



MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Organismo Público Descentralizado de Sector Salud

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BACTERIOLÓGICO Y SEROLÓGICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS

**Serie de Normas
Técnicas N° 34**



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
BACTERIOLÓGICO Y SEROLÓGICO
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
LEPTOSPIROSIS**

**Serie de Normas
Técnicas N° 34**

MINISTERIO DE SALUD

Ministro
Dr. Fernando Carbone Campoverde

Vice-Ministro
Dr. Oscar Ugarte Ubillúz

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Jefe
Dr. Luis Fernando Llanos Zavalaga

Sub-Jefe
Dra. Ada Cecilia Palacios Ramírez

Centro Nacional de Salud Pública

Dra. Susana Zurita Macalupú
Directora General

**Centro Nacional de Alimentación
y Nutrición**

Dra. Napoleón Chávez Villanueva
Director General

Centro Nacional de Control de Calidad

Dra. Rosa Guevara Ormeño
Directora General

Centro Nacional de Producción de Biológicos

O.F. Ricardo Valera Sánchez
Director General

Sub-Comité Editor

Presidente
Dra. Aida Palacios Ramírez

Secretario Técnico
Dr. César Cabezas Sánchez

Miembros
Dr. Jorge Alarcón Villaverde
Q.F. Zulema Arévalo Chong
Dr. Jorge Barnaby Rodríguez
Dr. Zuño Burstein Alva
Lic. Iván Gómez-Sánchez Prieto
Dra. Ivonne Guerrero Alva
Dr. Alfredo Guillén Oneeglio
Dr. César Náquira Velarde
Dr. Enrique Pérez Ramos
Lic. Margarita Rodríguez Gutarra
Dr. Víctor Suárez Moreno

Editor
Dr. Leonid Lecca García

Revisor

Dra. Sonia Macedo Aguirre

Portada: Frontis del local central de Instituto Nacional de Salud

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BACTERIOLOGICO Y SEROLÓGICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS

ELABORACIÓN:

Manuel Céspedes Zambrano

Biólogo

Laboratorio de BTS y Leptospiras

Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública

Instituto Nacional de Salud

Martha Glenny Araujo

Biólogo

Laboratorio de BTS y Leptospiras

Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública

Instituto Nacional de Salud

Catalogación hecha por el Centro de Documentación del INS

Céspedes Zambrano, Manuel

Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis / Elaborado por Manuel Céspedes Zambrano y Martha Glenny Araujo. -- Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.

53 p. : 30 cm. -- (Serie de Normas Técnicas; 34)

1. LEPTOSPIROSIS /diagnóstico 2. TESTS SEROLOGICOS/normas

I. Céspedes Zambrano, Manuel

II. Glenny Araujo, Martha

III. Instituto Nacional de Salud (Perú)

IV. Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 857 -26 -3 (O.C.)

ISSN 9972 - 857 - 25 5 (N° 34)

ISSN 1607 - 4904

Hecho el Depósito Legal N° 1501012002-3185

© Ministerio de Salud, 2002

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Te1f.: 431-0410

© Instituto Nacional de Salud, 2002

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Te1f.: 471-9920 Fax 471-0179

e-mail: postmaster@ins.sld.pe

Página Web: www.ins.sld.p

Publicación aprobada con R.J. N° 250-J-OPD/INS

Se autoriza su reproducción total o parcial siempre y cuando se cite la fuente.

CONTENIDO

INTRODUCCION	IV
SECCION 1: GENERALIDADES	1
1.1 Objetivo	1
1.2 Campo de aplicación	1
1.3 Responsabilidades	1
1.4 Documentos de referencia	1
1.5 Definiciones y abreviaturas	2
1.6 Condiciones generales para la obtencion y manejo de muestra	4
SECCION 2: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	5
SECCION 3: OBTENCION DE LA MUESTRA	6
3.1 Obtencion de muestra de sangre para cultivo	6
3.2 Obtencion de muestra de liquido cefaloraquideo para cultivo	8
3.3 Obtencion de muestra de orina para cultivo	9
3.4 Obtencion de muestra de suero	11
3.5 Obtencion de muestras de tejido para cultivo	12
SECCION 4: ENVIO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA	13
4.1 Objetivo	13
4.2 Condiciones generales	13
4.3 Procedimiento	13
4.4 Criterios para rechazar una muestra	13
SECCION 5: PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DE LEPTOSPIRAS	14
5.1 Siembra de muestra de sangre	14
5.2 Siembra de muestra de liquido cefaloraquideo	16
5.3 Siembra de muestra de orina	17
5.4 Siembra de muestra de organos	19
5.5 Examen directo de leptospiaras	20
5.6 Examen directo de leptospiaras con coloración rojo de congo	23
SECCION 6: PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE LA LEPTOSPIROSIS	25
6.1 Diagnostico mediante la prueba de macroaglutinacion	25
6.2 Diagnostico mediante la prueba de Elisa indirecto IgM	27
6.3 Diagnostico mediante la prueba de Elisa indirecto IgG	31
6.4 Diagnostico mediante la prueba de microaglutinacion (MAT)	33
SECCION 7: IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS	40
7.1 Identificacion de leptospiaras patógenas	40
7.2 Serotipificaion de leptospiaras patógenas	42
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXO A: CINÉTICA DE LA LEPTOSPIROSIS	47
ANEXO B: ESQUEMA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS	48
ANEXO C: MEDIOS DE CULTIVO	49
ANEXO D: COLORACIONES	52

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial y forma parte del grupo de enfermedades zoonóticas. El hombre es un huésped accidental que se infecta directamente con orina, tejidos, semen y secreciones vaginales de animales infectados, e indirectamente con el agua de lagunas, acequias, ríos, charcos y otros, con suelo húmedo y vegetación contaminada con orina infectada. Los huéspedes reservorios son los animales silvestres y domésticos, los que eliminan las leptospiras con la orina por periodos de tiempos variables, dependiendo de la especie animal. La leptospirosis puede ser causada por cualquiera de los más de 250 serovares de las especies *Leptospira alexanderi*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira meyeri*, *Leptospira noguchi*, *Leptospira santarosai* y *Leptospira weilii*.

Desde 1947, en el Instituto Nacional de Salud, se iniciaron estudios epidemiológicos de Leptospirosis en ratas de los desagües, gatos, perros y cerdos sacrificados en el camal del Callao, y en el personal del Mercado Central de Lima. A partir de 1962, se intensificaron estos trabajos, principalmente fuera de Lima, efectuándose estudios en Tumbes, Ancash, Cajamarca, Arequipa, Amazonas, San Martín, Huánuco, Ayacucho, Loreto y Madre de Dios concluyendo que ésta era una enfermedad ocupacional de presentación esporádica producida principalmente por leptospiras del serogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Se aislaron numerosas cepas de Leptospiras, tanto del hombre como de animales domésticos y silvestres, algunos de los cuales fueron nuevos serovares.

En 1997, el INS reportó 11 casos positivos; en 1998, debido a la presencia del fenómeno del Niño, 98 casos; en 1999, 93 casos; en el 2000, 101 positivos; y en el 2001, 113 casos; siendo todos diagnosticados por métodos serológicos.

El clima húmedo, subtropical y tropical de muchas regiones, la falta de reconocimiento de la enfermedad por el personal de salud, las condiciones socio-económicas de gran parte de la población especialmente rural, el insuficiente número de laboratorios regionales de diagnóstico, la existencia de otras enfermedades con características clínicas similares y la carencia de programas de vacunación obligatoria de animales domésticos susceptibles, contribuyen a la ocurrencia de Leptospirosis en nuestro país.

En este contexto, el INS en su rol de Centro de Referencia Nacional, ha aprobado el «MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BACTERIOLÓGICO Y SEROLÓGICO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA LEPTOSPIROSIS», cuyo objetivo es establecer y estandarizar estos procedimientos diagnósticos en los establecimientos de salud que desarrollan actividades vinculadas a su manejo y control de la leptospirosis humana. ponemos a disposición del personal de salud del país este manual, resultado del esfuerzo de los profesionales del Laboratorio de Leptospirosis y Bacterias de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Salud.

SECCIÓN 1

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer los procedimientos para realizar el diagnóstico serológico y bacteriológico de la leptospirosis.

1.2 CAMPO DE APLICACIÓN

Comprende:

- 1.2.1 Obtención de muestras de los pacientes
- 1.2.2 Envío de muestras al laboratorio
- 1.2.3 Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico serológico de la leptospirosis
- 1.2.4 Procedimientos de laboratorio para el aislamiento e identificación de leptospiras
- 1.2.5 Control de calidad del diagnóstico serológico de la leptospirosis

1.3 RESPONSABILIDADES

- 1.3.1 El Centro Nacional de Salud Pública (CNSP) a través de su Dirección Ejecutiva de Laboratorios de Referencia (DELARE), es responsable de autorizar la elaboración, revisión y actualización del presente manual, de acuerdo a los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud (INS).
- 1.3.2 Los directores de los establecimientos de salud son responsables de autorizar, proporcionar los recursos necesarios y designar al personal responsable para la aplicación de las disposiciones contenidas en el presente manual.
- 1.3.3 El personal de los establecimientos de salud, es responsable de planificar las acciones, organizar, controlar y capacitarse para cumplir las disposiciones contenidas en el presente Manual.
- 1.3.4 Los jefes o responsables de los laboratorios deben asegurar el control de calidad interno, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.
- 1.3.5 El personal médico, técnico y operativo son responsables de seguir las especificaciones contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos específicos indicados.

1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- 1.4.1 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras" (I). Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 15.
- 1.4.2 **Instituto Nacional de Salud.** Manual de Normas de Bioseguridad. Segunda Edición, Lima: INS; 1998. Serie de Normas Técnicas N°18.

1.5 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- 1.5.1 **aeróbico:** Organismo que metaboliza solamente en presencia de oxígeno molecular.
- 1.5.2 **agente infeccioso:** Microorganismo (virus, rickettsia, bacteria, hongo, protozooario o helminto) capaz de producir una infección.
- 1.5.3 **aglutinación:** Reacción por la que se provoca la agrupación de partículas, bacterias y células suspendidas en un medio líquido.
- 1.5.4 **aislamiento:** Aplicado a los enfermos, es la separación de personas o animales infectados, durante el período de transmisibilidad de la enfermedad, en lugares y condiciones tales que eviten o limiten la transmisión directa o indirecta del agente infeccioso a personas susceptibles de infectarse.
- 1.5.5 **aislamiento primario:** Desarrollo inicial de microorganismos a partir de una muestra clínica.
- 1.5.6 **antimicrobiano:** Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de microorganismos.
- 1.5.7 **bacteria:** Microorganismo unicelular microscópico perteneciente a los procariotes que se multiplica por fisión binaria y carece de clorofila. Se diferencian por la coloración de Gram.
- 1.5.8 **bioseguridad:** Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánicos.
- 1.5.9 **cepa bacteriana:** Cultivo puro de bacterias formada por los descendientes de un solo aislamiento.
- 1.5.10 **chorro medio de orina:** Muestra de orina obtenida después que el paciente deja discurrir cierta cantidad inicial y luego realiza la colecta en un recipiente.
- 1.5.11 **contacto:** Cualquier persona o animal cuya asociación con una persona o animal infectado o con un ambiente contaminado haya creado la posibilidad de contraer la infección.
- 1.5.12 **contaminación:** Presencia de un agente infeccioso en la superficie del cuerpo, vestimenta, ropa de cama, juguetes, instrumentos quirúrgicos, apósitos u otros objetos inanimados o sustancias, inclusive el agua y los alimentos.
- 1.5.13 **desinfección:** Eliminación de agentes infecciosos que están fuera del cuerpo por medio de la exposición directa a agentes químicos o físicos. La desinfección de alto grado puede destruir todos los microorganismos, con excepción de un número importante de esporas bacterianas, para lo cual se necesita una exposición más extensa que asegure su destrucción.
- 1.5.14 **desinfectante:** Agente químico utilizado para el proceso de desinfección.
- 1.5.15 **ELISA:** Prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzima que se usa para detectar antígenos o anticuerpos.
- 1.5.16 **endemia:** Presencia continua de una enfermedad o un agente infeccioso en una zona geográfica determinada. También puede denotar la prevalencia usual de una enfermedad particular en dicha zona.
- 1.5.17 **enfermedad infecciosa:** Enfermedad clínicamente manifiesta del hombre o de los animales resultado de una infección.

- 1.5.18 **enfermedad transmisible:** Cualquier enfermedad causada por un agente infeccioso específico o sus productos tóxicos, que se manifiesta por la transmisión del mismo agente o sus productos, de una persona o animal infectados o de un reservorio inanimado a un huésped susceptible, de forma directa o indirecta por medio de un huésped intermediario.
- 1.5.19 **establecimiento de salud:** Hospital, clínica, centro de salud o lugar debidamente autorizado y equipado para la atención de pacientes.
- 1.5.20 **esterilización:** Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana, incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.
- 1.5.21 **fuelle de infección:** Persona, animal, objeto o sustancia de la cual el agente infeccioso pasa a un huésped.
- 1.5.22 **infección:** Penetración y desarrollo (de múltiples parásitos) o multiplicación de un agente infeccioso en el organismo de personas o animales.
- 1.5.23 **inmunitad:** Estado de resistencia que suele provenir de la presencia de anticuerpos o células que poseen una acción específica contra el microorganismo causante de una enfermedad infecciosa o contra su toxina.
- 1.5.24 **inóculo:** Alicuota de una muestra que es transferida a un medio de cultivo
- 1.5.25 **limpieza:** Es la remoción mecánica de toda materia extraña con el objetivo de disminuir el número de microorganismos. Se realiza a través de arrastre mecánico; sin embargo, no se asegura la eliminación de éstos.
- 1.5.26 **medio de cultivo:** Medio artificial de sustancias nutritivas que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesario para el crecimiento y multiplicación de las bacterias *in vitro*.
- 1.5.27 **notificación de una enfermedad:** Comunicación oficial a la autoridad correspondiente de la existencia de una enfermedad transmisible o de otra naturaleza en humanos o animales.
- 1.5.28 **patogenicidad:** Característica de un agente infeccioso que rige la extensión o magnitud con la cual se manifiesta una enfermedad en una población infectada o la capacidad del microorganismo para producir enfermedad.
- 1.5.29 **período de incubación:** Intervalo que transcurre entre la exposición inicial a un agente infeccioso y la aparición de síntomas de la enfermedad. En el caso de un vector, es el lapso que media entre el momento en que un microorganismo penetra en el vector y la fecha en que dicho vector transmite la infección (período de incubación extrínseco).
- 1.5.30 **portador:** Persona o animal infectado que alberga un agente infeccioso específico de una enfermedad, sin presentar signos o síntomas clínicos y que constituye una fuente potencial de infección.
- 1.5.31 **reconstituir:** Restablecer la forma original de una sustancia previamente alterada para su conservación y almacenamiento, mediante la combinación con un líquido adecuado.
- 1.5.32 **registro:** Documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.

