupadas dentro de la especie *L. icterohaemorrhagiae* son las más virulentas; de hecho, estas últimas son las que llegan a poner en riesgo la vida de los enfermos, a quienes es necesario someter a diálisis extracorporeal.

La leptospirosis inicia con fiebre, escalofríos, cefalea, derrames conjuntivales y mialgias, signos que suelen sugerir otros padecimientos sencillos; no obstante, es una afección bifásica cuyas manifestaciones graves se presentan hasta la segunda fase. En este sentido, el diagnóstico debe realizarse eficazmente y, aún cuando existen métodos de cultivo *in vitro*, destacan por su confiabilidad algunos de índole inmunológica y, más recientemente, algunos otros que se basan en biología molecular, antecedidos por la reacción en cadena de la polimerasa.

En otras palabras, el diagnóstico temprano de la leptospirosis establece la posibilidad de que resulte exitoso el tratamiento con agentes antimicrobianos tales como la penicilina, tetraciclina o estreptomina, evitándose las lesiones mayores que atentan contra la vida del paciente.

El presente trabajo aborda los aspectos de mayor relevancia asociados tanto al género *Leptospira* como a la leptospirosis.

OBJETIVOS

- Describir las principales características microbiológicas del género *Leptospira*, destacando su morfología microscópica, así como sus requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo.
- Mencionar las fases y principales entidades clínicas de la leptospirosis, así como la terapéutica aplicada.
- Describir los fundamentos asociados a las principales técnicas empleadas en el diagnóstico de la leptospirosis.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

i. Taxonomía

La clasificación taxonómica asociada al género *Leptospira* se describió en 1917, dando lugar a la creación de la familia *Leptospiraceae*, en virtud de que estos microorganismos presentan características genotípicas y fenotípicas ajenas a las de otros géneros tales como *Borrelia* y *Treponema*. La palabra *Leptospira* deriva del griego *lepto* que quiere decir delgado o fino y, *spira*, que significa espiral (63).

Las leptospiras se encuentran localizadas dentro del reino *Procaryotae*, división *Gracilicutes*, clase *Scotobacteria* y orden *Spirochaetales*; éste consta de dos familias: *Spirochaetaceae* y *Leptospiraceae*, a las que se asignan los números 1 y 2,

respectivamente. Hasta el momento se han identificado tres géneros para la familia 2, uno de los cuales no se ha definido en su totalidad; el principal de ellos es *Leptospira*, que a su vez consta de dos especies; una saprofitica o de vida libre, *L. biflexa*, y la patogénica o parásita, *L. interrogans* (tabla 1). En cuanto al segundo género, se llama *Leptonema*, posee una sola especie: *Leptonema illini*, cuya morfología es distinta a la de las leptospiras, aunque fenotípicamente es silmilar a *L. biflexa*. El tercer y último género, no descrito formalmente, es el llamado *Tumeria* y solo contiene a una especie que se asemeja en muchos sentidos a *Leptospira parva incertae sedis* (32,42,54,63).

Tabla 1. Principales diferencias entre las especies de *Leptospira*

Característica	<i>L. interrogans</i>	<i>L. biflexa</i>
Patogenicidad	+	-
Crecimiento a 13°C	-	+
Inhibición de crecimiento por 8-A*	+	-
% G+C de DNA	35.3-39.9	38-41

* 8-azoguanina

Cabe mencionar que las dos especies de *Leptospira* se subdividen en serogrupos y estos a su vez en serotipos de acuerdo a las características antigénicas que cada leptospira posee; para el caso de *L. interrogans* se han reportado más de 210, ordenados en los 19 serogrupos mencionados en la tabla 2. La presencia de antígenos termolábiles y termoestables da como resultado dos "variedades" únicamente para el serotipo *icterohaemorrhagiae* (17).

Otra perspectiva en relación con la clasificación del género basada en estudios genéticos que involucran hibridaciones DNA/DNA y determinación de porcentajes guanina-citosina reconoce filogenéticamente a 11 especies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. inadai* y *L. kirschneri* o *L. alstoni*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. parva* y *L. wolbachii*. Sin embargo, esta agrupación carece de trascendencia para los infectólogos (23,42).

Asimismo, se han detectado más de 65 diferentes serotipos para *L. biflexa*, ordenados en 38 serogrupos (tabla 3).

Tabla 2. Serogrupos de *Leptospira interrogans* (43).

Serogrupos de <i>Leptospira interrogans</i>		
Australis	Celledoni	Javanica
Autumnalis	Cynopteri	Panama
Ballum	Djasiman	Pomona
Bataviae	Grippotyphosa	Pyrogenes
Butembo	Hebdomanis	Sejroe
Canicola	Icterohaemorrhagiae	Shermani
	Tarassovi	

Tabla 3. Principales serogrupos de *L. biflexa* (43).

Serogrupos de <i>Leptospira biflexa</i>		
Abaetae	Cau	Maritza
Ancona	Codice	Semaranga
Andamana	Dindio	Sidonia
Aurisina	Doberdo	Sobradinho
Babrich	Garcia	Tevere
Basovizza	Holland	Thracia
Bessemans	Iran	Tororo
Botanica	Khoshamian	Udine
Cadore	Lazio	Vinzent
Camtchia	Malomirobo	

ii. Ultraestructura y características microscópicas

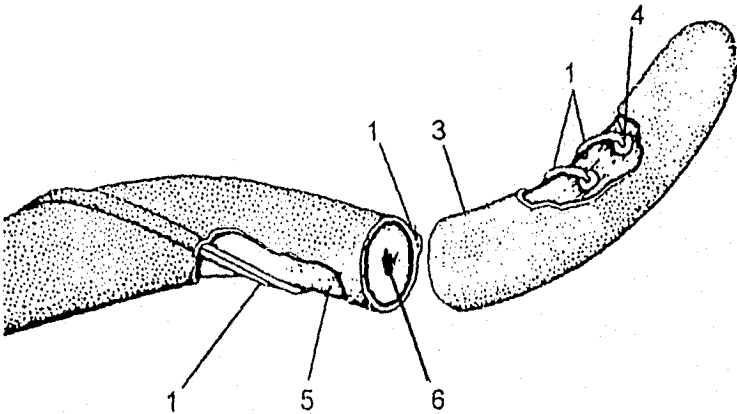
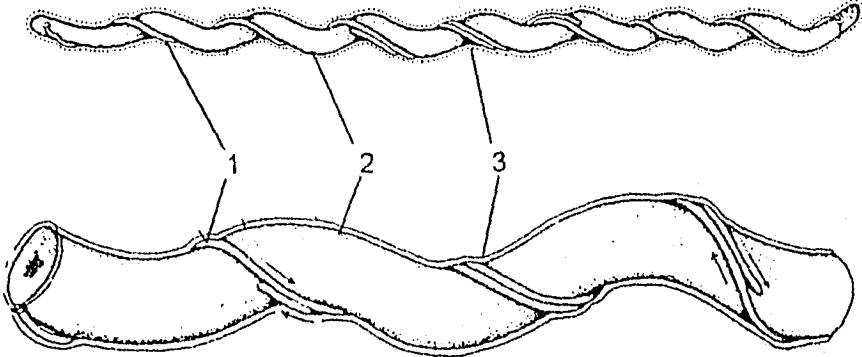
Las leptospiras observadas, *in vivo* o *in vitro*, son células con forma helicoidal, flexibles, con un diámetro de 0.1 a 0.2 micras y una longitud que va desde las 6 hasta las 12 micras; constan de 18 o más espirales que siguen la dirección de las manecillas del reloj y se encuentran conformadas por tres estructuras básicas: la membrana externa, el cilindro protoplásmico y el filamento axial, también denominado fibra axial o endoflagelo (fig.1) (7, 26,31,50,86).

Membrana externa

La membrana externa (ME) corresponde a una capa de baja densidad electrónica que envuelve completamente a la leptospira; sus múltiples y finas capas alcanzan un espesor de 6 a 8 nm y confieren una importante flexibilidad a la bacteria, tal como también lo hace la capa de baja densidad electrónica que se localiza entre

Figura 1. Ultraestructura de las leptospiras (31)

- 1. Fibra axial
- 2. Cilindro protoplásmico
- 3. Membrana externa
- 4. Poro de inserción
- 5. Capa lipoprotéica
- 6. Región nuclear



la pared del cilindro protoplásmico y la ME; ésta se constituye por 46 % de proteínas, 27 % de carbohidratos y 22 % de lípidos, los cuales se han relacionado en alto grado con la patogénesis de la leptospirosis y que en su mayoría se encuentran como fosfolípidos, entre los que predomina la fosfatidiletanolamina y los lipopolisacáridos (LPS) (66,84). Estos últimos se integran de la siguiente manera:

La composición de los LPS leptospíricos es muy similar a la de las bacterias Gram-negativas, excepto por la ausencia del ácido hidroximiriístico, que representa un marcador muy común en las enterobacterias. Cabe mencionar que los carbohidratos se encuentran en forma de pentosas, hexosaminas y 6-desoxihexosas (tabla 4 y 5) (26,81).

La ME es susceptible al SDS por lo que este es de suma importancia para su estudio. En ocasiones, mediante micrografía electrónica se logran observar vesículas unidas estrechamente a ella, si bien aún se desconoce la función de estas últimas; no

obstante, se cree que su formación es originada por el citoplasma de las células del hospedero, a fin de aislar a la espiroqueta (como mecanismo de defensa), o de alterar su ciclo reproductivo y promover un eventual estado de latencia (31,50).

Fibras axiales

Las fibras o filamentos axiales son dos estructuras cuyo diámetro fluctúa entre 10 y 20 nm, dependiendo de la especie involucrada, se encuentran insertadas una a cada extremo de la espiroqueta, entre la ME y el cilindro protoplásmico, rodeando a este último de un polo hasta el otro; por otra parte, están constituidas básicamente por proteínas y mínimas cantidades de hexosas y pentosas predominando, en las primeras, los aminoácidos tales como el ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, leucina y glicina, y destacando la notoria ausencia de tirosina, triptofano y cisteína; la ausencia de esta última es indicativa de que la estructura proteica

correspondiente no se encuentra estabilizada por puentes disulfuro (77).

Cada fibra está conformada por una vaina longitudinal y una estructura de inserción; la primera representa el núcleo interno del filamento y es muy semejante a la que presentan las bacterias Gram negativas; en cada extremo de la espiroqueta, la vaina se diferencia en la estructura de inserción, como una protuberancia alargada sin membrana, que se curva ligeramente para formar una especie de gancho; al término de éste, se presentan transversalmente las dos series de discos que están unidos por una prolongación delgada llamada cuello de la fibra axial, la primera serie se une directamente a la pared celular de la espiroqueta y la segunda se une a la membrana del cilindro protoplásmico (fig. 2) (8,31).

La función de las fibras axiales es la de controlar el movimiento de la espiroqueta; para tal efecto, se genera un impulso eléctrico que contrae a la membrana citoplásmica, logrando transmitirse a través

Figura 2. (a) Esquema que ilustra los componentes estructurales del filamento axial de *Leptospira* y (b) su inserción con la membrana externa y el cilindro protoplásmico.

