

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

“PEDRO KOURI”

DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

Título: Carga bacteriana y daños de la infección por leptospiras en órganos dianas de cubanos fallecidos 2018-2019



**Trabajo para optar por el título de
Médico Especialista de Primer Grado en Microbiología**

Autora: Dra. Yolenni Castillo Piña

Residente de Microbiología 3er año

Especialista de 1er Grado en MGI

La Habana

2018

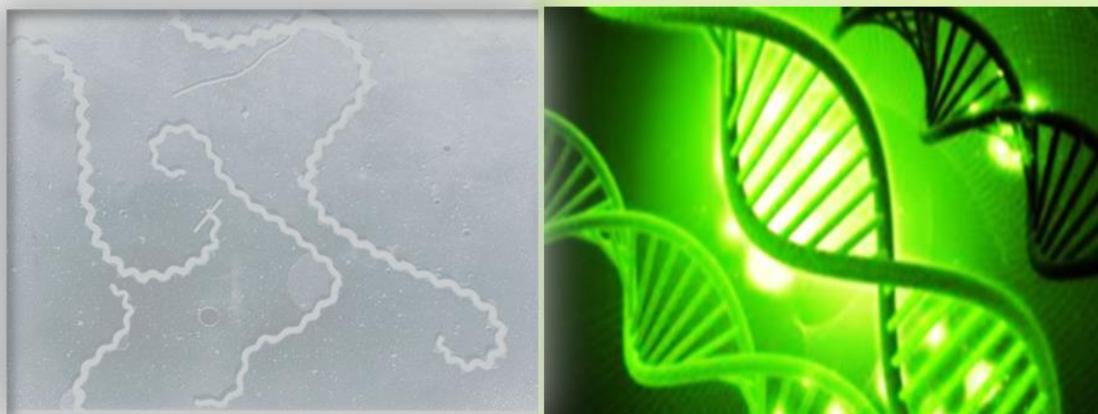
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL



PEDRO KOURÍ

DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

Título: Carga bacteriana y daños de la infección por leptospiras en órganos dianas de cubanos fallecidos 2018-2019



**Trabajo para optar por el título de
Médico Especialista de Primer Grado en Microbiología**

Autora: Dra. Yolenni Castillo Piña

Tutor: Lic. Islay Rodríguez González, Dr.C

Asesor: Dra. Jennys Peraza Bordao, MC

Lic. Angel A. Noda Ramos, Dr.C

La Habana

2018

Frase inspiradora

“ La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”.

Thomas Chalmers

Dedicatoria

A mi Padres

Porque siempre supieron mostrarme el camino correcto.

Por sus enseñanzas a pesar de los años.

A mis hijos y esposo

Porque siempre han creído en mí.

Por ser el más importante de los capítulos de esta tesis.

Por estar presentes en cada una de mis historias.



Agradecimientos

Para Dios por haberme dado sabiduría, fortaleza, salud, coraje y no dejarme sola en los momentos difíciles y haberme permitido concluir esta etapa en mi vida.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a toda mi familia, gracias por su amor, apoyo, comprensión incondicional, a los sacrificios que tuvieron que hacer y a la paciencia que me demostraron todos estos años.

Gracias a mi esposo, quien ha sido incondicional, en el que he podido confiar y apoyarme para seguir adelante.

Gracias infinitas para la Dra. María de los Ángeles sin ella fuera imposible alcanzar este sueño.

Agradezco sinceramente y de todo corazón a mi tutor de tesis el profesor Islay Rodríguez por darme la oportunidad de ser partícipe en uno de sus proyectos, por el gran apoyo y paciencia que me brindó durante la realización de la tesis.

Gracias al profesor Angel, siempre dispuesto a transmitir sus conocimientos. Gracias a yudy y Lily por apoyarme siempre.

A mis compañeras de residencia gracias. Al gran amigo Lázaro y a Héctor por sus consejos y su sincera sonrisa ,gracias a la lic. Delmis por su apoyo incondicional y su trabajo tan valioso.

Agradecida siempre estaré de , yolaine, del profesor Eduardito, de la Profe Ana margarita Obregón, Profe Lilia M.Ortega.