- 1.5.33 **reservorio (de agentes infecciosos):** Cualquier ser humano, animal, artrópodo, planta, suelo o materia (o una combinación de éstos), donde normalmente vive y se multiplica un agente infeccioso, del cual depende para su supervivencia, y donde se reproduce de manera que pueda ser transmitido a un huésped susceptible
- 1.5.34 **siembra primaria:** Inoculación de una muestra a un medio de cultivo simple, selectivo o de enriquecimiento.
- 1.5.35 **sospechoso:** Con respecto al control de las enfermedades infecciosas, persona cuya historia clínica y síntomas sugieren que podría tener o estar desarrollando una enfermedad transmisible.
- 1.5.36 **susceptible:** Cualquier persona o animal que supuestamente no posee suficiente resistencia contra un agente patógeno determinado que lo proteja contra la enfermedad.
- 1.5.37 **tasa de prevalencia:** Número total de personas enfermas o que presentan cierto trastorno en una población específica y en determinado momento (prevalencia puntual), o durante un período predefinido (prevalencia de período), independientemente de la fecha en que comenzó la enfermedad o el trastorno, dividido entre la población en riesgo de presentar la enfermedad o el cuadro patológico en un punto en el tiempo (o en un punto que está a la mitad del período en que aparecieron).
- 1.5.38 **transmisión de agentes infecciosos:** Cualquier mecanismo por virtud del cual un agente infeccioso se propaga de una fuente o un reservorio a una persona.
- 1.5.39 **virulencia:** Grado de patogenicidad de un agente infeccioso, indicado por las tasas de letalidad o por su capacidad para invadir y lesionar los tejidos del huésped o por ambos parámetros.
- 1.5.40 **Zoonosis:** Infección transmisible en condiciones naturales de los animales vertebrados a los humanos. Puede ser enzoótica o epizootica.
- 1.6 CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA**
- 1.6.1 Informar al paciente en forma clara y sencilla, de acuerdo a su grado de instrucción, sobre los procedimientos a realizar.
- 1.6.2 Obtener la muestra empleando la técnica apropiada y teniendo en cuenta el período de la enfermedad y el lugar correcto de muestreo, evitando su contaminación.
- 1.6.3 Obtener suficiente cantidad de muestra para asegurar el aislamiento de la bacteria.
- 1.6.4 Obtener la muestra antes del inicio de la terapia antibacteriana. Si el paciente ya hubiera recibido alguna dosis del antibacteriano, el laboratorio debe ser informado al respecto.
- 1.6.5 Para prevenir riesgos, colocar las muestras en un recipiente secundario apropiado para su transporte al laboratorio.
- 1.6.6 Enviar las muestras al laboratorio para su procesamiento inmediatamente después de haber sido obtenidas.

SECCIÓN 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- 2.1 El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico serológico y bacteriológico de la leptospirosis debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad (Serie Normas Técnicas N°18), editado por el Instituto Nacional de Salud.
- 2.2 Se deben controlar las medidas necesarias aplicables a:
 - 2.2.1 El personal
 - 2.2.2 La vestimenta
 - 2.2.3 Los ambientes
 - 2.2.4 La obtención de muestras
 - 2.2.5 El envío de muestras al laboratorio
 - 2.2.6 Los casos de accidentes
 - 2.2.7 El laboratorio

SECCIÓN 3

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El éxito de los resultados de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de leptospirosis depende en gran medida del cuidado que se ponga en la obtención, transporte y conservación de las muestras. Estos procedimientos son de mucha importancia para que el laboratorio contribuya eficientemente en el diagnóstico bacteriológico y serológico de la enfermedad (Anexos A y B).

3.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO

3.1.1 Objetivo

Señalar las recomendaciones y procedimientos para la obtención de muestras de sangre para el diagnóstico de leptospirosis.

3.1.2 Condiciones específicas

3.1.2.1 Para obtener una muestra adecuada es necesario conocer la dinámica de la enfermedad. En la evolución clínica de la leptospirosis se reconocen dos fases: la primera, corresponde a la fase "leptospirémica" o "septicémica" caracterizada por síntomas clínicos variables, que en promedio dura entre 4 a 7 días. Después de un lapso de quietud de 1 a 3 días, se inicia la segunda fase "inmune", con signos o síntomas diversos o se presenta como asintomática. Durante esta fase las leptospiras pueden excretarse transitoriamente con la orina en los humanos, aunque el hombre no constituye un reservorio.

3.1.2.2 La muestra para el hemocultivo debe obtenerse durante el periodo febril agudo de la fase septicémica (entre el primer y séptimo día), antes del inicio de la terapia antibiótica.

3.1.3 Obtención de la muestra de sangre mediante uso de tubo al vacío o jeringa

3.1.3.1 Procedimiento:

- a. Identificar el tubo al vacío con el nombre completo o código del paciente de quien se obtendrá la muestra de sangre.
- b. Utilizar un tubo al vacío con anticoagulante: EDTA, heparina u oxalato de sodio. No usar citrato de sodio por su acción inhibitoria de desarrollo de algunos serovares de leptospiras.
- c. Extraer 5 mL de sangre venosa y mantener a temperatura ambiente.
- d. Remitir la muestra inmediatamente al laboratorio. De no ser posible, se puede mantener la misma por un periodo máximo de 5 días a temperatura ambiente, aunque no es recomendable (Ver Tabla N° 1).

NOTA: El proceso de transporte de la muestra de sangre con anticoagulante para el aislamiento de la bacteria no se refrigera, se mantiene a temperatura ambiente.

Tabla N° 1. Condiciones de toma y envío de muestra para el diagnóstico bacteriológico y serológico de la leptospirosis

TIPO DE MUESTRA	PERÍODO DE TOMA	CANTIDAD	CONDICIÓN
SEROLOGIA Suero agudo	4 a 10 días del inicio de los síntomas	3mL	Estéril. Enviar congelado o a 4°C
Suero convalescente	7 a 30 días después de la primera toma	3mL	Igual al suero agudo
AISLAMIENTO Sangre completa	Entre el 1 ^{er} al 7 ^{mo} día (período agudo febril de la fase septicémica).	5mL	Estéril con anticoagulante EDTA. Heparina 2 gotas u oxalato de sodio 0,5 mL de una solución a 1% a temperatura ambiente. No usar citrato*
Líquido cefaloraquídeo	5 a 10 días desde el inicio de los síntomas.	0,5 - 1 mL	Estéril, enviar a temperatura ambiente dentro de los 4 días de su obtención.
Orina	14 -28 después del inicio de la enfermedad	50 mL	Estéril, enviar a temperatura ambiente, dentro de las 2 horas de su obtención.
EN CASO DE FALLECIMIENTO Tejido (riñón, hígado, médula, hueso largo y globo ocular)	Al practicar la necropsia	± 2 mL	Estéril, enviar a 4°C en recipientes estériles y bien cerrados en un plazo máximo de 6 horas. Para estudios histopatológicos, enviar 2 mL de cada tejido en 5 mL de formol al 10%.

* Enviar inmediatamente al laboratorio. De no ser posible, remitir máximo dentro de los 5 días siguientes.

3.1.4 Obtención de la muestra de sangre venosa para cultivo directo (en pacientes hospitalizados)

3.1.4.1 Consideraciones específicas

- a. Tomar la muestra durante el período agudo febril (1^{er} - 7^{mo} día de iniciada la enfermedad) de la fase leptospirémica.
- b. Solicitar al laboratorio de referencia 4-5 tubos con medio de cultivo los que se mantendrán a temperatura ambiente por ± 30 minutos antes de la toma de muestra.
- c. Realizar el hemocultivo al lado de la cama del paciente

3.1.4.2 Procedimiento

- a. Obtener 2-3 mL de sangre venosa con una jeringa de 5 mL (sin anticoagulante).
- b. Con ayuda de un mechero de alcohol, flamear la boca de los tubos con medio de cultivo.
- c. Inocular 1 gota (aproximadamente 50 µL) en el primer tubo, 2 gotas en el segundo y 3 gotas en el tercer y cuarto tubo.

- d. Cerrar las tapas herméticamente y mezclar inclinando los tubos y rotándolos sin agitar.
- e. Identificar y remitir inmediatamente al laboratorio en posición vertical.

3.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE LÍQUIDO CEFALORAQUÍDEO PARA CULTIVO

3.2.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestras de líquido cefaloraquídeo (LCR) para el diagnóstico de leptospirosis.

3.2.2 Condiciones específicas

- 3.2.2.1 El conocimiento de la patogénesis de la enfermedad es importante en la selección de la muestra clínica apropiada en cada fase de la enfermedad. En pacientes con compromiso meníngeo se puede observar y aislar leptospiras de LCR entre los 4 a 10 días después de iniciada la enfermedad.
- 3.2.2.2 El LCR es de fácil contaminación bacteriana, por ello debe procesarse inmediatamente, como máximo a los 4 días de tomada la muestra.
- 3.2.2.3 No congelar ni refrigerar la muestra.
- 3.2.2.4 La obtención de la muestra la debe realizar el médico de acuerdo a los procedimientos normativos de su institución.

3.2.3 Materiales

- 3.2.3.1 Algodón
- 3.2.3.2 Gasa estéril
- 3.2.3.3 Tubo o frasco con tapa rosca estéril
- 3.2.3.4 Guantes de látex estériles
- 3.2.3.5 Jeringas estériles de 5 mL

3.2.4 Procedimiento

- 3.2.4.1 Limpiar la piel con alcohol 70% alrededor de la punción en la columna lumbar.
- 3.2.4.2 Poner al paciente en posición fetal y realizar la punción lumbar con una aguja N° 20 especial y extraer aproximadamente 5 mL de LCR en forma aséptica.
- 3.2.4.3 Con un mechero Bunsen, flamear la tapa del frasco o tubo y luego trasvar el LCR de la jeringa.
- 3.2.4.4 Rotular y transportar la muestra inmediatamente al laboratorio.

3.2.4.5 En el caso de no poder enviarse inmediatamente, mantener la muestra a temperatura ambiente hasta por un período máximo de 4 días.

3.2.4.6 Registrar el procedimiento.

3.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE ORINA PARA CULTIVO

3.3.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestras de orina para el diagnóstico bacteriológico de leptospirosis.

3.3.2 Condiciones específicas

3.3.2.1 La leptospiuria es debido a la colonización de los túbulos renales y se presenta a partir de los 14 a 28 días después de la infección. En pacientes con dieta alcalina y tratados con antibióticos este estado es limitado.

3.3.2.2 Tomar las muestras de orina asépticamente, por colección del chorro medio o catéter (en pacientes hospitalizados).

3.3.2.3 Para la alcalinización de la orina, el paciente debe beber la noche anterior un vaso de agua con una cucharadita de ± 1 g de bicarbonato de sodio. Una alternativa es tomar una pastilla de acetazolamida en el desayuno del día anterior a la toma de muestra.

3.3.2.4 La orina es un líquido biológico donde proliferan muy fácilmente las bacterias contaminantes, por lo cual la muestra debe ser procesada dentro de las 2 horas después de haber sido obtenida. Es necesario protegerla de la luz y mantenerla a temperatura ambiente. Se puede refrigerar a 4°C hasta su procesamiento, (máximo hasta 6 horas) pero no es lo adecuado.

3.3.3 Obtención de la muestra de orina del chorro medio

3.3.3.1 Obtención de muestras de orina en mujeres

a. Materiales:

- Guantes de látex estériles
- Cinco o más piezas de gasa estéril de tamaño adecuado, pudiendo ser de 4" x 4".
- Jabón
- Agua tibia estéril
- Frasco estéril de boca ancha con tapa de rosca

b. Procedimiento:

- Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha y hora de obtención de la muestra.
- Lavarse las manos con jabón y abundante agua.
- Preparar una pieza de gasa para la limpieza de los genitales externos humedeciéndola con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- Separar los labios mayores con dos dedos de una mano y limpiar el área expuesta pasando de adelante hacia atrás.
- Descartar la gasa
- Con otra gasa humedecida, enjuagar el área de adelante hacia atrás. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- Finalmente secar el área de adelante hacia atrás con un trozo de gasa seca
- Mantener separados los labios mayores mientras la paciente empieza a orinar. Luego del chorro inicial, colocar el frasco estéril para coleccionar el chorro medio.
- Al terminar de orinar, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.
- Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio.

3.3.3.2 *Obtención de muestra de orina en varones*

a. Materiales

- Guantes de látex
- Cinco o más piezas de gasa estéril
- Jabón
- Agua tibia estéril
- Frasco estéril de boca ancha

b. Procedimiento

- Rotular el frasco con el nombre del paciente, fecha y hora de obtención de la muestra y el procedimiento a utilizar para su obtención.
- Lavarse las manos con jabón y abundante agua.