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1. Discos de inserción | 5. Gancho proximal |
| 2. Cuello terminal | 6. Membrana externa |
| 3. Vaina o núcleo | 7. Fibra axial |
| 4. Membrana del núcleo | 8. Membrana citoplásmica |

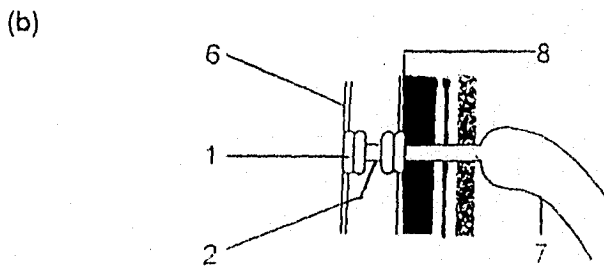
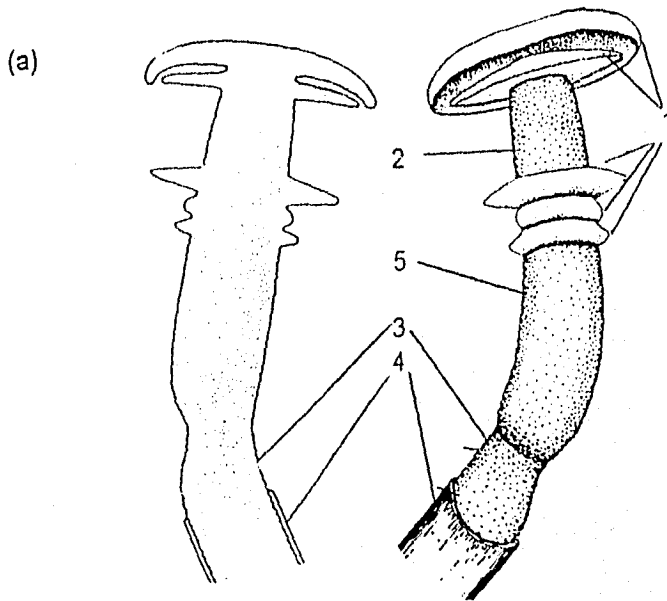


Tabla 4. Proporción de los carbohidratos presentes en la fracción LPS de *Leptospira*

Carbohidrato	Composición (%)
Ramnosa	45.6
Arabinosa	13.5
Fucosa	9.1
Xilosa	24.9
Manosa	3.4
Galactosa	2.3
Glucosa	5.0
Galactosamina	2.3
Glucosamina	7.5

Tabla 5. Composición lipídica de los LPS *Leptospira*.

Acido graso	Composición (%)
Hidroxidecanoico	7.1
Láurico	2.5
Hidroxiláurico	30.5
Hidroxipentadecanoico	4.6
Palmitoleico	2.5
Palmitico	17.0
Hidroxipalmitico	1.4
Hidroxiheptadecanoico	1.6
Oleico	10.7
Estearico	5.0

de los discos de inserción; estos rotan o vibran originando el impulso que se extiende hasta la protuberancia terminal y a la misma vaina, con lo cual ocurre el desplazamiento (9,19,51).

Las espiroquetas presentan tres tipos de movimiento en ambientes líquidos: el translacional, tiene lugar cuando la espiroqueta presenta sólo uno de sus extremos semicurvado (hacia la izquierda o la derecha) y se mueve en la dirección de este último; cabe mencionar que esto sucede porque en fluidos las espiroquetas pueden perder reversiblemente su estructura original, asumiendo formas parcial o totalmente elongadas; por su parte el movimiento rotacional ocurre cuando el microorganismo gira sobre su propio eje y, por último, su lento movimiento serpenteante, por contracción-elongación de los filamentos axiales, se observa más claramente en superficies sólidas (14,41,51,53,60,86).

Cilindro protoplásmico

Directamente por debajo de la ME se ubica el cilindro protoplásmico; éste posee apariencia tubular, se encuentra constituido por la pared celular, la membrana citoplásmica y el contenido citoplásmico y corresponde a un conjunto de fibras delgadas (19,86).

La membrana que recubre a dicho cilindro protoplásmico es una estructura de una sola dimensión, de 6 a 8 nm de espesor. Por encima de esta última se localiza la pared celular, cuya estructura es de triple capa, se constituye por un 90 % de polisacáridos, 0.7 % de ácido murámico y de 2.4 % de glucosamina, con cierta proporción de alanina, ácido glutámico y peptidoglicano clásico; como en todas las bacterias, la función primordial de la pared celular es la de conferir forma y rigidez a la leptospira (31,51).

El peptidoglicano de la pared celular de *Leptospira*, presenta diversas características biológicas; incluyendo aquéllas que están

involucradas con el sistema inmunocompetente del hospedador: la activación del complemento, efectos adyuvantes, inducción de la inflamación, efectos mitogénicos en células mononucleares periféricas, así como actividad neurofarmacológica, considerando efectos somníferos. También se ha encontrado que todas las especies de *Leptospira* son capaces de desencadenar procesos proadhesivos en células endoteliales humanas contra los neutrófilos, dando paso a la formación de vasculitis. Esta clase de efectos es producida exclusivamente por el peptidoglicano y no así por el lipopolisacárido de la espiroqueta, como inicialmente se pensaba (11,44,51).

Algunas especies de *Leptospira* presentan fibras asociadas a la membrana del cilindro protoplásmico que son llamadas fibras perimurales, las cuales son observables únicamente cuando se someten las células a tratamientos con álcalis diluidos (0.5 N NaOH) o con hialuronidasa (0.5 mg/mL). En *L. biflexa* las fibras que son liberadas por la segunda tienen un diámetro de 3 a 5 nm (31,58).

iii. Propiedades culturales

Requerimientos nutricionales y medios de cultivo

El género *Leptospira* comprende a una serie de microorganismos cuya exigencia nutricional se relaciona con su patogenicidad o con la ausencia de la misma; sin embargo, entre los nutrimentos esenciales para inducir el crecimiento de ambos tipos de espiroquetas (virulentas o no virulentas) se encuentran compuestos orgánicos, tales como vitaminas y ácidos grasos, así como sustancias inorgánicas entre las que destacan sales de amonio, algunos iones divalentes y un amortiguador de fosfatos. Algunos otros componentes con los que se suplementan los medios pueden ser la albúmina sérica de bovino en el caso del medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH); el suero de conejo inactivado con aminoácidos en el medio Fletcher, o bien, el medio Korthoff con sales, peptona y hemoglobina. Todos lo anteriores pueden ser empleados en el aislamiento de las

espiroquetas, pero únicamente los dos primeros son adecuados para su cultivo (35,36,38,39).

De cualquier manera, se ha determinado que el principal componente de los medios implicados en el cultivo de *Leptospira* es el suero, destacando el de conejo, ya que supera en efectividad al de humano y al de otros animales y, adicionalmente porque en su ausencia no se conservan las características iniciales del microorganismo, cuando se realizan varios pases consecutivos. En este contexto, estudios exhaustivos sobre las características que promueven el desarrollo de esta bacteria han considerado el fraccionamiento del suero en sus tres principales componentes: las globulinas, el ultrafiltrado y la albúmina. Al analizar por separado a cada uno de estos, se ha encontrado que los dos primeros no logran estimular el crecimiento por sí solos y que la albúmina lo hace en una elevada proporción (4,40,62,82).

La tabla 6 muestra la efectividad de cada una de las fracciones en cuestión.

Tabla 6. Efectividad de las fracciones del suero de conejo

Fracción de suero de conejo adicionada al medio basal	No. de microorganismos / mL ⁽¹⁾
Medio basal ⁽²⁾	< 10 ⁵
Suero de conejo	28.0 x 10 ⁷
Globulina	< 10 ⁵
Ultrafiltrado	< 10 ⁵
Globulina + Ultrafiltrado	< 10 ⁵
Albúmina	4.1 X 10 ⁷
Albúmina+globulina	6.7 X 10 ⁷
Albúmina + ultrafiltrado	5.0 X 10 ⁷
Albúmina + globulina + ultrafiltrado	13.0 X 10 ⁷

⁽¹⁾ La concentración del inóculo fue de 1 a 2 x 10⁶ / mL y la incubación fue a 30°C durante 7 días.

⁽²⁾ Medio basal = Amortiguador de fosfatos 0.02 M

Determinaciones tales como las reflejadas en la tabla 6 han permitido adquirir mayores conocimientos sobre el cultivo de *Leptospira*: la fracción de albúmina se puede reemplazar exitosamente por una resina débilmente básica, como la Amberlita IR-45, o bien, por almidón soluble; no obstante, es importante

hacer notar que estos sustitutos no funcionan si no se encuentran presentes las fracciones restantes; esto y el hecho de que se pueda sustituir por una resina que no provee de ningún nutriente al medio, ha conducido a que se le atribuya a la albúmina la función de agente adsorbente, ya sea para remover productos metabólicos de excreción, o bien, para mantener a los sustratos en niveles no tóxicos (35,43).

La globulina logra ser reemplazada por la lecitina de la yema de huevo pero, al igual que la resina, requiere de esta misma, así como del ultrafiltrado sérico para proveer máximo crecimiento (36,69,82).

La fracción de albúmina y la de globulinas se obtienen por precipitación diluyéndolas y adicionándoles una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta que se alcanza una concentración final del 50 y 70 % respectivamente. Por otra parte, el ultrafiltrado se obtiene por diálisis del suero durante 3 días a 5°C (82).

Por otra parte, se ha demostrado que los ácidos grasos representan la principal fuente de carbono y de energía para las leptospiras; los de cadena corta, tales como el acético, butírico, láurico, mirístico, cáprico y caproico, no logran ser metabolizados por las especies patógenas y, a muy altas concentraciones, pueden actuar como inhibidores del crecimiento debido a la débil unión que existe entre estos y la albúmina; en cuanto a las saprófitas, éstas logran asimilarlos al encontrarse con elevadas concentraciones de ácidos de cadena larga. Por otro lado, el máximo crecimiento de estas espiroquetas se obtiene con los ácidos de 14, 16, 17 o 18 átomos de carbono como pueden ser el palmítico, esteárico, heptadecanoico y oleico, y es un nutrimento esencial debido a que no logran ser sintetizados *di novo* por la espiroqueta (71).

El ácido oleico es el de mayor elección debido a su insolubilidad. Al realizar combinaciones entre los otros ácidos, se ha logrado observar que no presentan mayor actividad a la que originan

individualmente; así mismo, la adición de los ácidos linolénico y linoleico resulta totalmente tóxica para estos microorganismos.

Cabe señalar que en el caso de carecerse de ácidos de cadena larga, se adicionan lípidos como Tween 60 y 80 a una concentración de 0.002 %, que además permiten el adecuado mantenimiento de la tensión superficial e inducen a la conservación del microorganismo por períodos prolongados (35,46,67).

La demostración experimental de estos hechos se puede hacer mediante la adición de marcadores radiactivos para poder medir la incorporación de los ácidos. Únicamente los ácidos grasos presentan actividad estando en presencia de albúmina, ya que con ésta se enlazan, evitando así el efecto bacteriostático o lítico que por sí solos presentarían. Esta capacidad de enlazar de cuatro a cinco moléculas de ácidos por cada albúmina se puede perder al someterla a temperaturas de 121°C durante 20 minutos. Una función parecida la tiene el glicerol el cual promueve la esterificación de los ácidos grasos tóxicos (36,40,62).

Algunas especies patógenas requieren de ácidos insaturados para su crecimiento, los ácidos poliinsaturados los obtiene por su adición al medio, mientras que los monoinsaturados por desaturación directa del ácido correspondiente; por otro lado se ha demostrado que ninguna de las especies de vida libre requieren de estos para su favorable crecimiento (43,65,69).

Dentro de los aminoácidos, se ha encontrado que estimulan el crecimiento de *Leptospira*: L-asparagina y L-glutamina, la primera porque libera nitrógeno cuando actúa sobre ésta la asparaginasa hallada en el suero del medio y la segunda, cuando se somete a esterilización por autoclave ya que es probable que se forme la sal de amonio correspondiente bajo tales condiciones. En mucho menor grado actúan el ácido aspártico, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano, cisteína, cistina, ácido glutámico y glicina como fuentes de nitrógeno. Con respecto a lo anterior, se deduce que las espiroquetas obtienen el ión amonio a partir de sales orgánicas e inorgánicas, pero en mayor proporción a partir de

estas últimas si se adiciona al medio en forma de cloruro de amonio (36,82).