Gracias a ledy, anita, marina, a la Dra. Jennys Peraza y al Dr Alexander integrantes del departamento de anatomía Patológica del IPK.

Agradezco a todas las personas que de una u otra forma siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

Al Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, pilar de conocimientos, principios y aprendizaje, en especial al Departamento de Docencia y a todos los profesores al contribuir en mi formación.

Resumen

Se realizó un estudio observacional de corte transversal descriptivo durante el período enero/2018 a junio/2019, utilizando PCR en tiempo real cuantitativa.

En el presente trabajo se comparó la carga bacteriana de infección por leptospiras patógenas detectadas en hígado, riñón y pulmón de cubanos fallecidos por leptospirosis, se relacionaron variables clínicas de los fallecidos por leptospirosis con la positividad y la carga bacteriana en los órganos estudiados y se describieron los daños histopatológicos en muestras de hígado, riñón y pulmón infectados por leptospiras así como su relación con la carga bacteriana.

Fueron estudiadas 99 muestras de tejidos de pulmón, hígado y riñón de 33 fallecidos cubanos con sospechas de leptospirosis,

Al aplicar la PCR en tiempo real cuantitativa a los tejidos en estudio se obtuvo positividad en el 36%(12/33) de los fallecidos, según órganos, se obtuvo el 30% (10/33) en las muestras de riñón, seguida de pulmón e hígado con 21% (7/33) cada uno, no mostrando diferencias estadísticas significativas entre ellas.

Las cargas bacterianas oscilaron entre 0,67-1040 (geq/ μ L) y el órgano con mayor carga bacteriana resultó ser el Hígado. Entre los hallazgos histológicos encontrados a nivel del riñón se describió en el 85,7% de los fallecidos congestión severa, el 71,4% presentaban necrosis tubular aguda. A nivel pulmonar el 100% presentaron hemorragias a nivel del órgano y en el hígado el 100% de las muestras alteración en el patrón arquitectural.

Indice	páginas
I Introducción	1
II Revisión Bibliográficas	6
2.1 Definición y sinonimia	6
2.2 Reseña histórica	6
2.2.1 Antecedentes Históricos de la leptospirosis en el mundo	6
2.2.2 Antecedentes en cuba	7
2.3 Agente causal	8
2.4 Características generales	8
2.5 Taxonomía	11
2.6 Clasificación tradicional de las leptospirosis	11
2.7 Epidemiología de la leptospirosis	13
2.7.1 Factores de los que depende la supervivencia de leptospira en el ecosistema	13
2.7.2 Tipos de hospederos	13
2.7.2.1 Hospederos de mantenimiento	13
2.7.2.2 Hospederos accidentales	14
2.7.3 Formas de transmisión	14
2.7.4 Período de incubación	15
2.7.5 Inmunoprofilaxis	15
2.7.6 Quimioprofilaxis	15
2.8 Patogenia de la leptospirosis	16
2.8.1 Invasión y multiplicación bacteriana	16
2.8.2 Factores inflamatorios no específicos	18
2.8.3 Mecanismos inmunológicos	18
2.9 Manifestaciones clínicas	19
2.10 Leptospirosis en las Américas y el impacto de la leptospirosis severa	21

con hemorragia pulmonar (LSHP).	
2.11 Leptospirosis como diagnóstico diferencial	21
2.12 Hallazgos del laboratorio clínico	22
2.13 Diagnóstico microbiológico	22
2.14 Tratamiento	25
2.15 Prevención	25
III. Material y Métodos	27
3.1 Diseño de estudio	27
3.2 Universo y muestra	27
3.3 Métodos analíticos	27
3.3.1 PCR en tiempo real cuantitativa para la detección de <i>Leptospira interrogans sensu lato</i>	27
3.3.2 Preparación de la curva estándar	28
3.3.3 Procesamiento de las muestras de órganos	29
3.3.4 Extracción de ácidos nucleicos	29
3.3.5 PCR para la amplificación de un fragmento del gen que codifica la β -globina humana	29
3.3.6 Estimación de la carga bacteriana de infección por leptospiras patógenas en pulmón, riñón e hígado de humanos fallecidos por leptospirosis	30
3.3.7 Relación de variables clínicas con la positividad y carga bacteriana por órganos	30
3.3.8 Descripción de los daños histopatológicos en muestras de pulmón, riñón e hígado humanos infectados por leptospiras y su relación con la carga bacteriana	30
3.4 Análisis estadístico	31
3.5 Operacionalización de las variables	32
3.6 Consideraciones éticas	33
IV Resultados y discusión	35