- Preparar una pieza de gasa con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- Realizar la higiene de los genitales, retraer el prepucio antes de lavar el glande con la gasa humedecida con jabón y descartar la gasa.
- Enjuagar el glande, usando una gasa húmeda. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- Secar la zona, usando uno o más piezas de gasa seca.
- Indicar al paciente que mantenga el prepucio retirado e inicie la micción directamente en un recipiente (orina para descartar).
- Después del chorro inicial, colocar el frasco estéril para colectar la muestra del chorro medio.
- Obtenida la muestra, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.
- Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio.

3.4 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO

3.4.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestra de suero para el diagnóstico serológico de leptospirosis.

3.4.2 Condiciones específicas

3.4.2.1 Para obtener de una muestra adecuada es necesario conocer la dinámica de enfermedad (ver ítem 3.1.2.1).

3.4.2.2 Para un diagnóstico acertado de leptospirosis, obligatoriamente se requiere de dos muestras pareadas: una en la fase leptospirémica donde los niveles de anticuerpos son muy bajos, y otra en la fase inmune donde los títulos de anticuerpos son más altos. En una infección por leptospirosis entre la primera y segunda muestra debe haber un incremento del título de anticuerpos de 2 a 4 veces.

3.4.2.3 La toma de la primera muestra se hará en la fase aguda o leptospirémica, 4 a 10 días de iniciado los síntomas y la segunda muestra obligatoriamente en la fase convaleciente o inmune, a los 7-30 días posterior a la primera muestra. Mantener en cadena de frío.

3.4.3 Obtención de la muestra de suero

3.4.3.1 Procedimiento

- a. Identificar los viales con el nombre completo o código del paciente.
- b. Utilizando un tubo al vacío o una jeringa, extraer 5 mL de sangre venosa sin anticoagulante.

- c. Colocar la muestra en un tubo estéril y dejarlo reposar en plano inclinado por 30 minutos, luego centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
- d. Utilizando una pipeta Pasteur estéril, separar el suero y colocar por alícuotas en crioviales, cuidando de no incluir hemáties.
- e. Conservar en una refrigeradora o en un congelador de -20°C hasta su transporte al laboratorio donde será procesado.

3.5 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE TEJIDO PARA CULTIVO

3.5.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestra de tejido hepático, cerebral y renal para el diagnóstico bacteriológico de leptospirosis.

3.5.2 Condiciones Específicas

- 3.5.21 Realizar la toma de la muestra de órganos (riñón, hígado y cerebro) en pacientes fallecidos con sospecha de leptospirosis.
- 3.5.2.2 Los órganos, son un excelente medio de cultivo para la proliferación bacteriana. Por ello, la muestra debe ser procesada dentro de las 4 horas de su obtención, manteniéndola protegida de la luz y a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C-8°C (máximo 6 horas) hasta su procesamiento.

3.5.3 Materiales

- 3.5.3.1 Guantes de látex
- 3.5.3.2 Cinco o más piezas de gasa estéril
- 3.5.3.3 Jabón
- 3.5.3.4 Agua tibia estéril
- 3.5.3.5 Frasco estéril de boca ancha

3.5.4 Procedimiento

- 3.5.4.1 Rotular el frasco con el nombre del paciente y la fecha de obtención de la muestra
- 3.5.4.2 Una vez realizada la autopsia en forma estéril, cortar con un bisturí una pequeña porción de hígado, cerebro y riñón y traspasarlo en un frasco de boca ancha
- 3.5.4.3 Obtenida la muestra, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo
- 3.5.4.4 Transportar el frasco con la muestra hacia el laboratorio

SECCIÓN 4

ENVÍO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

4.1 OBJETIVO

Describir los procedimientos y condiciones para la conservación y transporte de las muestras al laboratorio.

4.2 CONDICIONES ESPECÍFICAS

Las muestras deben ser mantenidas y conservadas con sus características lo más cercanas a su estado originario, debiendo evitarse temperaturas extremas, pH extremos o desecamientos excesivos.

4.3 PROCEDIMIENTO

4.3.1 Para transportar las muestras al laboratorio deben colocarse en un envase secundario, de material resistente a roturas o filtraciones.

4.3.2 Todas las muestras son enviadas al laboratorio lo más pronto posible (Ver Tabla N° 1).

4.3.3 En caso sea necesario transferir las muestras a otros laboratorios. Los responsables de su envío elegirán el sistema de embalaje apropiado para la conservación de las muestras durante el tiempo que demanda el transporte hasta llegar al laboratorio.

4.4 CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA

4.4.1 Controlar la hoja de pedido y etiqueta de la muestra, verificando la información esencial.

4.4.2 Antes de rechazar una muestra debido a una información inapropiada o incompleta, debe establecerse contacto con la persona responsable para efectuar las correcciones necesarias.

4.4.3 Es necesario seguir estrictamente los procedimientos descritos. La muestra obtenida puede ser rechazada por el personal de laboratorio de acuerdo a los siguientes criterios:

4.4.3.1 No indicar tipo de muestra o procedencia

4.4.3.2 Inadecuada temperatura de transporte

4.4.3.3 Demora en el envío al laboratorio

4.4.3.4 Medio de transporte inadecuado

4.4.3.5 Muestra sin rotular o mal rotulada

4.4.3.6 Recipiente inadecuado (por ejemplo, con rajaduras)

4.4.3.7 Muestra con contaminación obvia

4.4.3.8 Volumen inadecuado

4.4.4 En casos de muestras rechazadas, el personal de laboratorio debe explicar al médico solicitante las razones y observaciones en la ficha de solicitud de diagnóstico correspondiente.

SECCIÓN 5

PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LEPTOSPIRAS

Las leptospiras son bacterias exigentes que requieren para su crecimiento condiciones nutricionales adecuadas y ser incubado en condiciones de aerobiosis, pH y temperatura óptimos.

Las leptospiras requieren medios que contengan suero albúmina bovina fracción V, pudiendo alternativamente utilizarse medios que contengan 8-10% de suero de conejo.

El diagnóstico de laboratorio de leptospirosis será exitoso, si la muestras clínicas son las apropiadas y han sido obtenidas en el período apropiado, dependiendo de la fase de la enfermedad en que se encuentra el paciente (Anexos A y B).

5.1 SIEMBRA DE LA MUESTRA DE SANGRE (HEMOCULTIVO)

5.1.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la siembra de muestra de sangre total para el diagnóstico bacteriológico de infección por leptospiras.

5.1.2 Materiales y equipos

- 5.1.2.1 Cabina flujo laminar
- 5.1.2.2 Estufa de 28°C-30°C
- 5.1.2.3 Mechero Bunsen
- 5.1.2.4 Propipeta o pipeteador automático
- 5.1.2.5 Microscopio de campo oscuro
- 5.1.2.6 Pipeta Pasteur
- 5.1.2.7 Jeringas descartables
- 5.1.2.8 Láminas porta-objetos
- 5.1.2.9 Laminillas cubre-objetos
- 5.1.2.10 Guantes de látex
- 5.1.2.11 Contenedor de material contaminado
- 5.1.2.12 Medios de cultivo:
 - a. Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b. Tubo con medio EMJH

5.1.3 Procedimiento

- 5.1.3.1 Mantener la muestra a temperatura ambiente durante el transporte hasta su procesamiento, por un periodo máximo de 5 días después de su obtención.
- 5.1.3.2 Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca de un mechero Bunsen.
- 5.1.3.3 Los medios deben mantenerse a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar los cultivos.
- 5.1.3.4 los tubos deberán rotularse con el nombre o código del paciente y la fecha. Se emplearán 4 ó 6 tubos por paciente.
- 5.1.3.5 Tomar el tubo que contiene la sangre con anticoagulante, sacar el tapón y flamear la boca con el mechero Bunsen.
- 5.1.3.6 Tomar aproximadamente 1 mL de muestra de sangre con una pipeta pasteur estéril ayudado por una propipeta, luego volver a tapar el tubo que contiene la muestra.
- 5.1.3.7 Abrir la tapa del tubo que contiene el medio y flamear la boca, inocular 1 o 2 gotas de sangre en la parte central del medio, volver a flamear la boca, tapar el tubo y colocarlos en una gradilla sin agitar.
- 5.1.3.8 Realizar el mismo procedimiento para los otros tubos con medio.
- 5.1.3.9 Concluida la siembra y colocados los tubos sembrados en una gradilla, incubar los tubos con medio EMJH o Fletcher a 28°C-30°C, en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas.
- 5.1.3.10 Registrar en el protocolo las fechas de siembra y las observaciones subsecuentes.

5.1.4 Lectura

- 5.1.4.1 Trabajar en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero de Bunsen.
- 5.1.4.2 Controlar los cultivos cada 5-7 días, transfiriendo 1-2 gotas del cultivo sobre una lámina porta-objeto, limpia y sin ralladuras, cubrir con una laminilla y observar al microscopio de campo oscuro con objetivo de 40X. Observar por lo menos 5 preparaciones de cada cultivo.
- 5.1.4.3 Si se observa la presencia de leptospiras, microorganismos muy móviles, tanto en el medio líquido o semisólido, realizar el subcultivo en 2 tubos con nuevo medio para la conservación de la cepa e identificación posterior.
- 5.1.4.4 Incubar los cultivos originales y los subcultivos por 7 días a 28°C-30°C
- 5.1.4.5 Si los hemocultivos son negativos, seguir incubando y controlando cada 7 días hasta 4-8 semanas antes de descartar como negativa la muestra. Si el volumen inicial es pequeño, se puede agregar nuevo medio de cultivo.

5.1.5 Interpretación

- 5.1.5.1 La presencia de leptospiras indica la positividad del caso.
- 5.1.5.2 Generalmente, el aislamiento de otras bacterias indica que la muestra se contaminó durante el procedimiento de toma de muestra o siembra en los medios.
- 5.1.5.3 El no aislamiento de leptospiras posterior a las ocho semanas de realizado la siembra, nos puede indicar que el paciente no estuvo con leptospirosis o la muestra se tomó en un período no adecuado posterior a la leptospiremia.
- 5.1.5.4 El crecimiento de leptospiras en un medio semisólido, es usualmente característico por la aparición de un disco visible que se forma por debajo de 1-3 cm de la superficie, el cual contiene una gran cantidad de leptospiras. Sin embargo, la ausencia del disco no indica necesariamente la ausencia de leptospiras (Figura N° 1).



Figura N° 1. Cultivo positivo de leptospiras en medio EMJH

- 5.1.5.5 Para observar el desarrollo macroscópico en el medio líquido, caracterizado por la opalescencia "nube", agitar suavemente el cultivo y observar a través de la luz natural o artificial. La presencia de sedimento o turbidez indica que el cultivo está contaminado.

5.2 SIEMBRA DE LA MUESTRA DE LÍQUIDO CEFALORAQUÍDEO

5.2.1 Objetivo

Describir los procedimientos para el cultivo de muestra de LCR para el diagnóstico bacteriológico de infección por leptospiras.

5.2.2 Materiales y equipos

- 5.2.2.1 Cabina flujo laminar
- 5.2.2.2 Estufa de 28°C-30°C
- 5.2.2.3 Mechero Bunsen
- 5.2.2.4 Propipeta o pipeteador automático

- 5.2.2.5 Microscopio de campo oscuro
- 5.2.2.6 Pipeta Pasteur
- 5.2.2.7 Jeringas descartables
- 5.2.2.8 Láminas porta objetos
- 5.2.2.9 Laminillas cubre objetos
- 5.2.2.10 Guantes de látex
- 5.2.2.11 Contenedor de material contaminado
- 5.2.2.12 Medios de cultivo
 - a. Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b. Tubo con medio EMJH

5.2.3 Procedimiento

- 5.2.3.1 Mantener la muestra a temperatura ambiente durante el transporte hasta su procesamiento por un periodo máximo de 4 días después de tomada la muestra.
- 5.2.3.2 Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca de un mechero Bunsen.
- 5.2.3.3 Mantener los medios a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar los cultivos.
- 5.2.3.4 Rotular los tubos con el nombre o código del paciente y la fecha. Se emplearán 4 ó 6 tubos por paciente.
- 5.2.3.5 Tomar el frasco que contiene la muestra de LCR, abrir la tapa del frasco y flamear la boca con el mechero Bunsen.
- 5.2.3.6 Tomar la muestra con una pipeta de 5 mL estéril ayudado por un pipeteador automático aproximadamente 3 mL, luego tapar el frasco con la muestra.
- 5.2.3.7 Abrir la tapa del tubo que contiene el medio y flamear la boca, luego inocular en el tubo con medio 0,5mL de LCR, cerrar el tubo y colocarlo sin agitar en una gradilla.
- 5.2.3.8 Realizar el mismo procedimiento para los otros tubos con medio
- 5.2.3.9 Incubar a 28°C-30°C en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas

5.2.4 Lectura

- 5.2.4.1 Seguir instrucciones según ítem 5.1.4

5.2.5 Interpretación

5.2.5.1 Seguir instrucciones según ítem 5.1.5

5.3 SIEMBRA DE LA MUESTRA DE ORINA

5.3.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la siembra de muestra de orina para el diagnóstico bacteriológico de infección por leptospirosis.

5.3.2 Materiales y equipos

5.3.2.1 Cabina flujo laminar

5.3.2.2 Estufa de 28°C - 30°C

5.3.2.3 Centrífuga

5.3.2.4 Mechero Bunsen

5.3.2.5 Propipeta o pipeteador automático

5.3.2.6 Microscopio de campo oscuro

5.3.2.7 Pipeta pasteur

5.3.2.8 Jeringas descartables

5.3.2.9 Láminas porta-objetos

5.3.2.10 Laminillas cubre-objetos

5.3.2.11 Guantes de látex

5.3.2.12 Contenedor de material contaminado

5.3.2.13 Medios de cultivo:

a. Tubo con medio semisólido Fletcher

b. Tubo con medio EMJH

5.3.3 Procedimiento

5.3.3.1 Mantener la muestra a temperatura ambiente durante su transporte hasta su procesamiento por un periodo máximo de 2 horas después de tomada la muestra o refrigerado a 4°C por un periodo máximo de 6 horas, aunque no es lo adecuado.