Los principales iones utilizados por *Leptospira* son el calcio, potasio y magnesio en concentraciones de 3.5×10^{-4} , 4.1×10^{-4} y 1×10^{-4} M respectivamente. La ausencia de este último produce células filamentosas y alteraciones en la división celular; sin embargo, estos iones como requerimientos nutricionales no son absolutos al igual que la adición de fierro, cobre, zinc, manganeso y cobalto. A su vez, éste puede utilizarse en lugar de la vitamina B₁₂, así como el bario y estroncio pueden reemplazar al calcio. La presencia de fierro en especies patógenas es adecuada si se adiciona individualmente con algun otro ión y si además la especie en estudio posee catalasa; la actividad de esta última se logra eliminar si se adiciona peróxido de hidrógeno al 1 %. Así mismo, la adición de 10 ppm de sulfato de cobre produce la inhibición de especies patógenas, mientras que de las saprofitas no (34,38,55,68,69,82).

En el estudio de los nutrimentos vitamínicos para *Leptospira*, se ha encontrado que al adicionar una mezcla de varias vitaminas tales como ácido nicotínico, nicotinamida, pirodixina, riboflavina, ácido pimélico y tiamina, y prescindir de dos o hasta cuatro de éstas, únicamente se estimula el crecimiento en el cultivo con la tiamina; mientras que el ácido nicotínico o el ácido pantoténico también lo hacen pero en menor grado que esta última. Existen otras tres vitaminas que logran reducir la fase lag en una curva de crecimiento que son: el ácido *p*-hidroxibenzoico, la biotina y la vitamina B₁₂. Éstas únicamente actúan al incubarse a una temperatura de 30°C, ya que los requerimientos vitamínicos son más exigentes a 37°C (36,62,69,82).

Otros compuestos estudiados para estimular el crecimiento del género fueron glucosa, citrato, alfa-cetoglutarato, succinato, L-malato, acetato, adenosina, timidina, uridina, DPN, TPN, CoA y NaHCO₃, de los cuales se ha encontrado que sólo este último logra reducir la fase lag por unas cuantas horas, efecto que no es relevante en los cultivos.

La utilización de análogos de las bases púricas y pirimídicas es de gran importancia en la elaboración de medios de cultivo selectivos para *Leptospira*. El 5-Fluorouracilo (5FU) es un análogo de una base pirimídica, cuya presencia en el medio en concentraciones desde 50 mcg/mL y tan altas como 1 mg/mL no producen ninguna inhibición en el crecimiento debido a que no logran ser incorporadas por los ácidos nucleicos del microorganismo; mientras que en algunas bacterias se conoce que su acción sí es inhibitoria. El género *Leptospira*, al pertenecer a un grupo de microorganismos de lento crecimiento y que desarrollan en medios ricos, predispone al cultivo a problemas de contaminación, por lo tanto la adición de este análogo es una ventaja para la obtención de un medio selectivo, si se adiciona en concentraciones de 200 a 400 mcg/mL. EL ácido nalidíxico puede ser utilizado en conjunto con el 5FU para el aislamiento de espiroquetas. La neomicina también se utiliza, en menor grado, para la elaboración de medios selectivos; sin embargo, existen dos inconvenientes en su uso: como posee actividad antimicrobiana de amplio espectro puede actuar sobre algunas leptospiras susceptibles y además su

actividad es dependiente de la concentración de hierro presente en el medio (37,38).

Por otro lado, se ha demostrado que los análogos de bases púricas como pueden ser 8-azoguanina y 6-mercaptopurina, logran inhibir el crecimiento de *L. pomona*, *L. canicola* y *L. australis*, todas ellas especies patógenas, en concentraciones de 100 a 225 mcg/mL (37,38).

Las especies patógenas no logran desarrollar algún tipo de colonia en ausencia de CO₂, con excepción de *L. semaranga* y *L. andamana*. Mientras que las especies saprófitas pueden ser diferenciadas en dos grupos de acuerdo a su capacidad de crecimiento en aire libre de CO₂ y además a sus requerimientos de vitamina B₁₂ (38,87).

La diferenciación entre especies se logra estudiar mediante la acción que presentan frente a iones divalentes de cobre, al

crecimiento en presencia o en ausencia de CO_2 , a su actividad oxidativa y a la capacidad de descomposición de la yema de huevo

Condiciones de incubación y morfología macroscópica

Se ha demostrado que las características morfológicas de las especies de *Leptospira* son dependientes de factores tales como la concentración de agar, pH, autolisinas, tensión de oxígeno, tensión superficial y movilidad de cada microorganismo (67).

El crecimiento de las leptospiras se logra en medios líquidos, sólidos o semisólidos. Los dos últimos se obtienen a partir de los primeros por la adición de 0.2 y 1 % de agar. Los mejores medios para el adecuado crecimiento de especies de *Leptospira* son semisólidos o líquidos debido a su viscosidad, éstos van recubiertos con una capa de parafina para retardar la evaporación del mismo, el crecimiento después de una incubación a 30°C

durante 1 o 2 semanas, es observable porque aparece una banda turbia de escasos milímetros por debajo de la superficie, llamado anillo de Dinger. Este tipo de cultivo permanece viable durante cinco o seis meses a temperatura ambiente, si se transfiere del 5 al 10 % del volumen del subcultivo cada tres o cuatro meses. Además puede conservarse por congelación de -75° a -130°C con agentes crioprotectores, tales como el dimetil sulfóxido o glicerina en presencia de nitrógeno líquido; no así a -20°C , ni por liofilización (63).

Para propósitos serológicos se cultiva a la espiroqueta en medios líquidos que no sobrepasen un período mayor a tres semanas de incubación. Los semisólidos se utilizan principalmente en el aislamiento de especies, así como para el mantenimiento prolongado de las cepas; los sólidos son útiles para el estudio de materiales contaminados y de clonas específicas (19).

En los medios sólidos se desarrollan principalmente dos tipos de colonias, que se denominan con los números 1 y 2. Las primeras

son colonias pequeñas, relativamente opacas que generalmente se logran aislar a partir de órganos infectados. Las segundas son de mayor diámetro, de aspecto translúcido y con una especie de tela o velo recubriéndolas que además las caracteriza por un crecimiento periférico en la caja de cultivo. Ambas son redondas con superficie lisa y bordes bien definidos, existiendo excepciones en una minoría de especies que presentan bordes irregulares con superficies rugosas, considerándose a tales, como colonias de transición o inmaduras. También existen variantes dependiendo de la concentración de agar, si éste se encuentra al 1 % se logran desarrollar colonias difusas, sin pigmento y cóncavas y desde claras hasta turbias con agar al 2 % (13,63).

Se cree que el diámetro de las colonias varía dependiendo de la movilidad que presente cada serotipo; en el caso de aquellas que no son tan móviles la proliferación será local, y viceversa. Se ha reconocido que las espiroquetas que se encuentran microscópicamente con una terminación en forma de gancho presentan elevada virulencia y movilidad, la cual puede ser

eliminada si se incuba en un medio deficiente nutricionalmente a 37°C; sin embargo macroscópicamente no se logra diferenciar entre una especie patógena y una saprófita. Se ha encontrado que el piruvato sí estimula el crecimiento de especies patógenas; sin embargo esto tampoco es determinante para su diferenciación (17).

En medios suplementados con hemoglobina el crecimiento es más abundante y el tiempo de aparición de las características coloniales es menor (17,68).

Las colonias resultan del crecimiento de células individuales y por la división que lleva a cabo la leptospira madre para dar dos o más partes que originan nuevas leptospiras pequeñas y desiguales. Para el caso de leptospiras saprófitas, se comienza a observar crecimiento durante el cuarto y sexto día de incubación, y para el séptimo o décimo las colonias ya presentan diámetros que van de 1 a 4 mm. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C y la mínima entre 5 y 10°C; así mismo, la tolerancia que presentan a la concentración de suero está en un rango del 10 al 50 %. Por otro

lado, los serotipos patógenos soportan concentraciones mayores a esta última, su tiempo de incubación se prolonga por tres o cinco días más, presentando la misma morfología que las saprófitas, con temperatura óptima de crecimiento de 25°C y mínima entre 10 y 13°C. Si los tiempos de incubación se alargan más de lo debido, las colonias crecen tanto que se comienzan a fusionar (17,38,45).

Las *Leptospiras* son consideradas espiroquetas aerobias estrictas, con un tiempo de generación de 24 a 48 horas tanto *in vivo* como *in vitro*. El pH al que se lleva a cabo este crecimiento es de 7.2 a 7.4, conservándose durante la incubación ya que estas espiroquetas no llevan a cabo la fermentación de carbohidratos y su capacidad oxidativa es limitada lo que da como resultado cadenas viables después de un prolongado período de incubación (45,67)

II. IMPORTANCIA CLÍNICA

i. Generalidades

La leptospirosis es una enfermedad causada por miembros patógenos del género *Leptospira*, entre los cuales varios serotipos se han asociado a afecciones o síndromes definidos, por ejemplo: *L. icterohaemorrhagiae* a la "enfermedad de Weil", *L. canicola* a la "fiebre canícola", *L. pomona* a la "enfermedad del porquerizo", *L. grippityphosa* a la "fiebre de los pantanos" o "fiebre del barro"; cabe subrayar que el uso de estos nombres como sinónimos de infecciones por leptospirosis es confuso e inexacto, ya que en la actualidad es evidente que ningún síndrome clínico puede atribuirse exclusivamente a un serotipo específico y que ningún serotipo causa invariablemente la misma entidad clínica. No obstante, en aras de la exactitud y claridad es conveniente usar el término genérico "leptospirosis", independientemente del serotipo

infectante. En este contexto, el padecimiento tiene distribución mundial y es una de las zoonosis de mayor importancia (25).

Laundouzy (1883) y Weil (1886) publicaron descripciones clínicas de una ictericia infecciosa humana que parecía diferir de la habitual ictericia catarral; dicho cuadro recibió el nombre de síndrome de Weil detectándose diversos casos en Europa y Oriente. Sin embargo, el agente etiológico siguió siendo desconocido, hasta 1915, cuando Inada y cols aislaron a una espiroqueta a partir de la sangre de un paciente que presentaba la afección. Más tarde, Noguchi asignó al microorganismo un nuevo género: *Leptospira*, y lo llamó *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Todas las leptospiras patógenas se alojan inicialmente en hospedadores animales y se transmiten directa o indirectamente por el agua y el suelo. El ciclo infectivo en los animales incluye de manera trascendental la emisión de leptospiras en la orina, y es así que el hombre las puede adquirir, tanto por contacto con tejidos de animales infectados como por contacto directo o indirecto con la

mencionada orina. Los microorganismos expulsados con la micción sobreviven en agua neutra o ligeramente alcalina, o bien, en suelos húmedos durante varias semanas, sobre todo si la temperatura es mayor de 22°C. En climas calurosos, el agua fresca de estanques, arroyos de movimiento lento, drenajes, canales y barro suele permanecer contaminada y potencialmente infectiva durante mucho tiempo (23,63).