V Conclusiones	55
VI Recomendaciones	56
VII Referencias Bibliográficas	57

I. Introducción

En la historia de la humanidad se describen numerosas enfermedades con una influencia negativa sobre la supervivencia humana. Dentro de ellas se debe mencionar a la leptospirosis; considerada una de las zoonosis de mayor repercusión internacional, capaz de provocar daños desde el punto de vista económico y social. Debido al aumento de su incidencia en el mundo, constituye una enfermedad reemergente, situación que la convierte en un problema de salud pública en los países desarrollados y en vías de desarrollo. (Dupouey et al., 2014) ubicándose en estos últimos entre las enfermedades con los mayores índices de morbilidad y mortalidad, debido a las condiciones socioeconómicas desfavorables existentes en esos países, los factores culturales, las carencias de estructuras sanitarias y una mayor exposición de las personas a los ambientes contaminados (Ko et al., 1999; Schneider M et al., 2013; Donaires, 2014). La infección en general se produce por un gran número de bacterias pertenecientes a la familia Leptospiraceae, del género *Leptospira*, las cuales miden de 5-15 μm de longitud y 0,1-0,2 μm de diámetro, con los extremos curvados, incluidas en el complejo patogénico *Leptospira interrogans* sensu lato (Adler y De la Peña, 2010). Es una enfermedad infectocontagiosa, aguda, sistémica que afecta a los humanos y a los animales caninos, bovinos, equinos, animales silvestres, entre otros, siendo el roedor es el hospedero más importante, desde el punto de vista ecológico se asocia en gran medida con el humano (Adler & De la Peña Moctezuma, 2010; García et al., 2015). Las primeras reseñas históricas sobre la leptospirosis, corresponden de la época de la invasión napoleónica a Egipto (Osés et al., 2010) y de la guerra civil americana (Ratram 1994; Rodríguez et al., 2000), identificándose en el siglo XIX, desde esa época se le reconoce su relación con las guerras y los desequilibrios ecológicos. Louis Lanlouzy en 1883, fue el primero en describir la leptospirosis humana como una entidad clínica, tres años más tarde Adolf Weil, médico alemán, observa en trabajadores agrícolas de Heidelberg, una serie de síntomas y signos como fiebre, ictericia, hemorragia, insuficiencia hepática y renal (Abgueuen y Pichard, 2009). En 1888 se le denominó enfermedad de Weil, en honor al investigador que la caracterizó como una enfermedad grave de alta mortalidad (Rodríguez et al., 2000).

Esta infección se considera endémica en muchos países tropicales y subtropicales. En los últimos 20 años la leptospirosis humana se ha convertido en un verdadero problema de salud, presentándose por lo general en forma de casos esporádicos o asociados a brotes epidémicos (Chin J, 2005) debido a que origina presentaciones clínicas poco frecuentes y en ocasiones cuadros letales, con manifestaciones inaparentes e inespecíficas que pueden evolucionar hacia una forma clínica fulminante y fatal (CDC 2018).

Se estima más de un millón de casos anuales en el mundo, localizados en las regiones tropicales y subtropicales, con una marcada incidencia en el Sureste de Asia, Centro y Sur América (Smolinski et al., 2003; Benacer et al., 2016). Es considerada una enfermedad ocupacional; sin embargo, el fenómeno de la globalización, los cambios climáticos, las migraciones de los animales y las personas hacia nuevas zonas, propician que la leptospirosis se considere en la actualidad como un problema latente para cualquier población (Bharti AR et al., 2003; Torres, 2016). La transmisión indirecta (forma más frecuente), ocurre por medio de la sangre y orinas de animales infectados y enfermos que contaminan los suelos, el agua y los alimentos; permitiendo la entrada de las bacterias por piel y mucosas a través de micro lesiones existentes a esos niveles.