- 5.3.3.2 Los medios deben mantenerse a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar la siembra.
- 5.3.3.3 Rotular los tubos con nombre o código del paciente y la fecha. Se emplearán 4 o 6 tubos por paciente.
- 5.3.3.4 Traspasar la muestra de orina a tubos de vidrio (13 mL) y luego centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 1 mL de buffer fosfato salino pH 7,4 o solución salina fisiológica a 0,9%.
- 5.3.3.5 A partir del sedimento resuspendido, realizar diluciones sucesivas hasta 1:10 000.
- 5.3.3.6 Sembrar 0,5 mL de la resuspensión en 4,5 mL de medio EMJH o Fletcher que contiene el antibiótico 5-fluorouracil (100-200 mg/mL) de este primer tubo (dilución 1:10) sembrado, extraer 0,5mL y sembrar en un tubo que contiene 4,5 mL de medio. De este segundo tubo (dilución 1:100), extraer 0,5 mL y sembrar en un tubo con 4,5 mL de medio. Realizar este procedimiento hasta que la dilución final de la orina sea 1:10 000.
- 5.3.3.7 Concluída la siembra, colocar los tubos sembrados en una gradilla e incubar a 28°C-30°C, en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas.

5.3.4 Lectura

- 5.3.4.1 Seguir instrucciones según ítem 5.1.4

5.3.5 Interpretación

- 5.3.5.1 Generalmente, la muestra de orina tiende a contaminarse y acidificarse rápidamente. Por ello, es importante realizar el cultivo en el menor tiempo posible después de colectado la muestra.
- 5.3.5.2 Seguir instrucciones según ítem 5.1.5

5.4 SIEMBRA DE LA MUESTRA DE UN ORGANNO

5.4.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la siembra de muestra de riñón, hígado y cerebro para el diagnóstico bacteriológico de infección por leptospiras.

5.4.2 Materiales y Equipos

- 5.4.2.1 Cabina flujo laminar
- 5.4.2.2 Estufa de 28°-30°C
- 5.4.2.3 Mechero Bunsen
- 5.4.2.4 Morteros
- 5.4.2.5 Propipeta o pipeteador automático

- 5.4.2.6 Microscopio de campo oscuro
- 5.4.2.7 Pipeta Pasteur
- 5.4.2.8 Jeringas descartables
- 5.4.2.9 Láminas porta-objetos
- 5.4.2.10 Laminillas cubre-objetos
- 5.4.2.11 Guantes de látex
- 5.4.2.12 Contenedor de material contaminado
- 5.4.2.13 Medio de Cultivo
 - a. Tubo con medio semisólido Fletcher
 - b. Tubo con medio EMJH

5.4.3 Procedimiento

- 5.4.3.1 Mantener la muestra a temperatura ambiente durante su transporte hasta su procesamiento por un período máximo de 4 horas después de tomada la muestra o refrigerado de 4°C-8°C por un período máximo de 6 horas.
- 5.4.3.2 Los medios deben mantenerse a temperatura ambiente 30 minutos antes de realizar la siembra.
- 5.4.3.3 Rotular los tubos con nombre o código del paciente y la fecha. Se emplarán 4 o 6 tubos por paciente.
- 5.4.3.4 Trasvasar la muestra a un mortero, luego realizar un macerado con arena lavada y estéril, hacer un machacado del órgano, agregar 2 mL de PBS y absorber la suspensión y pasarlo a un tubo con PBS de 5 mL, luego se mezcla enérgicamente y se deja reposar en posición vertical.
- 5.4.3.5 A partir del sobrenadante, extraer 0,5 mL y sembrar en 4,5 mL de medio EMJH o Fletcher. Repetir este mismo procedimiento para tres tubos más.
- 5.4.3.6 Concluida la siembra, colocar los tubos sembrados en una gradilla e incubar a 28°C-30°C en condiciones aeróbicas por 4-8 semanas.

5.4.4 Lectura

- 5.4.4.1 Seguir instrucciones según ítem 5.1.4

5.4.5 Interpretación

- 5.4.5.1 Seguir instrucciones según ítem 5.1.5

5.5 EXAMEN DIRECTO DE LEPTOSPIRAS

5.5.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la observación en microscopio de campo oscuro de muestras de sangre, LCR, orina y tejidos para el diagnóstico presuntivo bacteriológico de infección por leptospirosis.

5.5.2 Condiciones generales

5.5.2.1 Morfológicamente, los diferentes serovares de leptospirosis patógenas o saprofitas observados al microscopio de campo oscuro o en coloraciones son idénticos. Las leptospirosis son microorganismos helicoidales, flexibles, con las espiras estrechamente unidas, semejando un "collar de perlas", con una longitud de 6 a 20 μm y aproximadamente 0,1 μm de diámetro. Ambos extremos terminan en semigancho, rara vez se observan rectos y son muy móviles.

5.5.2.2 El microscopio electrónico revela la presencia de dos endoflagelos periplasmáticos insertados subterminalmente en cada extremo del cilindro protoplasmático y sus extremos libres de cada endoflagelo se extiende hacia el centro de la célula. Una membrana externa cubre ambas estructuras.

5.5.2.3 La observación directa de leptospirosis al campo oscuro en muestras clínicas de sangre, LCR, orina y tejidos requiere de destreza y experiencia, debido a su mínima concentración en estas muestras. El examen directo al microscopio de campo oscuro no debe ser usado como único procedimiento de diagnóstico, sino como un método auxiliar.

5.5.3 Materiales y equipos

5.5.3.1 Mechero Bunsen

5.5.3.2 Propipeta o pipeteador automático

5.5.3.3 Microscopio de campo oscuro

5.5.3.4 Pipeta pasteur

5.5.3.5 Láminas porta-objetos

5.5.3.6 Laminillas cubre-objetos

5.5.3.7 Guantes de látex

5.5.3.8 Contenedor de material contaminado

5.5.4 Procedimiento

5.5.4.1 *En sangre*

- a. Se realizará después del procedimiento de cultivo señalado en el ítem 5.1.3.
- b. Centrifugar la sangre con anticoagulante a 500 rpm durante 15 minutos para remover los elementos celulares sanguíneos.

- c. Transferir el sobrenadante a otro tubo y centrifugar a 1500 rpm durante 30 minutos, a fin de incrementar el número de leptospiras.
- d. Descartar el sobrenadante, transferir con una micropipeta con punta estéril aproximadamente 100 µL (1-2 gotas) del sedimento a una lámina porta-objeto de 1-2 mm de diámetro limpia y sin ralladuras, y cubrir con una laminilla de 22 mm.
- e. Observar aproximadamente 50 campos con objetivo de 40X al microscopio de campo oscuro.

5.5.4.2 *En LCR*

- a. Se realizará después del procedimiento de cultivo señalado en el ítem 5.2.3.
- b. Centrifugar la muestra a 1500 rpm por 30 minutos.
- c. Repetir los pasos de acuerdo al ítem 5.5.4.1.c-d

5.5.4.3 *En orina*

- a. Se realizará después del procedimiento de cultivo señalado en el ítem 5.3.3.
- b. Centrifugue la muestra a 1500 rpm por 30 minutos
- c. Repetir los pasos de acuerdo al ítem 5.5.4.1.c-e

5.5.4.4 *En órganos*

- a. Se realizará después del procedimiento del cultivo señalado en el ítem 5.4.3.
- b. Centrifugar la suspensión a 500 rpm durante 15 minutos para remover los elementos celulares.
- c. Repetir los pasos de acuerdo al ítem 5.5.4.1.c-e

5.5.5 **Lectura**

- 5.5.5.1 Realizar la lectura de cada lámina, buscando leptospiras en aproximadamente 50 campos del microscopio de campo oscuro.
- 5.5.5.2 La evaluación consiste en observar en una gota de cada muestra en microscopio de campo oscuro leptospiras y ver sus características morfológicas y de motilidad.

5.5.6 **Interpretación**

- 5.5.6.1 La presencia de leptospiras en cualquiera de las muestras indica la positividad del caso.
- 5.5.6.2 La orina puede contener algunas bacterias, pero la presencia de microorganismos en LCR, sangre y tejidos indica la contaminación durante el procedimiento de la toma de muestra o transporte de la misma.
- 5.5.6.3 En el examen de muestras de sangre al microscopio de campo oscuro, se debe diferenciar las leptospiras móviles de elementos como fibrillas o extrusiones celulares, que poseen movimiento browniano.

- 5.5.6.4 La concentración de leptospiras en sangre y LCR es mínima. Sin embargo, no observar espiroquetas no significa que en la muestra completa no estén presentes.
- 5.5.6.5 En el machacado de órganos como riñón e hígado es posible observar mayor número de leptospiras.
- 5.5.6.6 El diagnóstico presuntivo por observación directa al microscopio de campo oscuro debe ser necesariamente confirmado y correlacionado con los hallazgos en el cultivo y los resultados serológicos.

5.6 EXAMEN DIRECTO DE LEPTOSPIRAS CON COLORACIÓN ROJO DE CONGO

5.6.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la coloración rojo de congo de muestras de LCR, órganos y orina para el diagnóstico bacteriológico directo de infección por leptospiras.

5.6.2 Condiciones generales

Morfológicamente los diferentes serotipos de leptospiras en el examen directo por la coloración rojo de congo son indistinguibles, estas bacterias son helicoidales aproximadamente de 0,1 μm de diámetro, 6-20 μm de largo y usualmente en los extremos presentan la forma de un semigancho.

5.6.3 Materiales y equipos

- 5.6.3.1 Set para coloración rojo de congo
- 5.6.3.2 Mechero Bunsen
- 5.6.3.3 Propipeta o pipeteador automático
- 5.6.3.4 Microscopio de campo oscuro
- 5.6.3.5 Microscopio de campo claro
- 5.6.3.6 Pipeta pasteur
- 5.6.3.7 Láminas porta-objetos
- 5.6.3.8 Laminillas cubre objetos
- 5.6.3.9 Guantes de látex
- 5.6.3.10 Contenedor de material contaminado

5.6.4 Procedimiento

5.6.4.1 En LCR

- a. Después de haber realizado el procedimiento del cultivo de LCR de acuerdo al ítem 5.2.3, extraer con una pipeta pasteur estéril aproximadamente 100 μL de LCR del frasco y traspasarlo a tres láminas porta-objetos, colocando una gota de LCR por lámina.

- b. Seguidamente, en la lámina al lado de la muestra poner una gota de una solución acuosa de rojo de Congo 2%.
- c. Mezclar con una platina la muestra con el colorante y realizar un extendido similar a un frotis para hemograma.
- d. Secar a temperatura ambiente por 30 minutos
- e. Cubrir la lámina con una solución alcohol y ácido clorhídrico a 10N hasta adquirir una coloración azul.
- f. Examinar con objetivo de inmersión.

5.6.4.2 *En Orina*

- a. Después de haber realizado el procedimiento del cultivo de orina de acuerdo al ítem 5.3.3, extraer con una pipeta Pasteur estéril aproximadamente 100 μ L de sedimento de orina y traspasarlo a tres láminas porta objetos (una gota de sedimento de orina por lámina).
- b. Realizar los pasos de acuerdo al ítem 5.6.4.1. b-f.

5.6.4.3 *En Órganos*

- a. Después de haber realizado el procedimiento del cultivo de acuerdo al ítem 5.4.3, extraer con una pipeta Pasteur estéril aproximadamente 100 μ L de sedimento de órgano y traspasarlo a tres láminas porta-objetos (una gota de sedimento de órgano por lámina).
- c. Realizar los siguientes pasos de acuerdo al ítem 5.6.4.1. b-f.

5.6.5 **Lectura**

- 5.6.5.1 Realizar la lectura de cada lámina buscando leptospiras.
- 5.6.5.2 La evaluación consiste en observar un frotis de cada muestra en microscopio de campo claro con un objetivo de inmersión en la búsqueda de leptospiras y sus características morfológicas.

5.6.6 **Interpretación**

- 5.6.6.1 Las espiroquetas aparecen inmóviles e incoloras en fondo azul.
- 5.6.6.2 La presencia de leptospiras en cualquiera de las muestras indica la positividad del caso.
- 5.6.6.3 Generalmente, la presencia de otras bacterias en la orina es normal, pero en LCR, y órganos indica que la muestra se contaminó durante el procedimiento de toma de muestra o transporte de la muestra.
- 5.6.6.4 La observación de la muestra de sangre con esta coloración de rojo de Congo no es aplicable.
- 5.6.6.5 La concentración de leptospiras en LCR en muchos casos, es mínima. No observar leptospiras no significa que las bacterias están ausentes.
- 5.6.6.6 En el machacado de órganos como el riñón e hígado se pueden observar mayor número de leptospiras.
- 5.6.6.7 El diagnóstico presuntivo por observación con coloración de congo debe confirmarse y correlacionarse con los hallazgos en el cultivo y por los resultados serológicos.

SECCIÓN 6

PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LEPTOSPIRAS

El diagnóstico presuntivo precoz, tanto de la forma leve de tipo catarral o de la forma icterica severa es esencial para evitar los daños patológicos subsecuentes en el paciente. La selección y uso de las pruebas convenientes para el diagnóstico de laboratorio dependen del conocimiento del curso de la enfermedad. El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento de la espiroqueta de muestras de sangre, LCR y orina; aunque debido al desarrollo lento y las pocas posibilidades de aislamiento (del 1-3 %), inicialmente se emplean métodos serológicos, complementándose con el diagnóstico bacteriológico (Anexos A y B).

En la leptospirosis los anticuerpos son detectados a partir de 5-10 días de iniciado los síntomas de la enfermedad. Cuando la primera muestra es tomada en la primera semana de la enfermedad, es importante obtener una segunda muestra después de 1-3 semanas para ver el incremento del título de anticuerpos. La seroconversión indica que es una infección producida por leptospirosis.