Las leptospiras son esencialmente parásitos de mamíferos, entre los cuales los roedores (ratas y ratones) y algunos animales domésticos desempeñan un papel predominante en su transmisión al hombre. Como su contacto con el hombre es mundial y varía desde la aproximación casual (durante las actividades de recreación y ocupacionales) hasta la vivienda compartida, es comprensible que la leptospirosis no manifieste límites geográficos. Los animales domésticos, especialmente los perros, cerdos y vacas, son las principales fuentes de infección humana en los países subdesarrollados. La leptospirosis afecta a personas de todas las edades, durante todas las estaciones y en ambos sexos

pero, sobre todo, es un padecimiento de adultos jóvenes varones y en climas calurosos (verano y otoño); sin lugar a dudas, representa una amenaza para los dueños de animales domésticos, para algunos grupos ocupacionales y para los aficionados a deportes al aire libre, tales como la caza, la pesca y la natación, en estos últimos casos, debido a que las aguas superficiales de las áreas rurales suelen estar contaminadas. En cuanto a los grupos ocupacionales más vulnerables a la infección, destacan quienes trabajan industrialmente con peces y aves, los veterinarios, mineros, reparadores de alcantarillas y desagües, personas que cuidan animales, obreros de los mataderos y frigoríficos, e inclusive quienes manejan con la mano cereales, arroz, verduras y caña de azúcar.

ii. Patogenia y patología

La inoculación intraperitoneal de leptospiras en cobayos da lugar a la rápida invasión de la sangre circulante por lo que, después de 24

horas, el microorganismo coloniza prácticamente todos los órganos y tejidos del animal. A medida que el cuadro patológico avanza, la infección se extiende sin obstáculo alguno, pudiéndose observar a la bacteria hasta en el líquido cefalorraquídeo, cerebro y cámara anterior del ojo (en ausencia de irritación visible o hemorragia). Esta clase de observaciones llevó a Green y Areal (1964) a la conclusión de que las leptospiras penetran mecánicamente en los tejidos y son transportadas hasta ellos mediante las hemorragias. Esta afirmación está respaldada por la observación clínica de la enfermedad humana, en el sentido de que las leptospiras invaden regularmente el espacio subaracnoideo y la cámara anterior del ojo sin provocar inflamación significativa alguna. Las lesiones que ocurren en los tejidos parecen ser de índole tóxica, independientemente de que las hemolisinas producidas *in vitro* e *in vivo*, explican la hemólisis intravascular; asimismo la hemorragia parece deberse a daños de las células endoteliales, causados por una citotoxina (80).

La muerte debida a leptospirosis anictérica es extremadamente rara, por lo cual el conocimiento de la anatomía patológica asociada a la leptospirosis se ha adquirido principalmente a partir del estudio de casos fatales por enfermedad de Weil. En la autopsia, los únicos cambios visibles son el color biliar de los tejidos y las grandes equimosis o petequias en músculo estriado, riñones, suprarrenales, hígado, estómago, bazo y pulmones, con hemorragia menor en otros lugares. En los riñones, las alteraciones más graves se producen en el epitelio tubular, destacando la tumefacción turbia y la necrosis total; los túbulos se dilatan y los lúmenes de los túbulos medulares pueden contener cilindros celulares, sangre, cilindros hialinos manchados de bilis y otros desechos; otras alteraciones evidentes son el edema intersticial, hemorragias aisladas e infiltración de células mononucleares. En los pacientes con insuficiencia renal aguda, el hallazgo clásico es una necrosis tubular aguda inespecífica (52,57).

Por lo que respecta al hígado, el examen histológico revela disociación de los cordones hepáticos con separación de

hepatocitos, áreas focales de necrosis alrededor de las venas centrales, aumento del número de células hepáticas binucleadas, infiltración leve a moderada de neutrófilos y células redondas y acumulación de bilis espesa en los canalículos. En general, los cambios patológicos del hígado son inespecíficos y poco importantes, y no muestran mayor correlación con el grado de deterioro funcional; las leptospiras rara vez son demostrables en los tejidos hepáticos y la atrofia amarilla aguda es un hallazgo muy poco común (78).

En el músculo esquelético, al inicio del cuadro ocurre con la pérdida focal de estriaciones cruzadas, vacuolización y hialinización; en las etapas posteriores se evidencia una severa necrosis e, inclusive, se pueden evidenciar antígenos de leptospiras en las áreas de mayor degeneración muscular. En los pacientes con síntomas pulmonares, suele aparecer una neumonitis hemorrágica, en placas localizadas, las hemorragias representan las únicas lesiones características en otros órganos.

iii. Características clínicas

Las manifestaciones clínicas y la severidad de la leptospirosis pueden ser muy variables; los médicos que conocen los cambiantes rasgos de la enfermedad y su curso natural rara vez dejan de considerar el diagnóstico correspondiente. Aproximadamente, 10 a 15 % de los pacientes presentan los signos típicos de la enfermedad de Weil: ictericia, hemorragia y daños renales, y prácticamente todos los casos de defunción debidos a leptospirosis se producen en este grupo de individuos; en cuanto al 85 a 90 % restante, la mayoría padece cuadros agudos benignos, anictéricos y autolimitados (70).

En promedio, el período de incubación de la leptospirosis es de 10 días, con límites habituales de 7 a 13 días; sin embargo, exposiciones aisladas, como en los accidentes de laboratorio, los límites extremos son de 2 a 26 días (42).

iv. Fases de la Enfermedad

La leptospirosis es una enfermedad bifásica, la cual se aprecia mejor en los pacientes anictéricos. La fase inicial "septicémica" o "leptospirémica", se caracteriza por manifestaciones clínicas de infección sistémica aguda y por la presencia de leptospiras en la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR). Cuatro a siete días después de iniciado el cuadro tiene lugar una evidente mejoría asintomática que coincide con la desaparición de las leptospiras de la sangre y del LCR. No obstante, previo intervalo asintomático de 24 a 72 horas, aparece la segunda fase "inmune", con la reaparición de la fiebre y la recurrencia o intensificación de la cefalalgia. Este período de la afección se caracteriza por el desarrollo de inmunidad y por la aparición de anticuerpos circulantes IgM. Las leptospiras no pueden aislarse a partir de la sangre ni del LCR después de la primera semana, pero aparecen en la orina mediando la segunda. El grado de variabilidad en la severidad y las manifestaciones de la fase leptospirúrica, representan un marcado contraste en relación con el monótono

cuadro clínico del primer período; durante aquella, diversos pacientes son asintomáticos, otros manifiestan síntomas durante uno a tres días y algunos evidencian una morbilidad extendida (1).

Primera Fase

Generalmente la leptospirosis inicia de manera abrupta con cefalea, escalofríos, fiebre, dolor muscular, anorexia, náuseas, vómitos y postración. La cefalea es frontal, a veces bitemporal u occipital, severa, constante, poco pulsátil y persistente durante varios días. Se ha comprobado con plenitud, que pacientes con cefalea y rigidez de nuca muestran un líquido cefalorraquídeo (LCR) normal cuando se les practica la punción lumbar para buscar evidencias de meningitis. Las molestias musculares son mayores en las pantorrillas y áreas lumbares; la fiebre es universal con picos alternos, los escalofríos pueden ser recurrentes durante tres a cinco días, la anorexia, náuseas y vómitos son muy comunes y, aunque el estreñimiento es la regla, algunos individuos sufren de

diarrea. El dolor abdominal es frecuente, pero debido al compromiso de los músculos de la pared abdominal y no a inflamación del tracto gastrointestinal. Otros síntomas tales como tos, disnea y dolor en el tórax llegan a ser regulares en algunas personas y la afección del aparato respiratorio es un rasgo importante de la primera fase aunque la hemóptisis es muy poco frecuente (2,33).

Los pacientes examinados al comienzo de la enfermedad suelen estar febriles, deshidratados, letárgicos y pueden presentar confusión o delirio. Una bradicardia relativa y presión arterial normal o baja son signos consistentes; la hipersensibilidad muscular puede ser marcada en presencia de mialgia severa y a menudo hay rigidez de la nuca. El signo físico más característico y útil es la sufusión de la conjuntiva, que se encuentra en el 80 a 85 % de los casos. Los ojos adquieren un aspecto rosado vivo similar al que resulta de su exposición a la natación en agua dulce. La fotofobia y el ardor son comunes, pero raramente se encuentran exudados purulentos y quemosis. Con mucha menor frecuencia

pueden evidenciarse esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía, erupción macular, maculopapular, urticaria y estertor o signos de consolidación pulmonar. La muerte es poco común durante la primera semana de la enfermedad, incluso en pacientes con el mal de Weil. Las manifestaciones inespecíficas de esta fase sugieren diagnósticos tales como neumonía bacteriana, tífus, tularemia, bronquitis aguda e infección viral.

Segunda Fase

Meningitis. La meningitis aséptica representa la principal manifestación de la fase inmune de la enfermedad; aproximadamente el 50% de todos los pacientes muestra signos y síntomas, pero menos de la mitad de ellos evidencian el cuadro completo de meningitis, con severa cefalalgia, rigidez de cuello y vómitos. Algunos de estos últimos pacientes permanecen postrados una semana o más y pueden requerir analgésicos narcóticos para aliviar sus síntomas. Los enfermos con cefalea

severa suelen experimentar considerable alivio al recibir una punción lumbar. Alrededor del 30 al 35 % de los pacientes muestra pleocitosis pese a la ausencia de síntomas y signos de meningitis, por su parte, el 15 a 20 % restante presenta un líquido cefalorraquídeo normal durante todo el curso de la enfermedad (2,17).

Ni el desarrollo ni la severidad de la meningitis se correlacionan con la severidad de otras manifestaciones de la leptospirosis; de hecho, no es raro que un paciente que ha tenido una enfermedad insignificante de primera fase busque ayuda médica solamente después de sufrir síntomas graves de meningitis; por ello es que ha surgido el concepto de meningitis "pura" por leptospiras, aunque los antecedentes detectados generalmente traen a la luz la existencia de la enfermedad febril anterior.

En la meningitis, los leucocitos del líquido cefalorraquídeo (LCR) van desde menos de 10 a más de 1,000 por mm^3 , aunque los neutrófilos pueden predominar inicialmente, el porcentaje de

linfocitos sube después y la linfocitosis del LCR suele persistir durante seis a ocho semanas después de que el paciente se ha vuelto asintomático. Las proteínas se elevan hasta 80 a 120 mg por mm^3 al principio de la meningitis, pero después bajan y la glucosa es generalmente normal, aún cuando, a veces disminuye. Además, puede detectarse un líquido cefalorraquídeo xantocrómico en los pacientes con ictericia .

Otras lesiones del Sistema Nervioso. Diversas lesiones del Sistema Nervioso pueden ocurrir en la fase inmune; aunque afortunadamente esto no es tan común, ya que todas ellas pueden ser muy graves. Las más destacadas son: encefalitis, mielitis, radiculitis, síndrome de Guillan-Barré y lesiones nerviosas periféricas. Los trastornos en los nervios óptico, oculomotor, facial, glossofaríngeo, auditivo y espinal se parecen a las secuelas de ciertas infecciones, vacunaciones e hipersensibilidad a agentes antibióticos y sueros, por lo cual se cree que tienen la misma patogenia.

Uveítis. Algunos autores han reportado el compromiso del tracto uveal en un alto porcentaje de sus pacientes, pero otros lo han encontrado poco frecuente, al parecer porque pasa fácilmente inadvertido. Existen casos positivos de aislamiento de leptospiras viables a partir del humor acuoso de pacientes con lesiones del tracto uveal; sin embargo, la uveítis no siempre se debe a la persistencia de microorganismos en la cámara anterior. Estudios realizados han demostrado que no ocurren infecciones por leptospiras en los pacientes con uveítis no explicada. En contraste con otras manifestaciones de leptospirosis, la uveítis se evidencia hasta la convalecencia o después de un período latente de varias semanas o meses. El pronóstico de curación es excelente, pero el deterioro visual puede ser permanente (19).