Según la organización mundial de la salud (OMS), esta enfermedad puede representar hasta el 20 % de las enfermedades febriles de origen desconocido. En el caso de las Américas, la incidencia es de 12,5 por cada 100 000 habitantes, siendo importante diferenciarla de otras enfermedades endémicas en los países tropicales, debido a la variedad de signos clínicos que presenta puede confundirse con otras enfermedades como la influenza y las fiebres hemorrágicas virales (WHO, 2011). Se estima una incidencia de 5,1 casos cada 100 000 habitantes en las áreas endémicas y 14 casos cada 100 000 habitantes en las epidemias, la prevalencia en los humanos oscila entre 4-100/100 000 habitantes, con un número de enfermos que fluctúa entre 300 000 y 500 000 casos notificados al año, es más frecuente en los hombres, a pesar de no ser una enfermedad de declaración obligatoria para muchos países (Martínez et al., 2004; Alan R, 2011; Torres M, 2018). Orientado por la Sociedad Internacional de Leptospirosis, Brasil notifica cifras de morbilidad de leptospirosis que alcanzan 3 838 casos confirmados por año; sin embargo, en Guatemala, Chile, Guyana, el

Salvador y Nicaragua, el número de casos es menor, aunque en los países como Surinam y Panamá no está definido ese indicador. Este comportamiento demuestra que para la región latinoamericana, la leptospirosis puede considerarse una enfermedad olvidada o desatendida (Cruz et al., 2009, OMS).

Cuba desde el año 1981, dispone de un programa Nacional de Prevención y Control de Leptospirosis Humana, perfeccionado a partir de la ocurrencia de varios brotes epidémicos (Rodríguez et al., 2007; Avila, 2010). A pesar del empeño en disminuir el número de casos existen varios factores que propician el aumento de la leptospirosis, debido al fomento del perfil agropecuario en la población, la alta infestación por roedores, el deficiente tratamiento de los residuales pecuarios y la limitada disponibilidad de los medios individuales de protección, los que unidos a las características tropicales del país (clima, red fluvial, natural y artificial) favorecen la propagación de esta enfermedad en el hombre y los animales, además de los factores que condicionan un comportamiento endemoepidémico de la leptospirosis en el país (Rodríguez et al., 2000; Martínez et al., 2004), que afecta sobre todo a las provincias del centro y oriente de Cuba (Verdasquera et al., 2011). Nuestro país notifica alrededor de 500 casos por año con un ligero incremento de la mortalidad y letalidad asociada con esta enfermedad (Verdasquera et al., 2009; Verdasquera et al., 2010). En la actualidad se mantiene una tasa de mortalidad de 0,3 por 100 000 habitantes (Anuario Estadístico 2018). Los antecedentes descritos demuestran que esta enfermedad representa un problema importante de salud, que persiste a través del tiempo, lo que justifica la importancia de un diagnóstico precoz y tratamiento oportuno en todos los pacientes con una sospecha clínica, epidemiológica de leptospirosis.

En los últimos 15 años esta enfermedad se asocia con el síndrome hemorrágico pulmonar, una afección que se observa en los países latinoamericanos y el continente asiático, regiones donde provoca una mortalidad elevada (Ko et al., 2009; Adler y De la Peña, 2010). Ese síndrome se caracteriza, por hemoptisis, disminución de la hemoglobina y/o hematocrito e infiltrados pulmonares bilaterales en la radiografía de tórax que expresa la ocupación alveolar por sangre (Montero, 2012; Gómez J, 2008) con una tasa de mortalidad de más del 40 % de los casos (Assimakopoulos et al., 2012). Cuba no se encuentra ajeno a

esta situación, en el año 2008 se reportó ,en la provincia de Villa Clara una presentación de leptospirosis grave asociada con hemorragia pulmonar en edad pediátrica, los tres adolescentes evolucionaron al síndrome de distress respiratorio agudo, donde uno de ellos falleció a causa de disfunción múltiple de órgano(Santos LA et al.,2008).Se plantea que el desarrollo de los casos severos depende de tres factores fundamentales ; las condiciones epidemiológicas, la susceptibilidad de hospedero y la virulencia del agente patógeno (Badell et al., 2015).El

diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana es complejo, requiere de datos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos, siendo estos últimos imprescindibles en la confirmación del caso en estudio (Levett, 2001, Dassanayake DL et al., 2009, Loffler S et al., 2014), los cuales comprenden la realización de métodos bacteriológicos, serológicos y de biología molecular. En Cuba, desde 2008 se realiza el diagnóstico molecular de los fallecidos con sospecha de leptospirosis en el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNRL-IPK.) (Rodríguez et al., 2013). El estudio post-mortem mediante las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) a partir de los órganos de pacientes con la sospecha clínica de padecer una leptospirosis, muestra al pulmón como el tejido con una mayor positividad de infección (Rodríguez et al., 2013; Noda et al., 2014a; Noda et al., 2014b) comparado con el riñón e hígado; sin embargo, no existen estudios previos que comparen la carga bacteriana en los tejidos durante la infección natural, ya sea en los hospederos accidentales o portadores y su implicación en la presentación clínica de la enfermedad.

En el presente trabajo se pretende estimar la carga bacteriana de las leptospiras en órganos dianas como el pulmón, riñón e hígado de cubanos fallecidos por leptospirosis, así como los daños histopatológicos en los tejidos humanos y su relación con la carga bacteriana. Este trabajo contribuirá a un mejor conocimiento sobre la patogenia de la infección por leptospiras, dilucidando el papel del pulmón durante el proceso de infección-enfermedad.

Los resultados obtenidos permitirán fortalecer las capacidades humanas y diagnósticas del Instituto “Pedro Kouri”, así como las del Sistema Nacional de Salud, al ofrecer una información valiosa que ayudarán a tomar conductas terapéuticas oportunas frente a esta enfermedad de importancia en el país para evitar los casos letales. Todo ello proporcionará un documento que servirá como material de consulta y apoyo práctico.

Hipótesis

Las leptospiras patógenas se multiplican en el pulmón en cantidades similares o superiores a las del riñón e hígado, causando daños histopatológicos considerables que se traducen en manifestaciones respiratorias que conllevan a la muerte del paciente.

Objetivos

- ✚ Comparar la carga bacteriana de infección por leptospiras patógenas detectadas en hígado, riñón y pulmón de cubanos fallecidos por leptospirosis.
- ✚ Relacionar variables clínicas de los fallecidos por leptospirosis con la positividad y la carga bacteriana en los órganos estudiados.
- ✚ Describir los daños histopatológicos en muestras de hígado, riñón y pulmón infectados por leptospiras y su relación con la carga bacteriana.

II. Revisión bibliográfica

Definición y sinonimias

La leptospirosis recibe muchas denominaciones, entre ellas: enfermedad de Weil, leptospirosis icterohemorrágica, ictericia espiroquética hemorrágica, fiebre del ceno, enfermedad de los cortadores de caña, fiebre de los cañaverales, enfermedad de los arroceros, fiebre de los arrozales, fiebre canícola, fiebre otoñal, fiebre del día siete, fiebre del pantano, fiebre del barro, fiebre del bastón-cortador y enfermedad de los porqueros (Chin, 2001).

Reseña histórica

- Antecedentes históricos de la leptospirosis en el mundo

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

Las primeras reseñas históricas sobre la leptospirosis datan de la época de la invasión napoleónica a Egipto (Osés et al., 2010) y de la guerra civil americana (Ratram, 1994; Rodríguez et al., 2000). Sin embargo, la leptospirosis no se identifica hasta el siglo XIX y desde esa época se le reconoce su relación con las guerras y los desequilibrios ecológicos. Louis Landouzy, en 1883, es el primero en describir la leptospirosis humana como una entidad clínica distinta. Tres años más tarde, Adolf Weil, médico alemán, observa en trabajadores agrícolas de Heidelberg una serie de síntomas y signos como la fiebre, ictericia, hemorragia, insuficiencia hepática y renal (Abgueguen, 2009). En 1888 se le denomina como “enfermedad de Weil” en honor a tan destacado investigador, quien la caracteriza como una enfermedad grave de alta mortalidad (Rodríguez et al., 2000).