Los anticuerpos que predominan inicialmente en la leptospirosis son de tipo IgM y luego IgG, estos pueden ser detectados por diferentes métodos: fijación de complemento y hemoaglutinación. Estas pruebas usan antígenos género-específico obtenidos por diferentes métodos. Otros métodos actuales son las pruebas de ELISA, pero todo resultado positivo por esta prueba necesariamente debe confirmarse con la prueba de aglutinación microscópica (MAT).

6.1 DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA PRUEBA DE MACRO AGLUTINACIÓN

6.1.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la realización de la prueba de aglutinación macroscópica con suero, para el diagnóstico serológico de la leptospirosis humana y animal.

6.1.2 Condiciones generales

La prueba de aglutinación macroscópica para el diagnóstico de leptospirosis es similar a la prueba en placa para brucelosis. El antígeno que se usa es una suspensión densa de leptospirosis, preparada a partir de un serovar patógeno y que ha sido tratado por métodos físicos con la finalidad que exprese la mayor cantidad de sitios antigénicos de la bacteria y pierda la especificidad del serogrupo. Esta prueba ha sido elaborada y estandarizada en el Instituto Nacional de Salud y se usa como tamizaje para el diagnóstico serológico de la leptospirosis en humanos y animales.

6.1.3 Materiales y equipos

6.1.3.1 Kit de aglutinación macroscópica

6.1.3.2 Micropipetas rango graduable: 2-20 μ l, 10-100 μ l y 100-1000 μ l

6.1.3.3 Reloj

6.1.3.4 Puntas para micropipetas

- 6.1.3.5 Láminas para aglutinaciones
- 6.1.3.6 Rotador de 125 rpm
- 6.1.3.7 Solución salina fisiológica 0,85% (SSF)
- 6.1.3.8 Buffer fosfato salino(PBS) pH 7,4
- 6.1.3.9 Contenedor de material contaminado

6.1.4 Procedimiento

- 6.1.4.1 Mantener a temperatura ambiente la muestra y los reactivos del kit 15 minutos antes de realizar la prueba.
- 6.1.4.2 Incluir en cada corrida un control positivo (suministrado por el Kit) y un control negativo (para lo cual se puede usar la SSF o PBS)
- 6.1.4.3 Agregar 30 μ l de SSF o PBS a la lámina, tomar el criovial que contiene el suero, extraer 30 μ l, agregar una gota de SSF o PBS (dilución 1:2) que se encuentra en la placa y mezclar.
- 6.1.4.4 Tomar 30 μ l de la dilución 1:2 y poner en el primer cuadrante de la lámina, en el siguiente cuadrante añadir 30 μ l del control positivo en el siguiente 30 μ l del control negativo que es SSF o PBS.
- 6.1.4.5 Añadir seguidamente 30 μ l de antígeno a cada cuadrante y mezclar bien con una paletita.
- 6.1.4.6 Someter la lámina a movimientos rotatorios manualmente durante 5 minutos.
- 6.1.4.7 Si se contara con un rotador eléctrico, colocar la lámina sobre ella y hacerla rotar por 5 minutos a 125 rpm.

6.1.5 Lectura (Ver Figura N° 2)

- 6.1.5.1 Realizar la observación inmediatamente con auxilio de una fuente luminosa indirecta sobre un fondo oscuro y comparando con los controles positivo y negativo.
- 6.1.5.2 La presencia evidente de una aglutinación densa en un medio más o menos limpio indica positividad.
- 6.1.5.3 La ausencia de aglutinación en un medio opalescente indica una reacción negativa.

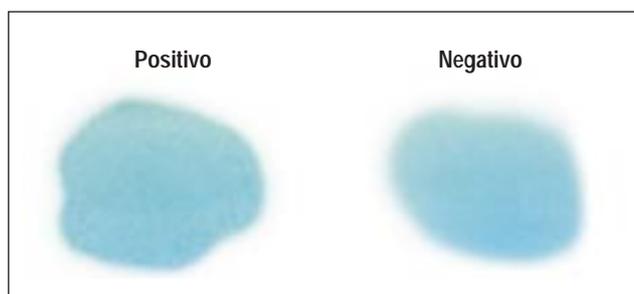


Figura N° 2. Reacción de la prueba de macroaglutinación con suero positivo y negativo

6.1.6 Interpretación

- 6.1.6.1 Los sueros que resultaron negativos a esta prueba deberán ser diluidos 10 veces con SSF o PBS y ser probados nuevamente.
- 6.1.6.2 Los sueros contaminados pueden indicar una reacción falsa y confundir en la interpretación del resultado.
- 6.1.6.3 Los resultados dudosos deben ser repetidos con un suero nuevo después de una semana.
- 6.1.6.4 La presencia de anticuerpos residuales debido a una infección pasada puede dar resultados falsos positivos. En la fase temprana predominan los anticuerpos aglutinantes a lipopolisacáridos de membrana tipo IgM, luego estos tienden a disminuir y aparecen los IgG, que pueden persistir por meses o años.
- 6.1.6.5 La especificidad de esta prueba es limitada en comparación con la prueba MAT.
- 6.1.6.6 Todos los resultados positivos obtenidos con esta prueba necesitan una confirmación por MAT.

6.2 DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO IgM

6.2.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la realización de la prueba de ELISA indirecto IgM en suero para el diagnóstico de la leptospirosis humana en la fase temprana de la enfermedad.

6.2.2 Condiciones generales

- 6.2.2.1 El método de ELISA es usado como una prueba adicional o como una alternativa a la prueba de MAT. Es el método más usado para detectar leptospirosis precoz. Los anticuerpos de tipo IgM son los que se presentan en una reciente infección y estas se pueden detectar específicamente por ELISA. Se han desarrollado una gran variedad de ELISAs y comparándolos con la prueba MAT mostraron una concordancia muy alta. Usando un solo antígeno o pool de antígenos en la prueba de ELISA se pueden determinar anticuerpos IgM frente a varios serovares antigénicamente relacionados. Los sueros positivos deben ser confirmados por MAT.
- 6.2.2.2 Esta prueba es aplicable en diferentes zonas y a temperaturas diferentes, ya que los reactivos son estables por largos períodos.
- 6.2.2.3 Los anticuerpos contra leptospira en el suero, se combinan con el antígeno de leptospira (antígeno total) fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. El suero residual es removido por medio de lavados y luego es añadido el conjugado anti-humano IgM ligado a una enzima (peroxidasa). Posterior a la incubación, los micropocillos son lavados y se añade el sustrato (peróxido de hidrógeno) más un cromógeno. El sustrato es hidrolizado por la enzima y el cromógeno varía de color, la reacción se detiene por la adición de una solución de pare.
- 6.2.2.4 La intensidad de color está directamente relacionado con la concentración de anticuerpos contra leptospira presentes en la muestra.

6.2.3 Materiales y equipos

- 6.2.3.1 kit de ELISA IgM
- 6.2.3.2 Lector de microplacas
- 6.2.3.3 Lavador de microplacas
- 6.2.3.4 Estufa de 37°C
- 6.2.3.5 Micropipetas rango graduable : 2-20µl, 10-100 µl y 100-1000µl
- 6.2.3.6 Micropipeta multicanal 30-300 µl
- 6.2.3.7 Reloj
- 6.2.3.8 Potenciómetro
- 6.2.3.9 Rotador o Shaker
- 6.2.3.10 Puntas para micropipetas
- 6.2.3.11 Buffer fosfato salino(PBS) pH 7,4
- 6.2.3.12 Tween 20
- 6.2.3.13 Contenedor de material contaminado

6.2.4 Procedimiento

- 6.2.4.1 El antígeno de leptospiras producido se guarda a -70°C. Su uso en la prueba se calcula de acuerdo a la cantidad de placas que se desea impregnar.
- 6.2.4.2 Descongelar el antígeno y diluir (1:16) con buffer fosfato salino pH 7,4.
- 6.2.4.3 Una vez diluido, agregar 100 µl del antígeno a cada pocillo de la microplaca e incubar durante 18-20 horas en refrigeración entre 4°C-8°C.
- 6.2.4.4 Lavar 6 veces con buffer de lavado (PBS y Tween 20 a 0,05%), cada vez con 300 l de buffer por pocillo.
- 6.2.4.5 Agregar a cada pocillo 200 µl de una solución bloqueante (5% de Skin Milk diluido en PBS y Tween 20 a 0,05%), incubar por una hora a 37°C y 6 veces la placa con buffer de lavado (cada vez con 300 µl de buffer).
- 6.2.4.6 Guardar a la microplaca -20°C dentro de una bolsa con absorbente hasta su uso.
- 6.2.4.7 Mantener la muestra y los reactivos del kit por 15 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

- 6.2.4.8 Los controles positivo, negativo y calibradores de corte se encuentran prediluidos (1:10) con un preservante.
- 6.2.4.9 Diluir los controles 1:10 (20 μ l) con diluyente de suero (180 μ l) (un positivo, dos calibradores y un negativo) en tubos de dilución.
- 6.2.4.10 Diluir las muestras 1:100(5 μ l) con el diluyente de suero(495 μ l).
- 6.2.4.11 Agregar 100 μ l a cada pocillo de cada dilución de controles y muestras e incubar por 30 minutos a 37°C.
- 6.2.4.12 Lavar 6 veces con PBS y Tween 20 a 0,05%, cada vez con 300 μ l de buffer por pocillo.
- 6.2.4.13 Agregar 100 μ l de conjugado anti-humano IgM en cada pocillo de la microplaca e incubar por 30 minutos a 37°C.
- 6.2.4.14 Lavar 6 veces con PBS y Tween 20 a 0,05%, cada vez con 300 μ l de buffer por pocillo.
- 6.2.4.15 Agregar 100 μ l de sustrato ABTS a cada pocillo e incubar a 37° C por 30 minutos.
- 6.2.4.16 Terminado la incubación, agregar 100 μ l de SDS a 1% (reactivo de pare).
- 6.2.5 Lectura (Figura N° 3)**
- 6.2.5.1 Realizar la lectura en un lector de microplacas a 405 nm.
- 6.2.5.2 Para realizar la observación visual de la prueba, debe haber una marcada diferencia entre el control positivo y el negativo.
- 6.2.5.3 El control positivo presentará una coloración verde intenso y el control negativo será transparente. Los calibradores estarán ligeramente coloreados.
- 6.2.5.4 Una muestra positiva presentará una coloración verde semejante al control positivo.

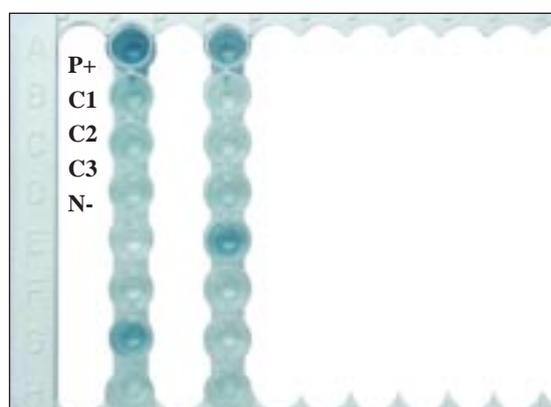


Figura N° 3. Prueba de ELISA IgM con muestras y controles

6.2.6 Interpretación

6.2.6.1 Posterior a la lectura realizar el cálculo de la unidad leptó para cada muestra mediante la siguiente fórmula (Tabla N° 2):

$$(UL) = 10 \times \frac{D.Om}{X}$$

UL = Unidades leptó

D.Om = Densidad óptica de la muestra

X = Promedio de densidad óptica de calibradores de corte

6.2.6.2 Se considerará una muestra como positiva, si las unidades obtenidas mediante este cálculo son mayores a 11, debiendo ser evaluada mediante la prueba MAT para su confirmación diagnóstica.

6.2.6.3 Se considerará una muestra como negativa, cuando las unidades obtenidas mediante el cálculo son menores a 9.

6.2.6.4 Si en una muestra se detectan valores intermedios entre 9 y 11, realizar un segundo análisis y, de persistir este resultado, solicitar una segunda muestra después de una semana, siendo esta vez el resultado analizado con la ficha clínica para evaluar la etapa de la enfermedad.

6.2.6.5 Un incremento del 50% en unidades leptó en muestras pareadas es significativo y confirmaría el caso como leptospirosis. Posteriormente, esta se tiene que confirmar con la prueba MAT.

6.2.6.6 Pueden presentarse falsos negativos, cuando el paciente se encuentre en los primeros cinco días de enfermedad y la cantidad de anticuerpos no son detectables por la prueba. En ese caso, es necesario una segunda muestra 7-15 días posteriores a la toma de la primera muestra.

Tabla N° 2. Interpretación de la prueba ELISA Indirecto Ig M

UNIDADES LEPTO	RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
< 9	Negativo	No evidencia de anticuerpos IgM contra leptospira
9-11	Indeterminado	Sugiere segunda muestra
> 11	Positivo	Presencia de anticuerpos IgM contra leptospira

6.3 DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO IgG

6.3.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la realización de la prueba de ELISA indirecto IgG en suero para el diagnóstico en fase convalescente de la enfermedad y para estudios epidemiológicos de la leptospirosis humana.

6.3.2 Condiciones generales

6.3.2.1 El ELISA IgG es utilizado para estudios epidemiológicos como una prueba adicional a la prueba MAT. Los anticuerpos de tipo IgG son los que se presentan posterior a la presencia de anticuerpos de tipo IgM.

6.3.2.2 Esta prueba se usa como tamizaje para el diagnóstico serológico y epidemiológico de la leptospirosis humana. Cuando los anticuerpos IgG contra leptospira están presentes en el suero, se combinan con el antígeno de leptospira (antígeno total) fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. El suero residual es removido por medio del lavado, añadiéndose el conjugado anti-humano IgG ligado a una enzima (peroxidasa). Los micropocillos son lavados y coloreados por un sustrato (peróxido de hidrógeno) más un cromógeno. El sustrato es hidrolizado por la enzima y el cromógeno varía de color, la reacción se detiene por la adición de una solución de pares.