Enfermedad de Weil

Este nombre es el más utilizado para referirse a una leptospirosis grave caracterizada por ictericia, azoemia, hemorragia, anemia,

colapso vascular y trastornos de la conciencia. Al contrario de la leptospirosis anictérica benigna, la enfermedad de Weil representa un estado de riesgo mortal y no puede compararse con la enfermedad tradicional debida a *L. icterohaemorrhagiae*, pues cada serotipo patógeno posee mayor o menor potencial para causar este síndrome. Aunque su importancia es muy relativa desde el punto de su frecuencia, esta variante de la leptospirosis rebasa con mucho a la forma anictérica en cuanto a mortalidad y como es de esperar, los síndromes incompletos donde faltan una o más de las manifestaciones principales tienen mejor pronóstico.

Un cuadro básico de la enfermedad es común a todas las variantes de leptospirosis y la iniciación y primera fase de la enfermedad de Weil, antes de aparecer la ictericia, no se distinguen de las de leptospirosis anictérica. Las manifestaciones típicas del síndrome, con ictericia, hemorragia y daños renales, se evidencian por primera vez entre el tercero y el quinto día de padecimiento y llegan a su punto máximo en la segunda semana; las leptospiras desaparecen de la sangre y del LCR alrededor del séptimo día. No

obstante, en la fase inmune, la fiebre tiende a subir más que en la enfermedad anictérica y puede persistir de 2 a 3 semanas (1,78).

Aunque en el cuadro clínico pueden predominar las manifestaciones hepáticas, renales o hemorrágicas, la muerte se debe generalmente a insuficiencia renal o hemorragia y no a insuficiencia hepática. Afortunadamente, al perfeccionarse los métodos de tratamiento de la deshidratación, el choque y la insuficiencia renal aguda en los últimos años, el índice de mortalidad de la enfermedad de Weil ha declinado en países desarrollados, desde 25 a 40 % hasta 5 % o menos.

Daños Hepáticos

El crecimiento y la hipersensibilidad hepáticos son regla en presencia de ictericia, pero se encuentran raramente en su ausencia. Los niveles séricos de bilirrubina permanecen generalmente por debajo de los 20 mg por 100 mL, con predominio

de la fracción conjugada, pero se ha registrado hiperbilirrubinemia extrema en algunos casos, generalmente aquellos con la triada de insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y compromiso grave del hígado. Hay evidencia de que la excreción de bilirrubina está bloqueada a nivel subcelular.

La producción de protrombina es generalmente normal pero, si está alterada, dicha deficiencia puede corregirse con vitamina K o alguno de sus precursores. Afortunadamente, las funciones hepatocelulares esenciales se encuentran menos comprometidas de lo que el grado de ictericia hace suponer, por lo que la recuperación total de los daños hepáticos es total en los pacientes que sobreviven (18).

Daños renales

La disfunción renal es común en la leptospirosis, lo cual se observa en el 70 % de los enfermos como proteinuria, oliguria transitoria,

hematuria microscópica y elevación moderada de nitrógeno de urea en sangre, principalmente durante la primera fase; de hecho, sólo con raras excepciones los daños renales importantes se limitan a los pacientes con enfermedad de Weil. La lesión renal se asocia a choque, hiperbilirrubinemia extrema y hemoglobinemia en los individuos más graves; la insuficiencia renal llegó a ser la principal causa de muerte, pero la frecuencia de la necrosis tubular aguda se ha logrado reducir con el oportuno reemplazo de líquidos y de sangre en la primera fase de la enfermedad, y el uso de métodos modernos de tratamiento de insuficiencia renal aguda, incluida la diálisis, cuando ésta es necesaria (57).

Compromiso cardíaco

Los cambios electrocardiográficos que se relacionan con anomalías de la onda T y disturbios menores de conducción son relativamente comunes en esta enfermedad. Por lo regular, las manifestaciones cardíacas clínicamente significativas suelen ser escasas, por lo que

las contracciones ventriculares prematuras, aleteo auricular, taquicardia ventricular y fibrilación auricular paroxística sólo se han descrito para algunos enfermos, al igual que otros trastornos miocárdicos tales como dilatación, ritmo de galope ventricular e insuficiencia cardíaca congestiva (19).

Anemia

Este es un rasgo común de la enfermedad de Weil, pero es rara en ausencia de ictericia; puede ser muy grave, es de origen multifactorial y se debe a hemólisis, hemorragia y azoemia (15,57).

v. Prevención y tratamiento

La existencia de vacunas leptospirales de uso humano data de más de 50 años, pero quedan por resolver varios problemas importantes; las que se constituyen por leptospiras inactivadas se

han estudiado ampliamente sin mayores resultados y las que contienen bacterias vivas compuestas por cepas virulentas cultivadas en medios especiales aún se encuentran bajo investigación. Aunque el uso general de las vacunas no puede justificarse debido a la índole esporádica de la leptospirosis, su empleo sería benéfico para la protección de trabajadores en ciertas ocupaciones de alto riesgo. No obstante, las vacunas confeccionadas con microorganismos muertos confieren un mínimo de protección contra los serotipos heterólogos, por lo que deben fabricarse "a la medida" usando el serotipo específico contra el cual se espera que ocurra la exposición (1,38,52).

En otras palabras, quizá hasta que se logren producir vacunas polivalentes potentes y seguras se deberán aplicar otros enfoques destinados al control de la leptospirosis. Por ejemplo, el establecimiento de campañas educativas que alerten a los afectos a deportes al aire libre, a los dueños de animales domésticos y a ciertos grupos ocupacionales a fin de que la gente implicada conozca los riesgos de la enfermedad; el peligro de nadar o vadear

en aguas superficiales a las que tienen acceso animales domésticos o salvajes debe hacerse conocer ampliamente. Es necesario que los dueños de animales, los veterinarios y los trabajadores de la ganadería sepan protegerse del contacto con orina o tejidos de animales enfermos usando guantes y delantales de goma; del mismo modo es conveniente que quienes laboran en la producción de la caña de azúcar y el arroz, en los mataderos y frigoríficos, así como en los criaderos de cerdos, cuenten con ropa y zapatos protectores (70).

La frecuencia de infección debida a *L. icterohaemorrhagiae* en las áreas urbanas se puede reducir purificando las aguas, aplicando sistemas de eliminación de residuos y desagües y estableciendo programas vigorosos de control de roedores.

Por lo que se refiere a la terapéutica, se ha encontrado que las leptospiras muestran susceptibilidad *in vivo* a gran variedad de fármacos antimicrobianos, incluyendo penicilinas, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina. El tratamiento antibiótico puede resultar

exitoso cuando se inicia en los primeros cuatro días de la enfermedad, ya que si empieza después del quinto día ya no altera el curso y evolución del proceso patológico. Adicionalmente, la antibioticoterapia parece ser ineficaz en los casos de ictericia o meningitis (19).

Los regímenes terapéuticos más aceptados incluyen el empleo de penicilina soluble en dosis diarias de 2.4 millones de unidades o tetraciclina en dosis de 2 g diarios, si bien la primera es la preferida de los expertos; la cefalalgia debe aliviarse, la depleción de volumen debe corregirse y la sangre debe reemplazarse en la enfermedad de Weil.

En general, los padecimiento leptospirales dejan pocas secuelas: en quienes sobreviven a la enfermedad de Weil, el hígado y los riñones recuperan plenamente su función, excepto cuando algunos casos en los que se presenta el deterioro permanente de la concentración renal. La uveítis suele resolverse por completo, aunque se han reportado varios casos de ceguera y de formación

de cataratas y, en cuanto a la meningitis, ésta desaparece sin dejar secuelas, pero la recuperación de las lesiones "postinfecciosas" del sistema nervioso es prolongada y puede ser incompleta.

La frecuencia de la leptospirosis sistémica crónica puede descartarse, ya que sólo se ha documentado un caso único en el que el paciente era probablemente inmunodeficiente. Aunque las leptospiras pueden subsistir durante varios meses en la cámara anterior del ojo y en los túbulos renales, su presencia causa poco o ningún daño en los riñones y muy escasa reacción ocular, incluyendo una uveítis indolora (31).

Los reportes sobre la leptospirosis indican que esta enfermedad es más severa en algunos lugares que en otros; en América Latina y en las islas del Caribe se le considera como un serio síndrome hepatonefrítico y gran número de casos anictéricos pasan inadvertidos. Por su parte, en los países desarrollados (en donde los clínicos conocen principalmente la forma anictérica de la enfermedad) los pacientes con enfermedad de Weil constituyen

una minoría del total de casos de leptospirosis. En este sentido, es probable que las variaciones geográficas sobre la severidad de la leptospirosis sean más aparentes que reales y que se puedan atribuir a diferencias en cuanto al conocimiento o desconocimiento de todo el espectro clínico de la enfermedad.

En E.U.A., de 1905 a 1974, el porcentaje de casos de leptospirosis debidos a *L. icterohaemorrhagiae* disminuyó de 90 % (antes de 1946) a 40 % (de 1949 a 1961) y a 20 % (de 1965 a 1974). Antes de 1948, el total de casos fue de 299, con gran mayoría de ictericos y un índice aproximado de mortalidad del 25 %. En cambio, de los 791 casos registrados entre 1965 y 1974, menos del 15 % fueron ictericos y, de ellos, sólo el 5% derivó en defunciones (18).

III. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

En esta sección se conjuntan la identificación de *Leptospira* con el diagnóstico de leptospirosis ya que, evidentemente, la primera se encuentra contenida en el segundo. Dentro del mencionado diagnóstico, se aplican dos tipos de métodos: los directos y los indirectos: los primeros se usan para evidenciar a la espiroqueta o fracciones de la misma, mientras que, los segundos, se basan en el hallazgo de anticuerpos séricos dirigidos contra ella.

Por lo que se refiere a estudios epidemiológicos, es importante realizar la tipificación de los serotipos de cada especie, lo cual se lleva a cabo únicamente en los laboratorios especializados para tales efectos, tales como los de referencia de la leptospirosis de la OMS ("The WHO Leptospirosis Reference Laboratories") y los del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta.

i. Diagnóstico directo

En cuanto al diagnóstico directo, es de subrayarse la carencia de patrones de pruebas bioquímicas para identificar a las leptospiras; de hecho, un rasgo trascendental de estos microorganismos radica en su carencia de cinasas; por tal razón el género no puede utilizar sustratos tales como glucosa, glicerol, acetato, piruvato y ribosa (5,21).

Muestras

Las muestras empleadas para efectuar métodos directos se seleccionan dependiendo de la fase de la enfermedad: para la leptospirémica, sangre o LCR y, para la inmune, principalmente orina (17).

Manejo y preparación de las muestras

El sedimento obtenido a partir de la centrifugación de muestras de sangre, LCR, orina y diversos tejidos se puede observar para detectar presuntivamente a las espiroquetas, mediante microscopía de campo oscuro, por medio de tinciones, o bien, por inmunofluorescencia directa o indirecta; cabe señalar que en todos esos casos se requiere de la presencia de una concentración elevada de leptospiras, a fin de que no se obtengan falsos negativos.

La recolección de muestras sanguíneas se efectúa empleando anticoagulantes tales como heparina u oxalato al 1 %; no se debe utilizar citrato de sodio, debido a que ejerce acción inhibitoria contra las leptospiras; posteriormente, se centrifuga a 500 x g durante 15 minutos, el plasma se separa y se transfiere a otro tubo para llevar a cabo una nueva centrifugación, ahora a 1,500 x g durante 30 minutos; se recupera el sedimento, en el cual se espera que se hayan concentrado los microorganismos y, en el caso de que la

muestra no sea procesada el mismo día de la toma, debe de recurrirse a un medio adecuado de conservación destacando en este sentido el sulfonato de polietanol al 1 % almacenado a bajas temperaturas .