La primera observación de las *leptospiras* se realiza en cortes histológicos de riñón obtenidos de un paciente que fallece con la sospecha clínica de “fiebre

Amarilla”. Este descubrimiento científico se le atribuye a Stimson (1907) en Nueva Orleans, quién en ese momento la denomina como *Spirochaeta interrogans*, por su parecido morfológico con el signo de interrogación (Faine et al., 1999). En 1915, se describe en Japón, el aislamiento de este microorganismo en los humanos. Al mismo tiempo, un equipo de médicos de Alemania (Dres. Uhlenhuth, Fromme, Hubener y Reiter), investigan un grupo de soldados alemanes que presentaban un cuadro clínico compatible con la enfermedad de Weil y confirman la presencia de espiroquetas en las muestras de sangre obtenidas de esos soldados (Levett, 2001).

En 1917, Hideyo Noguchi aísla al agente causal en su medio propio y sugiere dar a este género el nombre de *Leptospira*, por tener una imagen de espirales finas (Levett, 2001). En el mismo año, Ido y sus colaboradores lo identifican en los riñones de las ratas, luego muchos investigadores descubren a los diferentes serogrupos y serovares (Chamizo et al., 1996, Rodríguez et al., 2000). En 1918, se aísla el serovar Hebdomadis en un paciente anictérico que mantiene fiebre durante siete días, mientras que, unos años después, en 1925, se identifica *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis en Indonesia (Chamizo et al., 1996).

- Antecedentes históricos en Cuba

La forma clínica icterohemorrágica provocada por la infección leptospirémica se conoce desde la segunda mitad del siglo XVIII y los médicos sabían diferenciarla de la fiebre amarilla (Chamizo et al., 1996; Rodríguez et al., 2000; Mir et al., 2010). En 1868, el doctor Francisco Navarro y Valdés, expone sus primeras referencias de esta enfermedad en su tesis doctoral y refiere que: "La fiebre biliosa de los países cálidos no es la fiebre amarilla, sino una enfermedad icterohemorrágica precedida por fiebre, que es padecida por individuos radicados en lugares pantanosos y que aparece en ciertas épocas del año" (Chamizo et al., 1996; Rodríguez et al., 2000; Mir et al., 2010).

En 1889, el doctor Emilio Martínez y Martínez en su tesis de doctorado "Curabilidad del íctero grave primitivo", habla de esta entidad nosológica y presenta 58 casos con el cuadro icterohemorrágico y la insuficiencia renal característica, destaca la forma epidémica y su frecuencia en los países

tropicales; la señala como una enfermedad infecciosa y sospecha su fisiopatología (Chamizo et al., 1996; Rodríguez et al., 2000; Mir et al., 2010).

En 1921 los doctores Juan Guiteras, Mario García Lebreo y William Hoffmann informan a la Academia de Ciencias Médicas, Físicas y Naturales de La Habana, un brote epidémico de la enfermedad de Weil entre los constructores del alcantarillado de La Habana (Chamizo et al., 1996; Rodríguez et al., 2000; Mir et al., 2010). Los doctores Reynaldo Márquez Camacho, Emilio Soler Montes y Arturo Curbelo Hernández, presentan en 1945 el primer caso confirmado de leptospirosis, cuyo diagnóstico se comprueba por técnicas bacteriológicas (Rodríguez et al., 2000). Posteriormente, en 1956, los doctores Curbelo y Viola Márquez Biscay, publican una recopilación de 177 casos con el diagnóstico clínico de la llamada enfermedad de Weil, notificados en La Habana entre 1945 y 1955, de estos, 45 se confirman por técnicas serológicas que utilizan antígenos de *Leptospira interrogans* serovar Canicola y *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (Rodríguez et al., 2000; Mir et al., 2010). En 1972, se recibe en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) una asesoría por parte del profesor E. Kmety, consultor de la OMS, con el objetivo de establecer las técnicas de laboratorio necesarias para el cultivo de leptospiras y los estudios serológicos. A partir de ese momento se investiga este microorganismo en diferentes especies de animales (perros, ratones blancos, ratas silvestres, mangostas, murciélagos), identificándose diversos aislamientos (Rodríguez et al., 2000; Mir et al., 2010).