6.3.2.3 La intensidad de color está directamente relacionado a la concentración de anticuerpos contra leptospirosis presentes en la muestra.

6.3.3 Materiales y equipos

6.3.3.1 Kit de ELISA IgG

6.3.3.2 Lector de microplacas

6.3.3.3 Lavador de microplacas

6.3.3.4 Estufa de 37°C

6.3.3.5 Micropipetas rango graduable : 2-20 µl, 10-100 µl y 100-1000 µl

6.3.3.6 Micropipeta multicanal 30-300 µl

6.3.3.7 Reloj

6.3.3.8 Potenciómetro

6.3.3.9 Rotador o Shaker

6.3.3.10 Puntas para micropipetas

6.3.3.11 Buffer fosfato salino(PBS) pH 7,4

6.3.3.12 Tween 20

6.3.3.13 Contenedor de material contaminado

6.3.4 Procedimiento

Realizar el procedimiento según el ítem 6.2.4, excepto el ítem 6.2.4.13 en que se deberá agregar el conjugado anti-humano IgG.

6.3.5 Lectura (Figura N° 4)

6.3.5.1 Realizar la lectura en un lector de microplacas a 405 nm.

6.3.5.2 Para realizar la observación visual de la prueba, debe haber una marcada diferencia entre control positivo y el negativo.

6.3.5.3 El control positivo presentará una coloración verde intenso, el control negativo será transparente, los calibradores estarán ligeramente coloreados.

6.3.5.4 Una muestra positiva presentará una coloración verde semejante al control positivo.

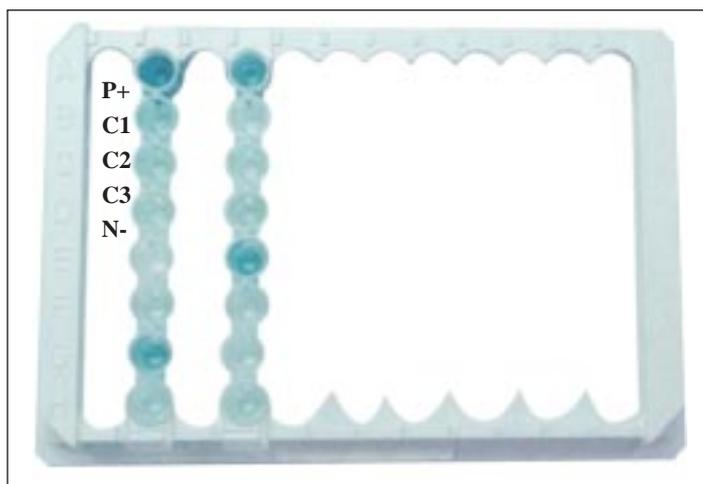


Figura N° 4. Prueba de ELISA IgG para leptospiras con muestras y controles

6.3.6 Interpretación

6.3.6.1 Posterior a la lectura, realizar el cálculo de la unidad lept para cada muestra, mediante la siguiente fórmula (Tabla N° 3):

$$(UL) = 10 \times \frac{D. Om}{X}$$

UL = Unidades lept

D.Om = Densidad óptica de la muestra

X = Promedio de densidad óptica de calibradores de corte

- 6.3.6.2 Una muestra se considerará positiva si las unidades obtenidas mediante este cálculo son mayores a 11. Además, esta muestra deberá ser evaluada mediante la prueba MAT para su confirmación diagnóstica.
- 6.3.6.3 Una muestra se considerará negativa cuando las unidades obtenidas mediante el cálculo son menores a 9.
- 6.3.6.4 Si en una muestra se detectan valores intermedios entre 9 y 11, se debe realizar un segundo análisis y, de persistir este resultado, se debe realizar la prueba MAT para descartar si tuvo una infección pasada.

Tabla N° 3. Interpretación de la prueba de ELISA Ig G.

UNIDADES LEPTO	RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
< 9	Negativo	No evidencia de anticuerpos IgG contra leptospira
9-11	Indeterminado	Repetir la prueba
> 11	Positivo	Presencia de anticuerpos IgG contra leptospira

6.4 DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA PRUEBA DE MICROAGLUTINACIÓN (MAT)

6.4.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la realización de la prueba MAT en suero para el diagnóstico serológico de leptospirosis humana y animal en la fase temprana y convalescente de la enfermedad.

6.4.2 Condiciones generales

- 6.4.2.1 La prueba MAT es el método de diagnóstico estándar de referencia internacional para la confirmación serológica de una infección reciente y pasada de leptospirosis. Usa antígenos vivos y, es de alta sensibilidad y especificidad al serovar infectante.
- 6.4.2.2 Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos anti-leptospiras en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad.
- 6.4.2.3 La batería que se usa como antígeno está representada por los serovares más prevalentes del área. Sin embargo, en aquellas regiones en donde no se conoce los serovares circulantes, la OMS recomienda por lo menos una cepa de referencia de los serovares más representativos de las especies más frecuentes.
- 6.4.2.4 En la estandarización del MAT, es muy importante considerar:
- La densidad correcta del cultivo usado como antígeno. Esta densidad debe ser aproximadamente de $1,5 \times 10^8$ leptospiras.
 - La determinación del título final de la aglutinación.

- 6.4.2.5 Se emplean como antígeno las cepas de referencia que deben ser replicados semanalmente para realizar la prueba. Una vez revisado los cultivos, se eligen aquellos que tengan buen crecimiento y no formen aglutinaciones entre ellas. Cuando los cultivos están muy densos se deben diluir con buffer fosfato salino PBS pH 7,2-7,4 o solución salina fisiológica 0,85%.
- 6.4.2.6 Para que el antígeno sea óptimo para la prueba tiene que observarse en el microscopio de campo oscuro entre 150 a 200 leptospiras por campo o hasta lograr una opalescencia de 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 6.4.2.7 La prueba se basa en enfrentar diluciones seriadas de suero con igual volumen de una suspensión de leptospiras (antígeno) para luego observarse en microscopio de campo oscuro para estimar el 50% de aglutinación como el punto final de la reacción antígeno-anticuerpo.

6.4.3 Materiales y equipos

- 6.4.3.1 Estufa de 30°C
- 6.4.3.2 Microscopio de campo oscuro
- 6.4.3.3 Microplacas de poliestireno
- 6.4.3.4 Micropipetas rango graduable : 2-20 µl, 10-100 µl y 100-1000 µl
- 6.4.3.5 Micropipeta multicanal 30-300 µl
- 6.4.3.6 Reloj
- 6.4.3.7 Potenciómetro
- 6.4.3.8 Rotador o Shaker
- 6.4.3.9 Puntas para micropipetas
- 6.4.3.10 Tubos de dilución
- 6.4.3.11 Láminas porta-objetos
- 6.4.3.12 Laminillas cubre-objetos
- 6.4.3.13 Buffer fosfato salino(PBS) pH 7,4
- 6.4.3.14 Solución salina fisiológica 0,85%
- 6.4.3.15 Antígeno de leptospiras de 5-7 días de crecimiento
- 6.4.3.16 Contenedor de material contaminado

6.4.4 Procedimiento

6.4.4.1 Tamizaje

- a. Preparar diluciones separadamente del suero 1:50, 1:100 y 1:200 en un volumen final de 1,5 mL con PBS o SSF en un tubo de dilución.
- b. Distribuir la microplaca en 8 columnas para la dilución de suero y 24 filas para los antígenos.
- c. Agregar 50 µl a cada pocillo de la dilución de suero 1:50 en la primera y quinta columna.
- d. Agregar 50 µl a cada pocillo de la dilución de suero 1:100 en la segunda y sexta columna.
- e. Agregar 50 µl a cada pocillo de la dilución de suero 1:200 en la tercera y séptima columna.
- f. Agregar 50 µl a cada pocillo de PBS ó SSF en la cuarta y octava columna para el control del antígeno.
- g. A cada pocillo de la primera fila (columna 1, 2, 3 y 4), agregar el antígeno correspondiente al primer serogrupo (Ver Tabla N° 4). La dilución de suero sería el doble.
- h. Realizar este procedimiento sucesivamente de la 2^{da} fila hasta el 24^{va} fila.
- i. Posterior a la adición de los antígenos, poner la microplaca sobre el shaker y rotar a una revolución 500 rpm durante cuatro segundos para que la muestra de suero y antígeno se mezclen adecuadamente.
- j. Cubrir la microplaca con papel platino e incubar por 2 horas a 30°C.

Tabla N° 4. Esquema para el tamizaje por la prueba MAT

Dil. suero		1:50	1:100	1:200	Ctrl	1:50	1:100	1:200	Ctrl		
		1:100 dilusión final	1:200 dil final	1:400 dil final		1:100 dil final	1:200 dil final	1:400 dil final			
Serovares	1	50 µl (suero) +50 µl(Antig)								13	Serovares
	2									14	
	3									15	
	4									15	
	5									17	
	6									18	
	7									19	
	8									20	
	9									21	
	10									22	
	11									23	
	12									24	

6.4.4.2 *Titulación*

- a. Después de realizar el tamizaje de las muestras y si se observa que en la dilución 1:400 presentan aglutinaciones igual o mayor a 2+ con uno ó más serogrupos, se tiene que titular el suero.
- b. Preparar una placa de microtitulación, rotular el código de los serovares en las filas y en las columnas y anotar las diluciones correspondientes que empiezan con 1:50, 1:100 hasta 1: 51200.
- c. A partir de la segunda columna, agregar 50 µl de PBS o SSF hasta la columna 12.
- d. Diluir el suero en una dilución 1:25 con SSF o PBS en un volumen final de 1mL.
- e. Agregar 50 µl del suero diluído 1:25 en las dos primeras columnas.
- f. Usando una micropipeta multicanal, mezclar el suero diluído con el PBS o SSF en la segunda columna, luego extraer 50 µl y verterlo en la tercera columna y, así sucesivamente, continuar con todas las diluciones a lo largo de la fila, hasta la décimo primera columna (Tabla N° 5).
- g. Descartar los últimos 50 µl y dejar libre la décimo segunda columna, la que se usará como control de antígeno.
- h. En cada fila, agregar 50 µl del correspondiente antígeno.
- i. Posterior a la adición de los antígenos, colocar la microplaca sobre el shaker y rotar a una revolución 500 rpm durante cuatro segundos.
- j. Cubrir la microplaca con papel platino e incubar por 2 horas a 30°C.

Tabla N° 5. Esquema para la titulación de la prueba MAT

		1:25 Dilusión suero	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	ctrl.
		1:50 dilusión final	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ser 1	A	50 µl (suero) +50 µL(Antig)										
Ser 2	B											
Ser 3	C											
Ser 4	D											
Ser 5	E											
Ser 6	F											
Ser 7	G											
Ser 8	H											

6.4.5 Lectura

- 6.4.5.1 Utilizando las puntas de la micropipeta multicanal extraer 15 μ l de mezcla antígeno-suero y 15 μ l del control y traspasarlos a una lámina porta-objeto.
- 6.4.5.2 La lectura se realizará utilizando un microscopio de campo oscuro con objetivo de 10X, sin cubre-objetos.
- 6.4.5.3 Observar el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control según la escala de la Tabla N° 6.
- 6.4.5.4 El título final estará dado por la dilución del suero que presenta 50% de aglutinación, y que se reporta como cruces de aglutinación (de 1+ a 4+).
- 6.4.5.5 Cuando una muestra es negativa, no se presenta aglutinación, observándose la muestra de suero igual al antígeno control.

Tabla N° 6. Lectura por la prueba MAT

CRUCES (AGLUTINACIÓN)	OBSERVACIÓN
+	25% Aglutinación con 75% de células libres.
++	50% Aglutinación con 50% de células libres.
+++	75% Aglutinación con 25% de células libres.
++++	100% Aglutinación ó lisadas con 0-25% de células libres.

6.4.6 Interpretación (Tablas N° 7 y N° 8)

- 6.4.6.1 Un suero se considera positivo cuando se observa una aglutinación de 2+ en una dilución de suero igual o mayor a 1:100 (Figura N° 5).

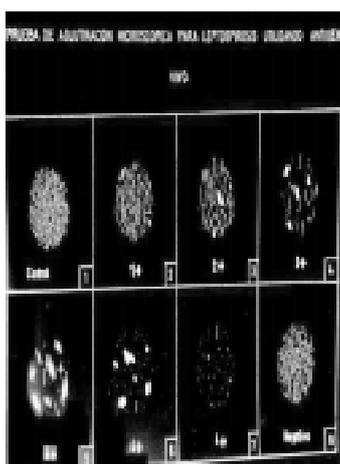


Figura N° 5. Diferentes grados de aglutinación en la prueba MAT para leptospiras

- 6.4.6.2 Un suero se considera negativo cuando no se observa aglutinación con ningún serovar en una dilución de suero menor a 1:100.

- 6.4.6.3 En una infección temprana es frecuente observar reacciones cruzadas en más de dos serovares homólogos que reaccionan con el suero. Es necesario una segunda muestra 7–21 días posterior de tomada la primera muestra.
- 6.4.6.4 Durante la tercera y cuarta semana de producida la enfermedad, el título de anticuerpos hacia el serovar infectante es mayor, facilitando su identificación.
- 6.4.6.5 Durante los primeros días de enfermedad, cuando la producción de anticuerpos aglutinantes es menor, esta prueba puede salir negativa o reaccionar a títulos menores a una dilución 1:100.
- 6.4.6.6 Para considerar una muestra positiva en muestras pareadas, es necesario que se produzca un incremento del título de anticuerpos de dos a cuatro diluciones con respecto a la primera muestra.
- 6.4.6.7 En algunos casos se puede observar un título bajo persistente con un serovar. Esto pueda deberse a que el serovar infectante no está incluido en la batería de antígenos.
- 6.4.6.8 En aquellos casos que no se observe un incremento en el título de anticuerpos entre la primera y segunda muestra, se puede interpretar que es una infección pasada.