Los tejidos de mayor elección suelen ser el riñón y el hígado; a partir de ellos se obtiene una suspensión al homogeneizarlos en un mortero con solución amortiguadora, momentos antes de realizar las centrifugaciones y demás tratamientos descritos en el párrafo anterior.

En cuanto a la muestra de LCR, es importante considerar que su uso sólo está indicado cuando se observan alteraciones neurológicas asociadas a probables meningitis.

La orina, obtenida por micción media, se transfiere inmediatamente a un medio básico, debido a que las leptospiras poseen poca resistencia a los medios con pH ácido; además, debe considerarse la posibilidad de recolectar varias muestras al día, tomando en

cuenta que la expulsión de estos microorganismos llega a ser muy inconstante.

Para el caso de muestras de orina y LCR, se realiza únicamente una centrifugación a 1,500 x g durante media hora y se recupera el sedimento, a partir del cual se monta una preparación para hacer las observaciones microscópicas correspondientes. Cabe mencionar que existe un alto índice de errores debidos a la presencia de artefactos que se confunden con la espiroqueta; por tal motivo, el éxito de las observaciones depende en gran medida de la experiencia del personal del laboratorio (18).

Tinciones

La principal técnica de tinción empleada en la identificación de las leptospiras es la de impregnación argéntica con nitrato de plata (método de Fontana-Tribondeau), aunque se cuenta con algunas otras cuya base consiste en teñir a la espiroqueta, aplicando

colorantes de contraste. Para tal efecto se emplea el azul de metileno preparado con solución salina, el cual se pone en contacto con las espiroquetas vivas y con ácido ósmico durante 20 a 30 segundos; con esta mezcla se hace un frotis que se deja secar al aire y se fija con alcohol metílico por un período de 30 minutos; posteriormente, se puede utilizar un colorante de contraste (como el de Giemsa) con el cual se tiñe por 54 horas a 50°C para finalmente enjuagar con acetona-xilol; las espiroquetas se observan teñidas de azul pálido con un rojo tenue a su alrededor.

Existe otro método alternativo diseñado por Hoffman, el cual es equivalente al anterior y cuya única variante consiste en el empleo de rojo Congo como colorante de contraste.

Por lo que se refiere a la impregnación argéntica, la técnica inicia con la fijación del sedimento, utilizando una solución de ácido acético-formol; la preparación se lava con agua destilada, se adiciona un agente clarificante y, después de un nuevo lavado, se adiciona la solución de nitrato de plata amoniacal; finalmente, la

preparación se lava, se deja secar y se observa: las leptospiras se evidencian de un color café claro en un medio amarillo claro (21).

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia, tanto directa como indirecta es ligeramente más sensible que la observación directa del sedimento o que las diversas tinciones, ya que en ella participan anticuerpos (Ac's) específicos. En ambos casos se coloca una pequeña muestra del sedimento de la orina o del LCR en un portaobjetos, se deja secar y se fija con alcohol durante 10 minutos; posteriormente, cuando se trata de inmunofluorescencia directa se hace reaccionar con un Ac anti-leptospira conjugado por espacio de 2 h a 37°C, se lava con solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) o con PBS al 10 % (preparado en glicerol a pH=7.5). En el caso de inmunofluorescencia indirecta, el Ac anti-leptospira no se encuentra conjugado con el fluorocromo, lo cual sí ocurre con el anti-gamma

globulina, dirigido contra el primero. Finalmente, se observa en un microscopio de fluorescencia (42,59,75).

Técnicas de biología molecular

Las pruebas destinadas a la detección de microorganismos por medio de la identificación de sus respectivos ácidos nucleicos, suelen poseer un elevado índice de especificidad; independientemente de la confiabilidad implicada, dicha especificidad resulta muy apropiada para el género *Leptospira*, dado el elevado polimorfismo que se presenta.

La línea de estudio inicia con la lisis celular y posterior extracción del DNA, el cual preferentemente se somete a la reacción en cadena de la polimerasa, ésta se considera en la actualidad como la principal herramienta de las pruebas de biología molecular.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, protein chain reaction) es un método realizado *in vitro* para amplificar el DNA hasta en 10^6 veces. Posteriormente los fragmentos que se obtienen, son identificados mediante alguna otra técnica complementaria, empleándose enzimas de restricción (REA), electroforesis, inmunotransferencias o hibridaciones DNA/DNA (49,72).

La PCR se lleva a cabo sometiendo el DNA "blanco" a una serie de cambios de temperatura, en presencia de la *Taq* DNA polimerasa y a diferentes intervalos de tiempo, realizando entre 30 y 35 ciclos de amplificación repetitivos, cada uno de los cuales consta a su vez de tres etapas básicas: (48)

1. Desnaturalización. En este paso, efectuado generalmente a una temperatura de 94°C , la doble hélice se separa, vía el

rompimiento entre los puentes de hidrógeno que enlazan las bases de ambas hebras (48)

2. Unión de los cebadores. Los cebadores (primers) corresponden a dos oligonucleótidos que se unen a los extremos 3' de cada una de las hebras del DNA, delimitando la región a amplificar; la temperatura requerida para tal efecto suele ser de 63°C durante 1.5 minutos. Para el caso del género *Leptospira*, se ha encontrado que los cebadores adecuados son los llamados G1/G2, obtenidos a partir de un plásmido que logra hibridar con la mayoría de los serogrupos patógenos, con excepción de *L. kirschneri*. Por lo regular, se trata de oligonucleótidos complementarios de los extremos del segmento de DNA leptospiral que codifica para la síntesis del 16S rRNA (83).

3. Elongación. Es el tercer y último paso del ciclo y dura aproximadamente 45 segundos; en él se eleva nuevamente la temperatura hasta 72°C, durante 2 minutos, en presencia de los desoxinucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP y la *Taq* DNA

polimerasa, ésta se encargará de elongar las hebras a partir de los cebadores (64).

De este modo los fragmentos obtenidos también servirán como molde de amplificación para los siguientes ciclos, dando lugar a un número de moléculas de DNA en orden exponencial de 2^n en "n" número de ciclos cumplidos, hasta que ocurre una fase estacionaria (llamada "efecto meseta") en la que el producto deja de acumularse en forma exponencial.

La aplicación de la PCR es particularmente importante en la identificación de aquellos microorganismos de nulo o lento crecimiento *in vitro*, como el género *Leptospira*, cuyo cultivo requiere de períodos prolongados de incubación. Es decir, la PCR logra diagnosticar la enfermedad en forma temprana haciendo manifiesta la infección activa, tanto en fluidos biológicos como en tejidos infectados (52).

Las muestras biológicas más empleadas son la sangre, líquido cefalorraquídeo, tejidos diversos y orina, siendo esta última la de mayor elección debido al volumen que puede recolectarse y a la cantidad de sedimento urinario que se obtiene. Es importante hacer notar que la PCR puede realizarse a partir de orina congelada o preservada con formalina, a diferencia de los cultivos, que exigen muestras frescas; en otras palabras la identificación de la bacteria no depende de que ésta se encuentre viva o muerta (72).

Si bien se considera que la presencia de leptospiras en orina sólo resulta evidente a partir de la segunda semana de la enfermedad y hasta un año después, dicha limitante no existe en caso de la PCR, ya que ésta es muy sensible y detecta al microorganismo desde la primera semana (2,12,30,46,61,76).

Inmunotransferencia (Southern blot) e Hibridación

La inmunotransferencia se desarrolla principalmente en tres

etapas, la primera de ellas corresponde al corrimiento electroforético, seguida de la transferencia de los fragmentos a una membrana de nitrocelulosa. Dicha transferencia se realiza colocando la membrana sobre el gel formando un "sandwich" con dos esponjas que se encuentran saturadas con solución amortiguadora; el sistema se mantiene entre dos placas de plástico sumergidas en la misma solución. Pasando una corriente eléctrica entre ambas esponjas los fragmentos se desplazan desde el gel hacia la membrana sin pérdida alguna de la resolución. Finalmente, la tercera etapa corresponde a la visualización de la transferencia mediante ensayos inmunoenzimáticos o RIA (28,56,73,75).

Mediante esta técnica se ha encontrado que el DNA de los serogrupos patógenos presentan tres diferentes poblaciones del mismo, nombradas como alfa, beta y gamma; de las cuales, la última es considerada como la de mayor importancia diagnóstica porque hasta ahora se cree que es un elemento extracromosómico, o bien, un microsoma lineal que le otorga la gran diversidad genética al género. De gran relevancia ha sido que dicha fracción

gamma únicamente se ha encontrado en serovariedades patógenas, por lo cual se considera que se encuentra asociada a la virulencia de la misma (6,27,73).

La hibridación del DNA se realiza a partir de una serovariedad de referencia sembrada en un cultivo que contiene sustratos marcados radiactivamente y que se incorporan en el DNA bacteriano durante el período de incubación. Al término de éste, las células se lisan, se fragmenta el DNA liberado y se somete a una elevación de temperatura o tratamiento químico para obtener dos hebras sencillas. El mismo procedimiento se sigue para el DNA de la muestra del paciente, con la diferencia de que no se adiciona el sustrato radiactivo y se realiza una transferencia a una membrana de nitrocelulosa que lo retiene sólo ligeramente por medio de la estructura del fosfato-carbohidrato dejando a las bases libres; posteriormente se sumerge dicha membrana en el recipiente que contiene el DNA desnaturalizado y marcado radiactivamente con ^3H o ^{32}P y se incuba (17,29,88).

Posterior al período de incubación se puede observar la radiactividad en el filtro, por medio de radiografías, si la hibridación se ha llevado a cabo entre hebras marcadas y no marcadas. También es posible realizar la lectura en un contador de centelleo. Su aplicación en la tipificación de serovariedades es considerada de alto valor pero no lo es tanto en el laboratorio como prueba de rutina debido al tiempo requerido para su elaboración (20,23,24,56).

Cultivo/Aislamiento directo e indirecto

Por lo que respecta a los diferentes tipos de aislamiento, el directo involucra la siembra de la muestra completa, (sangre, LCR u orina) en medios semisólidos o líquidos; ello sólo se emplea como prueba confirmatoria en el diagnóstico, debido a que requiere de un prolongado período de incubación. Por su lado en el indirecto, la muestra se inocula en animales de laboratorio con el fin de aislar

un mayor número de espiroquetas, a partir de órganos específicos (70).

En el aislamiento directo el LCR se adiciona a razón de 0.5 mL por cada 5 mL de medio; la sangre y la orina se emplean en pequeños volúmenes de 1 a 2 gotas para los 5 mL de medio.

Una vez aislado el microorganismo, se identifica con alguna de las técnicas antes señaladas (tinciones diversas, inmunofluorescencia, PCR, etc), o bien, mediante cromatografía de gases, vía la obtención de perfiles de ácidos grasos: en los diagramas resultantes se comparan los picos de diferentes ácidos grasos, con respecto a los empleados como referencia. Se ha encontrado que cerca del 50 % de los ácidos grasos presentes en *Leptospira* corresponden a metil hexadecanoato (C16:0) y los restantes son insaturados, razón por la cual los serotipos se pueden determinar en menor tiempo y con elevada confiabilidad; la eventual aplicación de este método aún se encuentra en estudio, entre otras razones, debido a la amplia gama de serotipos existentes (47).