Tabla Nº 7. Interpretación de los resultados serológicos en humanos para el diagnóstico de la leptospirosis

S U E R O S	Resultados serológicos			
	Muestra de suero	ELISA IgM	Microaglutinación (MAT)	Interpretación
P A R E A D O S	Suero I	Negativo	Negativo (Títulos <100)	Caso negativo
	Suero II			
	Suero I	Negativo o indeterminado	Negativo (Títulos <100)	Infección Reciente
	Suero II			
	Suero I	Positivo	Positivo (Títulos > 100)	Infección Reciente
	Suero II			
Suero I	Negativo	primera muestra)	Infección pasada	
Suero II		Positivo (Título <100)		
S U E R O S Ú N I C O S	Suero único (Fase Aguda)	Negativo o Positivo	Negativo ó Positivo	Negativo ó Positivo Solicitar Segunda muestra
	Suero único (Fase Convaleciente > 1 mes)	Negativo	Negativos (Título <100)	Caso Negativo
	Suero único (Fase convaleciente)	Positivo	Positivo (Títulos>100 a diferentes serovares)	Infección reciente

Tabla N° 8. Serovares de referencia utilizados como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica (MAT)

N°	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. biflexa</i>	Andamana	andamana	CH 11
2	<i>L. interrogans</i>	Australis	australis	Ballico
3	<i>L. interrogans</i>	Australis	bratislava	Jez Bratislava
4	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	autumnalis	Akiyami A
5	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	ballum	Mus 125
6	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	ballum	S 102
7	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	bataviae	Van Tienen
8	<i>L. weilii</i>	Celledoni	celledoni	Celledoni
9	<i>L. interrogans</i>	Canícola	canícola	Hond Utrecht IV
10	<i>L. interrogans</i>	Canícola	canicola	Ruebush
11	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	cynopteri	3522 C
12	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	djasiman	Djasiman
13	<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V
14	<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis	borincana	HS 622
15	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
16	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M20
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	mankarso	Mankarso
18	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	javanica	Veldrat Batavia 46
19	<i>L. santarosai</i>	Mini	georgia	LT117
20	<i>L. interrogans</i>	Pomona	pomona	Pomona
21	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
22	<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	alexi	HS 616
23	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	wolffi	3705
24	<i>L. biflexa</i>	Semarang	patoc	Patoc 1
25	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	tarassovi	Perepelicin

SECCIÓN 7

IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS

Para establecer un adecuado sistema de vigilancia de leptospirosis es necesario conocer el serovar de leptospirosis que circulan en los reservorios y pacientes y determinar el área geográfica del espectro clínico epidemiológico, para aplicar las medidas de control. Asimismo, el antígeno debe poseer una buena reactividad para las pruebas de diagnóstico.

La espiroqueta que causa la leptospirosis pertenece el género *Leptospira*, familia *Leptospiraceae*, orden *Spirochaetales*. Los estudios moleculares taxonómicos han demostrado un alto nivel de heterogeneidad genética dentro, de las especies tradicionales *L. interrogans* y *L. biflexa*. Esto ha permitido desarrollar el sistema taxonómico filogenético, el cual comprende las especies patógenas *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. weilii* y las especies saprofitas *L. biflexa*, *L. genomospecies 1, 3,4,5*, *L. wolbachii*, *L. parva* y *Leptonema illini*

7.1 IDENTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS

7.1.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la identificación de leptospirosis patógenas aisladas de muestras clínicas.

7.1.2 Condiciones generales

7.1.2.1 Las leptospirosis pueden caracterizarse por sus características fenotípicas, como el crecimiento a 13°C, 30°C y 37°C, crecimiento en la presencia de 8-azaguanina o CaSO₄, actividad de la lipasa y la aparición de formas esféricas con la presencia de 1M NaCl.

7.1.2.2 Para diferenciar entre las leptospirosis patógenas y no patógenas, el método más apropiado son el crecimiento en diferentes temperaturas y la 8-azaguanina.

7.1.3 Materiales y equipos

7.1.3.1 Estufa de 13°C, 30°C y 37°C

7.1.3.2 Microscopio de campo oscuro

7.1.3.3 Microplacas de poliestireno

7.1.3.4 Micropipetas rango graduable : 2-20 µl, 10-100 µl y 100-1000 µl

7.1.3.5 Reloj

7.1.3.6 Potenciómetro

7.1.3.7 Rotador o Shaker

7.1.3.8 Puntas para micropipetas

- 7.1.3.9 Tubos de dilución
- 7.1.3.10 Láminas porta-objetos
- 7.1.3.11 Laminillas cubre-objetos
- 7.1.3.12 Buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4
- 7.1.3.13 Solución salina fisiológica 0,85%
- 7.1.3.14 Medio de cultivo Fletcher o EMJH
- 7.1.3.15 Contenedor de material contaminado

7.1.4 Procedimiento

7.1.4.1 Prueba 8-azaguanina

- a. Preparar una solución de 8-azaguanina (225mg/L) en agua destilada.
- b. Disolver la 8-azaguanina por varias horas en un frasco con una barra magnética mediante un rotador magnético. Esterilizar en autoclave.
- c. Agregar asépticamente 1 mL de la solución de 8-azaguanina en 9 mL de medio EMJH.
- d. Inocular al tubo 100 µl de cultivo joven e incubar a 30°C.
- e. Chequear interdiariamente en microscopio de campo oscuro.
- f. Repetir este mismo procedimiento tanto para las cepas patógenas, como para las no patógenas que se usarán como controles.

7.1.4.2 Prueba de la temperatura

- a. Inocular 100 mL de cultivo joven de la cepa en investigación a un tubo con medio e incubar a 13°C.
- b. Inocular 100 mL de cultivo joven de la cepa patógena a un tubo con medio e incubar a 13°C el cual se usará como control. Repetir el mismo procedimiento para la cepa no patógena.
- c. Observar interdiariamente en microscopio de campo oscuro.

7.1.5 Lectura

- 7.1.5.1 Utilizando una pipeta pasteur estéril, extraer una pequeña cantidad de cultivo y traspasar a una lámina porta-objeto.
- 7.1.5.2 La lectura se realiza utilizando un microscopio de campo oscuro con objetivo de 40X y con cubre-objetos.
- 7.1.5.3 Observar la densidad poblacional de cada control y comparar con los obtenidos en los controles.

7.1.6 Interpretación

7.1.6.1 Las leptospiras patógenas se caracterizan por no crecer en presencia de 8-azaguanina y a temperatura de 13°C, a diferencia de las no patógenas que logran desarrollarse en estas condiciones. .

7.2 SEROTIFICACIÓN DE LEPTOSPIRAS PATÓGENAS

7.2.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la serotificación de leptospiras patógenas aisladas de muestras clínicas.

7.2.2 Condiciones generales

7.2.2.1 El serovar es la unidad taxonómica, ejemplo: serovar pomona; el serovar tipo son subgrupos determinados por el análisis genómico, ejemplo: serovar hardjo tipo hardjoprajitmo. La cepa de referencia para cada serovar se indica con la letra superscritt, ejemplo: Van tienenT. El serogrupo no tiene status taxonómico y son convenientes para su aplicación en el manejo de agrupación de los serovares en el laboratorio.

7.2.2.2 El método convencional para la serotipificación es la técnica del análisis de inmunoabsorción de la estructura antigénica de leptospiras. Se considera que dos cepas aisladas pertenecen a diferentes serovares, si después de la absorción cruzada con adecuada cantidad de antígeno heterólogo, 10% o más del título homólogo permanecen regularmente en al menos uno de los antisueros en pruebas repetidas.

7.2.2.3 Otras alternativas para la tipificación, son mediante el uso de anticuerpos monoclonales, métodos moleculares como PFGE, PCR, RFLP, DNA fingerprinting y análisis de factor.

7.2.3 Materiales y equipos

7.2.3.1 Estufa de 13°C, 30°C y 37°C

7.2.3.2 Microscopio de campo oscuro

7.2.3.3 Microplacas de poliestireno

7.2.3.4 Micropipetas rango graduable : 2-20µl, 10-100 µl y 100-1000µl

7.2.3.5 Micropipeta multicanal

7.2.3.6 Reloj

7.2.3.7 Potenciómetro

7.2.3.8 Rotador o Shaker

7.2.3.9 Puntas para micropipetas

7.2.3.10 Tubos de dilución

7.2.3.11 Láminas porta-objetos

7.2.3.12 Laminillas cubre-objetos

7.2.3.13 Buffer fosfato salino(PBS) pH 7,4

7.2.3.14 Solución salina fisiológica 0,85%

7.2.3.15 Medio de cultivo Fletcher o EMJH

7.2.3.16 Contenedor de material contaminado

7.2.4 Procedimiento (Tabla N° 9)

7.2.4.1 Preparar una placa de microtitulación, rotular con el código del aislamiento de los serovares en las filas y anotar en las columnas las diluciones correspondientes que empiezan con 1:50, 1:100 hasta 1:51200. Se necesitan 3 microplacas, debido a que son 24 antisueros diferentes.

7.2.4.2 A partir de la segunda columna, agregar 50 µL de PBS ó SSF hasta la columna 12.

7.2.4.3 Diluir los antisueros en una dilución 1:25 con SSF ó PBS en un volumen final de 1 mL.

7.2.4.4 Agregar en las dos primeras columnas 50 µL del antisuero diluido 1:25.

7.2.4.5 Usando una micropipeta multicanal, mezclar los antisueros diluidos con el PBS o SSF en la segunda columna, luego extraer 50 µL y verterlo en la tercera columna y así sucesivamente continuar con todas las diluciones a lo largo de la fila, hasta la décima primera columna.

7.2.4.6 Descartar los últimos 50 µL y dejar libre la décimo segunda columna, la que se usará como control de antígeno.

7.2.4.7 En toda la placa, agregar 50 µL del correspondiente antígeno aislado.

7.2.4.8 Posterior a la adición de todos los antígenos, colocar la microplaca sobre el shaker y rotar a una revolución 500 rpm durante cuatro segundos.

7.2.4.9 Cubrir la microplaca con papel platino e incubar por 2 horas a 30°C.

Tabla N° 9. Esquema para la titulación de la prueba MAT de una cepa aislada

		Dilución 1:25 de antisuero	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	ctrl.
		1:50 Dilución final	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Antisuero 1	A	50µl (antisuero) +50µl (Antig)										
Ant 2	B											
Ant 3	C											
Ant 4	D											
Ant 5	E											
Ant 6	F											
Ant 7	G											
Ant 8	H											

7.2.5 Lectura

- 7.2.5.1 Utilizando la punta de la micropipeta multicanal, extraer 15µl de mezcla antígeno-suero y 15 µl del control y traspasar a una lamina porta-objeto.
- 7.2.5.2 La lectura se realiza utilizando un microscopio de campo oscuro con objetivo de 10X, sin cubre-objetos.
- 7.2.5.3 Observar el grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control según la escala de 1+ a 4+ (Ver Tabla N° 10).
- 7.2.5.4 El título final estará dado por la dilución del suero que presenta 50% de aglutinación.

Tabla N° 10. Lectura para la serotipificación de leptospiras patógenas

CRUCES (AGLUTINACIÓN)	OBSERVACIÓN
+	25% Aglutinación con 75% de células libres.
++	50% Aglutinación con 50% de células libres.
+++	75% Aglutinación con 25% de células libres.
++++	100% Aglutinación ó lisadas con 0-25% de células libres.

7.2.6 Interpretación

- 7.2.6.1 Si la cepa aislada reacciona con un antisuero a título alto, significa que la cepa pertenece a dicho serogrupo.
- 7.2.6.2 Se puede observar aglutinación cruzada para varios serogrupos con la cepa de referencia.
- 7.2.6.3 Para determinar si la cepa aislada pertenece a un serovar conocido o es un nuevo serovar se realiza la prueba de absorción.
- 7.2.6.4 Otras alternativas para la tipificación son el uso de anticuerpos monoclonales, análisis de factor y los métodos moleculares (PCR, RFLP, PFGE y DNA fingerprinting).

BIBLIOGRAFÍA

- **Alexander A, Gochenour W, Reinhard K, Warda M, Yagar R.** Leptospirosis diagnostic procedures and reagents. 5ta edición. USA; 1978.
- **Adler B, Murphi AM, Locarni SA, Faine S.** Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid-phase-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1980; 11:452-47.
- **Brandao A, Camargo E, Da Silva ED, Silva M, Abrao RV.** Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3138-42.
- **Centers for Disease Control.** MMWR Recommendations and reports. Case definitions for infectious conditions. Vol 46/Nº.RR-10; 1997.
- **Cura E, Wendel S.** Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Organización Panamericana de la Salud; 1994.
- **Faine S.** Guidelines for the control of leptospirosis Geneva: WHO; 1982. WHO off-set publication Nº 67.
- **Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** Leptospira and leptospirosis. 2 a ed; MediSci. Melbourne, Australia; 2000.
- **Hartskeerl R, Smits H, Korver H, Terpstra W.** International course on laboratory methods for the diagnosis of Leptospirosis. Royal Tropical Institute Department of Biomedical Research. The Netherlands; 2001.
- **Herrer A, Licerias J.** Leptospirosis en el Perú II: Incidencia de la infección en las ratas (*Rattus nevergicus*) de la ciudad de Lima e identificación de la cepa infectante. *Rev Med Exp* 1960; 13: 85-108.
- **Licerias J.** Leptospirosis humana en las provincias de Lima y Callao. *Rev Med Per* 1973; 34: 27-34.
- **Licerias J.** Leptospirosis en San Martín, Perú. *Bol Of Sanit Panam* 1975; 74: 410-21.
- **Licerias J.** Leptospirosis en Tingo María, departamento de Huánuco, Perú. II Estudio en animales silvestres. *Bol Of Sanit Panam* 1981; 68: 297-306.
- **Macedo S, Cornide R, Cáceres I.** Cepas endémicas de *Leptospiras* patógenas en América Latina y en el Caribe. *Rev Cub Med Trop* 1983; 35: 186-92.
- **Merien F, Amouriaux A, Perolat P, Baranton G, Girons SJ.** Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30: 2219-24.
- **Milner AR, Jackson KB, Woodruff K, Smart IJ.** Enzyme linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infection caused by *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 539-42.
- **Romero EC, Caly CR, Yasuda PH.** The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1988; 40: 183-4.