Serotipificación

A este respecto, la diferenciación de las serovariedades se basa en determinaciones inmunológicas y reacciones de biología molecular, utilizadas conjuntamente, con el fin de aportar mayor confiabilidad a los resultados.

Entre las primeras, las pruebas de mayor aplicación en el laboratorio clínico son las de aglutinación, aunque también se emplean algunas de precipitación, a pesar de su limitada confiabilidad.

Como es sabido, en las reacciones de precipitación es necesario que el antígeno se encuentre en solución, lo cual, en el caso de las leptospiras, debe involucrar de productos de lisis, dializadas con posteriores adiciones de solventes tales como etanol o fenol, a fin de lograr la adecuada extracción de epítopes de la ME. Una vez obtenidos estos últimos, es muy común practicar una doble difusión

en gel, empleando concentraciones de agarosa que fluctúen entre 0.5 y 0.6 %, para lograr una mayor sensibilidad de la técnica (88).

II. Diagnóstico indirecto

Prueba de aglutinación microscópica (PAM)

La PAM se considera el método estándar de referencia en el diagnóstico de la leptospirosis y adicionalmente es la técnica de mayor aplicación dentro del laboratorio clínico, debido principalmente al corto tiempo asociado a su realización; generalmente, se emplean cultivos de 6 a 7 días, con una densidad aproximada de 2×10^8 células/mL, se trate de leptospiras vivas o muertas con formalina.

En algunos laboratorios se prefiere trabajar con bacterias inactivadas (por el menor riesgo para el personal) pero además,

debido a su mayor estabilidad, la cual se prolonga al suspenderse en medios con NaCl al 12 % y glicerina al 20 %; su principal inconveniente reside en la menor reactividad (lo que se traduce en "títulos más bajos" y en la mayor ocurrencia de reacciones cruzadas (42).

La PAM se lleva a cabo en microplacas de 96 pozos e inicia con la adición de solución salina balanceada con fosfatos (PBS), para obtener diluciones seriadas del suero tanto de referencia como del paciente, que se enfrentan a volúmenes iguales del antígeno. La mezcla se incuba por espacio de 2 a 4 horas a 30°C y se procede a realizar la lectura de los resultados. Es de gran importancia establecer rigurosamente tales condiciones a fin de evitar fenómenos líticos asociados a la presencia de lisozimas y/o al complemento (72).

El punto final de la reacción se reconoce cuando se observa el 50 % de células libres o no aglutinadas empleándose microscopio de campo oscuro a (450 x) y para lo cual se emplea una dilución 1:2

del antígeno de referencia en PBS como suspensión control; razón por la cual se considera que el dictamen al ser establecido es bastante subjetivo (16,42).

Continuando con las reacciones de aglutinación, es posible realizar técnicas de hemaglutinación al sensibilizar eritrocitos de camero con fracciones de leptospira (de naturaleza lipopolisacárida o proteica), que se adsorben a la membrana de glóbulos rojos de camero; de esta manera, al enfrentar a estos últimos con diluciones seriadas del suero del paciente, es posible determinar su título con base en la mayor dilución que provoca hemaglutinación franca (16).

Por su parte, los radioinmunoensayos (RIA) y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) se emplean frecuentemente para el diagnóstico indirecto de la leptospirosis y también permiten cuantificar los anticuerpos séricos por medio de marcadores (radioisótopos o enzimas).

Con respecto a la prueba de ELISA, el antígeno conocido se adsorbe a los pozos de una microplaca, a los que posteriormente se adicionan diluciones seriadas del suero del paciente. La incubación correspondiente se lleva a cabo durante 1 h, a 37°C y, a continuación, los pozos se lavan con PBS. Después se incorpora el segundo anticuerpo, un anti-gamma globulina humana marcado con peroxidasa (Ac*) y, previa incubación de 1 h, a 37°C, y de un nuevo lavado con PBS, se agrega el sistema revelador: orto-fenilendiamina/H₂O₂; los casos positivos se reconocen por la formación de un producto de color amarillo, como resultado de la oxidación del compuesto aminado por el oxígeno naciente generado a partir de la degradación enzimática del H₂O₂ cuya intensidad es proporcional a la concentración de los anticuerpos séricos.

Es importante considerar que la técnica se puede realizar empleando cualquiera de los dos tipos de antígenos "género específicos": el que se extrae por calor, formado por cuatro

fracciones leptospíricas que presentan diferente especificidad, o bien, otro que consta de una sola fracción extraída con etanol; este último muestra gran afinidad por anticuerpos de la clase IgM, mientras que el primero reacciona fundamentalmente con los IgG. Los títulos de IgM aparecen el décimo día, de moderados a elevados y aumentan progresivamente conforme transcurre la enfermedad; en cuanto a los IgG estos se encuentran en niveles relativamente bajos y sólo durante los dos primeros meses (74).

Por lo que se refiere a la técnica de RIA, ésta es muy similar a la de ELISA, con las variantes en el marcador, (radioisótopos) y en el sistema revelador (que en este caso consiste de un contador de centelleo líquido, seleccionado según la radiación emitida por el marcador). El valor numérico obtenido en cuentas por minuto (cpm) es directamente proporcional a los Ac's séricos del paciente (22,59,75).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tanto el RIA como las técnicas de ELISA muestran una sensibilidad del orden de nanogramos, lo cual las hace bastante sensibles (22).

iii. Otros datos de laboratorio

Así bien, los recuentos de glóbulos blancos pueden ser ligeramente elevados o bajos en la leptospirosis anictérica, los pacientes con ictericia experimentan una leucocitosis significativa de 15 a 30 mil por mm^3 , aunque pueden ocurrir grados más extremos. La neutrofilia es muy característica de la primera etapa de la enfermedad, la anemia no es propia de la entidad anictérica, pero puede ser grave en la enfermedad de Weil, y la trombocitopenia pocas veces alcanza significado clínico (57).

La ictericia es un signo presente aproximadamente en el 15 % de los pacientes y los niveles de bilirrubina son menores de 20 mg por

100 mL en dos tercios de los mismos, pero en el resto de ellos puede llegar a 40-60 mg por 100 mL. Los niveles de transaminasas y fosfatasa alcalina suelen ser elevados en los individuos con ictericia, aunque pocas ocasiones esos valores se incrementan a más del triple. En los pacientes anictéricos ambas enzimas tienden a encontrarse normales, como también sucede con el nitrógeno de urea en suero, exceptuando a un 25 % quienes manifiestan elevaciones de 20 a 60 mg por 100 mL, aún cuando la orina es normal. Asimismo, se han observado disminución de de linfocitos T en pacientes con daño renal. Con respecto a los pacientes con enfermedad de Weil, estos a menudo muestran azoemia y los valores séricos de nitrógeno de urea llegan a ser mayores de 100 mg por 100 mL principalmente cuando sufren de necrosis tubular aguda (3,10,85).

El análisis de orina frecuentemente revela proteinuria, cilindros y glóbulos rojos y blancos al inicio de la enfermedad, pero la orina se depura rápidamente excepto cuando el individuo padece de necrosis tubular aguda.

IV. CONCLUSIONES

- El género *Leptospira* presenta dos especies reconocidas formalmente: *L. biflexa* y *L. interrogans*; esta última es el agente etiológico de la leptospirosis, en particular, sus serogrupos *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*.
- Las leptospiras son microorganismos de lento crecimiento y de notable exigencia nutricional. Los medios empleados para su cultivo deben contener suero, sales de amonio, tiamina y ácidos grasos.
- La enfermedad presenta dos fases: en la primera se manifiesta una severa septicemia y, en la segunda, la leptospira se disemina y se establece en riñón, hígado y conjuntiva ocular, entre otros tejidos.

- El antibiótico de elección para el tratamiento de la leptospirosis es la penicilina administrada en dosis diarias de 2.4 millones de unidades.

- El diagnóstico de la leptospirosis se puede llevar a cabo mediante métodos directos e indirectos. Dentro de los primeros destaca la PCR revelada posteriormente por análisis basados en el empleo de enzimas de restricción, electroforesis y/o inmunotransferencia. Por lo que se refiere a los métodos indirectos, la prueba de aglutinación microscópica se considera el método estándar.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B. and Faine S.: Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections, *Infect Immun*, 1977;17: 67-72.
2. Bal A.E., Gravekamp C., Hartskeerl R.A., Meza-Brewster J., Korver H. and Terpstra W.J.: Detection of Leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis, *J Clin Microbiol*, 1994; 32: 1894-1898.
3. Banfi E., Cinco M., Bellini M. and Soranzo M.R.: The role of antibodies and serum complement in the interaction between Macrophages and Leptospire, *Journal of General Microbiology*, 1982; 128: 813-816.
4. Baseman J.B., Henneberry R.C. and Cox C.D.: Isolation and growth of *Leptospira* on artificial media, *J Bacteriol*, 1966; 91: 1374-1375.
5. Baseman J.B. and Cox C.D.: Intermediate energy metabolism of *Leptospira*, *J Bacteriol*, 1969; 97: 992-1000.
6. Bergström S., Garon C.F., Barbour A.G. and Mac Dougall J.: Extrachromosomal elements of spirochetes, *Res Microbiol*, 1992;143: 623-628.
6. Bergström S., Garon C.F., Barbour A.G. and Mac Dougall J.: Extrachromosomal elements of spirochetes, *Res Microbiol*, 1992; 143: 623-628.
7. Bradfield J.R.G. and Cater D.B.: Electron-microscopic evidence on the structure of spirochetes, *Nature*, 1952; 169: 944-946.

8. Brahmsha B. and Greenberg E.P.: A biochemical and cytological analysis of the complex periplasmic flagella from *Spirochaeta aurantia*, *Journal of Bacteriology*, 1988; 170: 4023-4032.
9. Bromley, D.B. and Charon N.W.: Axial filament involvement in the motility of *Leptospira interrogans*, *J Bacteriol*, 137; 1979: 1406-1412.
10. Chapman A.J., Everard C.O., Faine S. and Adler B.: Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados, *Epidemiol Infect*, 1991; 107: 143-155.
11. Cinco M., Perticarari S., Presani G., Dobrina A. and Liut F.: Biological activity of a peptidoglycan extracted from *Leptospira interrogans*: *in vitro* studies, *J Gen Microb*, 1993; 139: 2959-2964.
12. Corney B.G., Colley J., Djordjevic S.P., Whittington R. and Graham G.C.: Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprint, *J Clin Microbiol*, 1993; 31: 2927-2932.
13. Cox Charles D. and A.D. Larson.: Colonial Growth of *Leptospirae*, *J Bacteriol*, 1957; 73: 587-589.
14. Cox P.J. and Twigg G.I.: *Leptospira* motility, *Nature*, 1974; 250: 260-261.
15. De Brito T., Böhm G.M. and P.H. Yasuda.: Vascular damage in acute experimental leptospirosis of the guinea-pig, *J Pathol*, 1979; 128: 177-182.
16. Dikken H. and Kmety E.: Serological typing methods of leptospirosis. *Methods Microbiol*, 1978; 11: 259-293.
17. Faine S. and J. van der Hoeden: Virulence-linked colonial and morphological variation in *Leptospira*, *J Bacteriol*, 1964; 88: 1493-1496.

18. Finegold and Martin:
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO
Editorial Médica Panamericana, 6a ed.
Buenos Aires 1989.

19. Freeman Bob A.:
MICROBIOLOGÍA BURROWS
Editorial Interamericana
México, D.F., 1989

20. Freifelder D. and Malacinski G.:
ESSENTIALS OF MOLECULAR BIOLOGY
Sales and Customers Service Offices, 1st Edition
U.S.A. 1989.

21. Goldberg H.S. and Armstrong J.C.: Oxidase reaction with leptospiral colonies and its adaptation to antibiotic sensitivity testing, J Bacteriol, 1989; 171: 512-513.

22. Golub E. and Green D.:
IMMUNOLOGY A SYNTHESIS
Sinaver Associates Inc. Publishers, 2nd Edition.
U.S.A. 1991.

23. Gravekamp C., Van de Kemp H., Franzen M., Carrington D., Schoone G.J., Van Eys, C.O.R. Everard G.J.J.M., Hartskeerl R.A. and Terpstra W.J.: Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers, J Gen Microb, 1993;139: 1691-1700.

24. Gros F. and Grunberg M.:
BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS NUCLÉICOS
Instar Omega-Barcelona, 1a ed.
España 1976.

25. Haake D.A., Champion C.I., Martinich C., Shang E.S., Blanco D.R., Miller J.M., Lovett M.: Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer

membrane protein of pathogenic leptospira spp, J Bacteriol, 1993; 175: 4225-4234.

26.Haake D.A., Walker E.M., Blanco D.R., Bolin C.A., Miller J.N. and Lovett M.A.: Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar gripotyphosa during In vitro Cultivation, Infect Immun,1991; 59: 1131-1140.

27.Haapala D.K., Rogul M., Evans L.B. and Alexander A.D.: Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of *Leptospira*, J Bacteriol, 1969; 98: 421-428.

28.Harlow E. and Lane D.:
ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL
1st. Edition.
N.Y. 1988.

29.Herrman J.L., Baril C., Bellenger E., Perolat P., Baranton G. and Sant Girons I.: Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*, J Bacteriol, 1991; 173: 7582-7588.

30.Herrmann J.L., Bellenger E., Perolat P., Baranton G. and Saint Girons I.: Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification, J Clin Microbiol, 1992; 30:1696-1702.

31.Holt S.C.: Anatomy and chemistry of Spirochetes, Microbiol Rev, 1978; 42: 114-160.

32.Hookey J.V.: Characterization of *Leptospiraceae* by 16S DNA restriction fragment length polymorphisms, J Gen Microbiol, 1993;139: 1681-1689.

33.Hookey J.V., Bryden J. and Gatehouse L.: The use of 16S rRDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of *Leptospiraceae* and related spirochaetes, J Gen Microbiol, 1993;139: 2585-2590.

34. Johnson R.C. and Gary N.D.: Nutrition of *Leptospira pomona*. III calcium, magnesium and potassium requirements, J Bacteriol, 1963; 85:983-985.
35. Johnson R.C. and Gary N.D.: Nutrition of *Leptospira pomona*. II Fatty acid requirements, J Bacteriol, 1963; 85: 976-982.
36. Johnson R.C. and Gary N.D.: Nutrition of *Leptospira pomona*, J Bacteriol, 1962; 83: 668-672.
37. Johnson R.C. and Rogers P.: 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of *Leptospirae*, J Bacteriol, 1964; 87: 422-426.
38. Johnson R.C. and Rogers P.: Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azoguanine, J Bacteriol, 1964; 88:1618-1623.
39. Johnson R.C. and Virginia G. Harris: Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire, J Bacteriol, 1967; 94: 27-31.
40. Johnson R.C. and Wilson J.B.: Nutrition of *Leptospira pomona*, J Bacteriol, 1960; 80: 406-411.
41. Kaiser G.E. and Doetsch R.N.: Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments, Nature, 1975; 255: 656-657.
42. Kaufmann A.F. and Weyant R.S.: *Leptospiraceae*
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.
Murray P.R., Baron E.J., Faller M.A., Tenover F.C. and Tenover R.H.
American Society, 6th Edition
Washington, 1995.
43. Kondo E. and Nobuo : Composition of fatty acids and carbohydrates in *Leptospira*, J Bacteriol, 1972, 110: 459-467.
44. Kotani Shozo, Tsujimoto M., Koga T., Nagao S., Tanaka A. and Kawata S.: Chemical structure and biological activity relationship of

bacterial cell walls and muramyl peptides, *Federetion Proc*, 1986; 45: 2534-2540.

45. Larson A.D., Treick R.W., Edwards C.L. and Cox C.D.: Growth studies and plate counting of *Leptospira*, *J Bacteriol*, 1959; 77: 361-366.

46. LeFebvre R.B.: DNA probe of detection of the *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* genotype *hardjo-bovis*, *J Clin Microbiol*, 1987; 25: 2236-2238.

47. Livesley M.A., Thompson I.P., Bailey M.J., Nuttall P.A.: Comparison of de fatty acid profiles of *Borrelia*, *Serpulina* and *Leptospira* species, *J Gen Microbiol*, 1993; 139: 889-895.

48. McClelland R.D.M., Welsh J., Baranton G. and Perolat P.: *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by Mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes, *J Bacteriol*, 1993; 175: 973-981.

49. Merien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G. and Saint Girons I.: Polymerase Chain reaction for detection of *Leptospira sp.* in clinical samples, *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 2219-2224.

50. Miller, N.G. and Wilson R.B.: *In vivo* and *in vitro* observations of *Leptospira pomona* by electron microscopy, *J Bacteriol*, 1962; 84: 569-576.

51. Nauman R.K., Holt S.C. and Cox C.D.: Purification, ultrastructure and composition of axial filaments from *Leptospira*, *J Bacteriol*, 1969; 98: 264-280.

52. Nunes-Edwards P.L., Thiermann A.B., Bassford P.J. and Stamm L.V.: Identification and characterization of the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *Infect and Immun*, 1985; 48: 492-297.

53.Paster B.J., Canale-Parola E.C.: Involvement of periplasmic fibrils in motility of spirochetes, J Bacteriol, 1980; 141: 359-364.

54.Paster B.J., Dewhirst F.E., Weisburg W.G., Tordoff L.A., Fraser G.J., Hespell R.B., Stanton T.B., Zablen L., Mandelco L. and Woese C.R.: Phylogenetic analysis of the spirochete, J Bacteriol, 1991; 173: 6101-6109.

55.Rao P.J., Larson A.D. and Cox C.D.: Catalase activity in *Leptospira*, J Bacteriol, 1964; 88: 1045-1048.

56.Ray W., Grossman L. and Moldave K.:
RECOMBINANT DNA METHODOLOGY
Academic Press Inc., 1st. Edition
U.S.A. 1989.

57.Reinout van Crevel, Speelman P., Gravekamp C. and Terpstra W.J.: Leptospirosis in travelers, Clin Infect Dis, 1994; 19:132-134.

58.Ritchie A.E. and Ellinhausen H.C.:Electron microscopy of *Leptospira*, Journal of Bacteriology, 1965; 89: 223-233.

59. Roitt I.M.:
INMUNOLOGÍA
Salvat, 3a ed.
España 1993.

60.Schneider W.R. and Doetsch R.N.: Effect of viscosity on bacterial motility, J Bacteriol, 1974; 117: 696-701.

61.Segers R.P., J.A. van Gestel, G.J. van Evs, B.A.M. van der Zeijst and Gaastra W.: Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family *Leptospiraceae*, Infect Imm, 1992; 60:1707-1710.

62.Shenberg E.: Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media, J Bacteriol, 1967; 93: 1598-1606.

63. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.
MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY,
Williams and Wilkins, 1st. Edition
Baltimore, 1984.
64. Silva Damas O.T., Dias E., Cota M., Romanha A.J. and
Simpson A.J.G.: Low-stringency PCR with diagnostically useful
primers for identification of *Leptospira* serovars, J Clin Microbiol,
1994; 32: 1369-1372.
65. Stalheim O.H.V.: Leptospiral selection, growth and virulence in
synthetic medium, J Bacteriol, 1966; 92: 946-951.
66. Stalheim O.H.V.: Biological effects of leptospiral lipids, J
Bacteriol, 1968; 95:465-468.
67. Stalheim O.H.V. and Wilson J.B.: Cultivation of Leptospirae. II
Growth and lysis in synthetic medium, J Bacteriol, 1964; 88: 55-59.
68. Stalheim O.H.V. and Wilson J.B.: Leptospiral colonial
morphology, J Bacteriol, 1963; 86: 482-489.
69. Stalheim O.H.V. and Wilson J.B.: Cultivation of *Leptospirae*, J
Bacteriol, 1964; 88: 48-54.
70. Starr M., Stolp H. Trüper H. and Balows A.:
THE PROKARYOTES
Springer-Verlag, 1st. Edition.
N.Y. 1981.
71. Stern N., Shenberg E. and Tietz A.: Studies on the metabolism
of fatty acids in *Leptospira*: The biosynthesis of A⁹- and A⁹-
monounsaturated acids, European J Biochem, 1969; 8: 101-108.
72. Sun-Ho Kee, Ik-Sang Kim, Myung-Sik Choi, and Woo-Hyun
Chang.: Detection of leptospiral DNA by PCR, J Clin Microbiol,
1994; 32: 1035-1039.

73. Taylor K.A., Barbour A.G. and Thomas D.D.: Pulsed-field gel electrophoretic analysis of leptospiral DNA, *Infect Imm*, 1991; 59: 323-329.

74. Terpstra W.J., Ligthart G.S. and Schoone G.J.: ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis, *J Gen Microbiol*, 1985; 131: 377-385.

75. Tizard I.R.:
IMMUNOLOGY AN INTRODUCTION
Saunders, 3rd Edition.
USA 1984.

76. Tortora G.J., Funke B.R. and Case L.C.:
MICROBIOLOGY AN INTRODUCTION
Benjamin-Cummings Publishing, 4th Edition.
USA 1991.

77. Trueba G.A., Bolin C.A. and Zuerner R.L.: Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*, *J Bacteriol*, 1992; 174: 4761-4768.

78. Turk D.C. and Porter I.A.:
A SHORT TEXTBOOK OF MEDICAL MICROBIOLOGY
Year Book Medical Publishers Inc., 3a ed.
Chicago, 1973.

79. Umemoto Toshio, Ota T., Sawaga H., Kato K., Takada H., Tsujimoto M., Kawasaki A., Ogawa T., Harada K. and Kotani S.: Chemical and biological properties of a peptidoglycan isolated from *Treponema pallidum* kasan, *Infect Imm*, 1981; 31: 767-774.

80. Vinh T., Adler B. and Faine S.: Glycolipoprotein cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*, *J Gen Microbiol*, 1986; 132: 111-123.

81. Vinh T., Adler B. and Faine S.: Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira*

interrogans serovar *copenhageni*, Journal of General Microbiology, 1986; 132: 103-109.

82. Vogel H. and Hutner S.H.: Growth of *Leptospira* in defined media, J Gen Microbiol, 1961; 26: 223-230.

83. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J.: 16S Ribosomal DNA amplification for hptlogenetic study, J Bacteriol, 1991; 173: 697-703.

84. Weiss M.S., Abele U., Weckesser J., Welte W., Schiltz E. and Schulz E.: Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin, Science, 1991; 254: 1627-1630.

85. Yamashiro-Kanashiro E.H., Bernard G., Sato M.N., Seguro A.C. and Duarte A.J.: Cellular immune response analysis of patients with leptospirosis, Am J Med Hyg, 1991; 45:138-145.

86. Yanagawa R. and Faine S.: Morphological and serological analysis of leptospiral structure, Nature, 1966; 211: 823-826.

87. Yanagawa R., Hiramune T. and Akaike Y.: Growth of saprophytic and pathogenic *Leptospirae* on solid medium in carbon dioxide-free air, J Bacteriol, 1963; 85: 953-954.

88. Zuerner R.L., Ellis W.A., Bolin C.A. and Montgomery J.M.: Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersneri* serovar *hardjo* tipo *hardjo-bovis* isolates from different geographical locations, J Clin Microbiol, 1993; 31: 578-583.