- **Silva da MV, Camargo ED, Vaz AJ, Souza AMC, Veda M, Sakata EE.** Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe Ig M na leptospirose humana. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1988; 30: 95-100.
- **Silva da MV, Camargo ED.** Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe Ig A na leptospirose humana. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34: 239-42.
- **Sulzer C, Jhones W.** Leptospirosis. Methods in laboratory diagnosis. Publication N° 748275. Department of Health Education and Welfare. Washington DC; 1976.
- **Watt G, Alquiza LM, Padre LP, Tuazon ML, Laughlin LW.** The rapid diagnosis of Leptospirosis a prospective of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus specific microscopic agglutination test at different stages of illness. J Infect Dis 1988; 157: 840-2.
- **Winslow WE, Merry DJ, Pir MM, Devine PL.** Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of an immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol 1997; 35: 1938-42.

ANEXO A

CINÉTICA DE LA LEPTOSPIROSIS

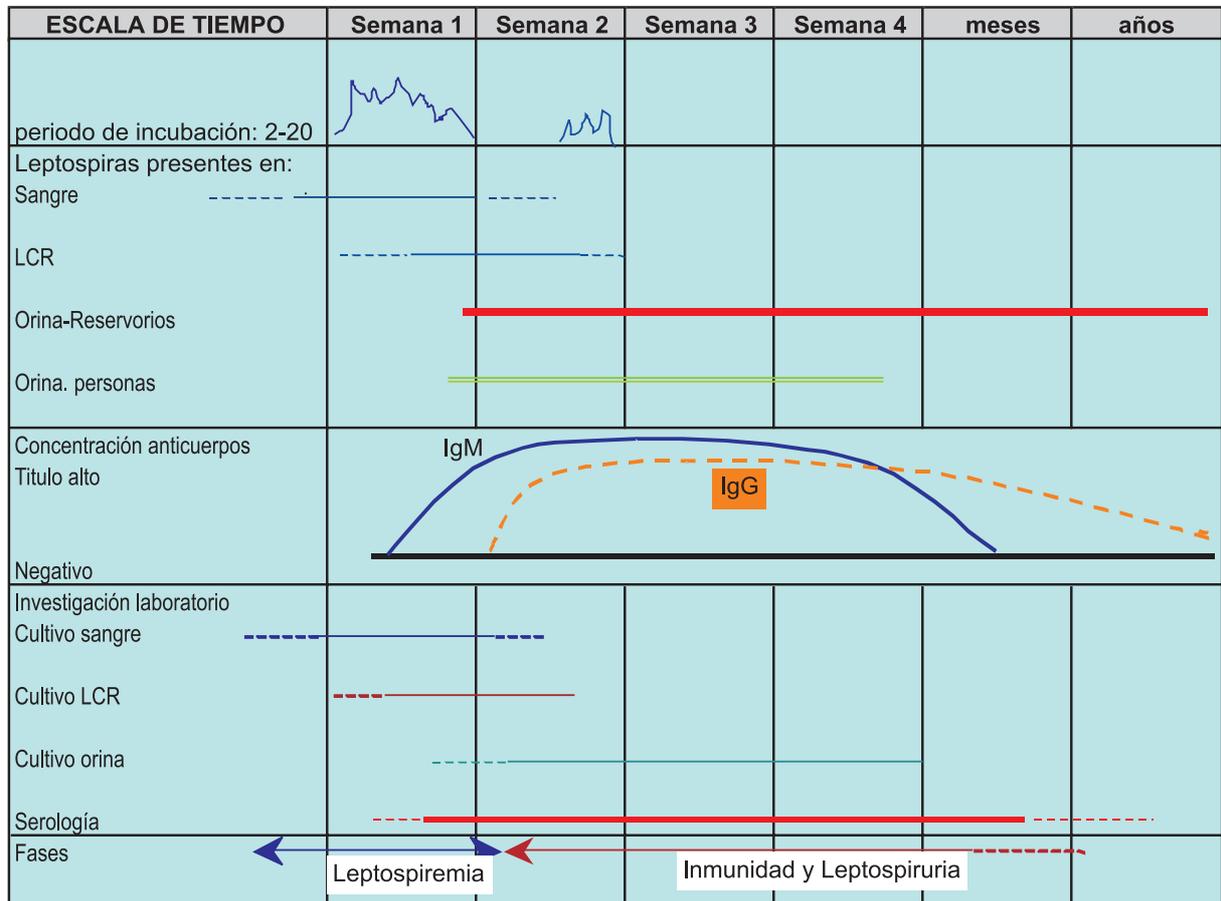


Figura A. Cinética de la enfermedad (Tomado del Manual de Leptospirosis. Royal Tropical Holanda)

ANEXO B

ESQUEMA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS HUMANA

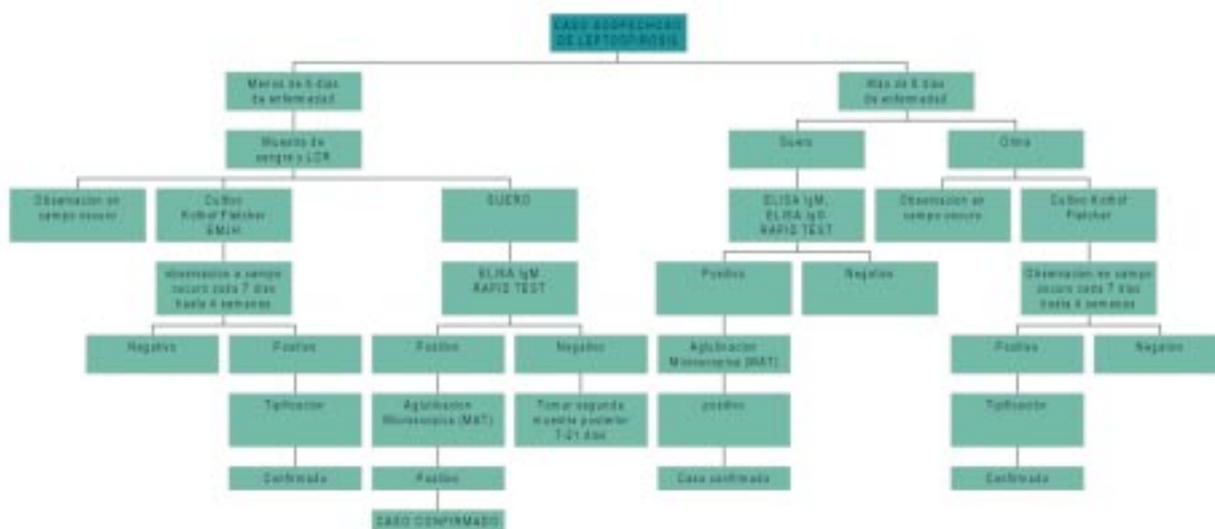


Figura B. Esquema para el diagnóstico de la leptospirosis

ANEXO C

MEDIOS DE CULTIVO

C1. MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO KORTHOFF MODIFICADO

Composición:

Peptona	1,00 g
Cloruro de sodio (NaCl)	1,40 g
Hidrógeno carbonato sódico (NaHCO ₃)	0,02 g
Cloruro potásico (KCl)	0,04 g
Cloruro cálcico (CaCl ₂)	0,04 g
Agua destilada	900,00 mL

Buffer:

Dihidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	9,00 mL..... (9,072g/L)
Hidrógeno fosfato disódico hidratado (NaHPO ₄ ·2H ₂ O)	91,00 mL.... (11,866g/L)
	pH 7,3 ± 0,1

Preparación:

- Pesar individualmente cada uno de los ingredientes y colocarlos en un balón de 2L, agregar 900mL de agua destilada más 100 mL de buffer recién preparado o estéril conservado.
- Disolver y calentar brevemente.
- Una vez enfriado, medir el pH y llevarlo a 7,3 ± 0,1.
- Filtrar el medio a través de papel filtro Wattman N°4 por dos veces.
- Repartir 250 mL en balones de 500 mL de capacidad.
- Esterilizar en autoclave a 121°C/15 lb./15 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir 20 mL de suero de conejo inactivado a 56°C x 30 minutos para obtener una concentración final de 8% suero de conejo.
- Repartir 5mL. del medio en tubos de 18x150 con tapa rosca.
- Controlar la esterilidad a 37°C x 24 horas.
- Conservar a 4°C (hasta 3 meses).
- Agitar antes de usar.

C2. MEDIO DE CULTIVO SEMISÓLIDO FLETCHER

Composición:

Proteosa peptona	1,00 g
Cloruro de sodio (CLNa)	0,50 g
Agar	2,00 g
Buffer pH 7.8 (*)	100,00 mL
Agua destilada	900,00 mL
Extracto de carne	0,20 gr
	pH 7,2±0,1

Buffer pH 7,8:

Dihidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	9 mL.....(9,072gr/L).
Hidrógeno fosfato disódico hidratado (NaHPO ₄ ·2H ₂ O)	91 mL.....(11,866gr/L)
	pH 7,8±0,1

Preparación:

- Pesar por separado cada uno de los componentes del medio y colocarlos en un balón
- Adicionar 900 mL de agua destilada, disolver cada uno de los componentes hasta la completa disolución y adicionar 100 mL de buffer, calentar mediante hervor.
- Dejar enfriar a 45°C-50°C.
- Ajustar el pH a 7,2 y repartir 100 mL del medio en balones de 250 mL de capacidad.
- Esterilizar a 121°C / 15 minutos.
- Al medio tibio o frío, agregar suero de conejo estéril e inactivado (56°C/30 minutos) a una concentración final de 8-10%
- Repartir 5 mL. del medio en tubos de 16x150 con tapa rosca.
- Controlar la esterilidad del medio en estufa a 37°C por 24 horas.
- Conservar en refrigeración.

C3. MEDIO TWEEN 80- ALBUMIN BOVINE SERUM (MEDIO EMJH)

SOLUCIONES STOCK:

Preparar cada stock en 100 ml. de agua tridestilada

NH ₄ Cl _____	25,00 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O _____	0,40 g
MgCL ₂ ·6H ₂ O _____	1,50 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O _____	1,50 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O _____	0,50 g
piruvate sodium _____	10,00 g
glycerol _____	10,00 g
tween 80 _____	10,00 g
thiamine .hcl _____	0,50 g
cyanocobalamina _____	0,02 g

No es necesario ajustar el pH

SUPLEMENTO DE ALBUMINA:

Disolver el BSA en 50 mL
BSA (powder) _____ 10,00 g

Agregar de cada stock:

CaCl ₂ _____	1,00 mL
MgCl ₂ _____	1,00 mL
ZnSO ₄ _____	1,00 mL
FeSO ₄ _____	10,00 mL
Cyanocobalamina _____	1,00 mL
tween 80 _____	12,50 mL

Completar a 100 mL y ajustar el pH a 7,4 y esterilizar por filtración.

MEDIO BASAL: En 996 mL de agua destilada

Na ₂ HPO ₄ (anhydrous) _____	1,00 g
KH ₂ PO ₄ (anhydrous) _____	0,30 g
Na Cl _____	1,00 g

Agregar las siguientes soluciones stock:

NH ₄ CL _____	1,00 mL
Thiamine _____	1,00 mL
Piruvate _____	1,00 mL
Glycerol _____	1,00 mL

Ajustar el pH A 7,4 y autoclar.

MEDIO LÍQUIDO : Mezclar 1 volumen de suplemento albúmina y 9 volúmenes de medio basal.

ANEXO D

COLORACIONES

TINCIÓN NEGATIVA CON ROJO DE CONGO

D1. REACTIVOS

D1.1.	Solución acuosa de rojo de Congo	2%
	Agua destilada	100,00 mL
	Rojo de Congo	2,00 gr

D1.2.	Alcohol etílico 95%	99,00 mL
	Acido clorhídrico concentrado	1,00 mL

D2. PROCEDIMIENTOS

D2.1 Colocar sobre una lámina porta-objetos una solución acuosa de rojo de Congo al 2% y sobre ella una gota de cultivo de *Leptospiras*, extenderla suavemente y dejar secar.

D2.2 Cubrir la lámina con la mezcla alcohol etílico-ácido clorhídrico, dejar secar.

D2.3 Observar en microscopio de campo claro, con objetivo de inmersión.

D2.4 Las *Leptospiras* aparecen incoloras sobre un fondo azul oscuro.

D3. BUFFER FOSFATO SALINO(PBS)

NaCl _____	8,00 g
Na ₂ HPO ₄ _____	0,91 g
KH ₂ PO ₄ _____	0,14 g
KCl _____	0,20 g
H ₂ O d _____	1 000 mL

pH = 7.2

***** autoclavar a 121° C, 15 libras de presión

D4. SOLUCIONES DE LAVADO

NaCl _____	8,00 g
Na ₂ HPO ₄ _____	0,91 g
KH ₂ PO ₄ _____	0,14 g
KCl _____	0,20 g
H ₂ O d _____	1 000,00 mL

pH = 7,4

Agregar al PBS previamente esterilizado:
500 μ l _____ Tween 20

D5. SOLUCIÓN DE INCUBACIÓN

NaCl _____	8,00 g
Na ₂ HPO ₄ _____	0,91 g
KH ₂ PO ₄ _____	0,14 g
KCl _____	0,20 g
H ₂ O d _____	1 000,00 mL

pH = 7.4

Agregar al PBS previamente esterilizado :
500 μ l _____ Tween 20

De esta solución tomar 100 mL y agregarle 2,0 g. de BSA

ARTES Y DISEÑOS LASER S.R.Ltda.
Teodoro Cárdenas 124 - B
Santa Beatriz
Lima 01 - Perú
Telf.: 470-6172 Telefax: 472-4525

3,000 ejemplares
Julio del 2002