Agente causal

- Características generales

El agente causal de la leptospirosis se identifica con el nombre de *Leptospira spp*, una espiroqueta de forma helicoidal y móvil (Adler y De la Peña, 2010). Son microorganismos constituidos por un cuerpo citoplasmático y un axostilo que se disponen en forma espiral. Una membrana envolvente recubre ambas estructuras, poseen dos filamentos axiales (flagelos periplasmáticos) con inserciones polares que se localizan en el espacio periplasmático y son las estructuras responsables de sus movimientos desordenados, variados de (traslación- rotación), dada la compleja estructura de sus proteínas flagelares y la

mayoría tienen la capacidad de formar en uno o sus dos extremos, ganchos típicos, que les da la forma de “S”, “C” o bastón (Trueba et al., 1992; Haake D.A et al., 2000; Haake D.A., 2000), la vaina flagelar y el centro están constituidas por las proteínas FlaA y FlaB, respectivamente, aunque la microscopía electrónica muestra una mutante FlaB deficiente de endoflagelo y sin movilidad (Evangelista y Coburn., 2010).

Las *Leptospiras* tienen una estructura típica de doble membrana; la membrana citoplasmática y la pared celular, ambas asociadas y recubiertas por una membrana externa (Cullen et al., 2004). Dentro de la membrana externa, el lipopolisacárido (LPS) constituye su antígeno principal, biomolécula con estructura y propiedades antigénicas semejantes al LPS descrito en las bacterias gramnegativas; no obstante, es relativamente no toxigénico en las células o animales, siendo 12 veces menos letal para los ratones que el LPS de *Escherichia coli* y es menos activo en las pruebas estándares para la actividad endotóxica, como la prueba de pirogenicidad en conejo, letalidad en ratón, reacción de Schwartzman y mitogenicidad de las células B (Werts et al., 2001; Que-Gewirth et al., 2004). Además del LPS, proteínas estructurales y funcionales forman parte de la membrana externa de estos microorganismos. Tres clases de proteínas de membrana externa (PME) se han identificado: 1) las lipoproteínas(LipL), la clase más abundante, que comprende LipL32, LipL41, LipL48, LipL36 y LipL21 y Qlp42; 2) la proteína de transmembrana OmpL1; 3) las proteínas periféricas como LipL45. También el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) que secreta GspD, se localiza en la membrana externa de las leptospiras y muestra sus propiedades antigénicas (Haake y Matsunaga, 2010). (Ver Figura 1)

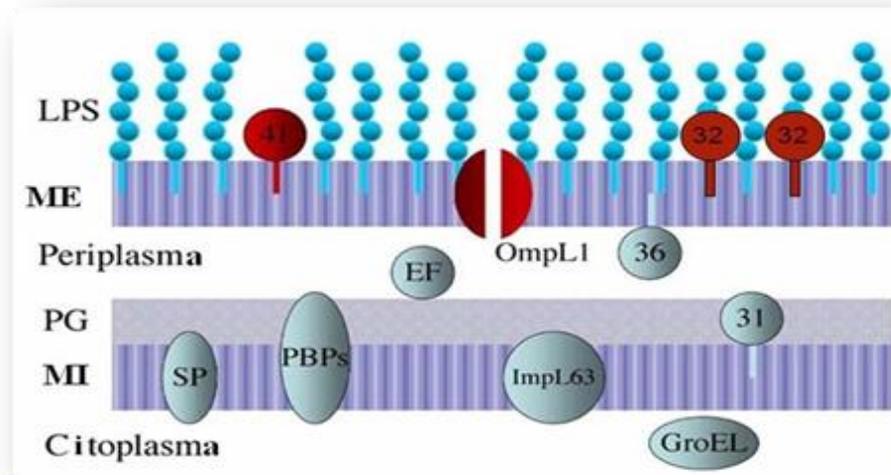


Figura 1. Arquitectura de la Membrana de Leptospira. LPS: Lipopolisacáridos, Proteínas: OmpL, LipL41, Lip32, LipL36, LipL31, Impl63, proteínas de unión a penicilina (PBPs), proteínas de shock térmico y GroEL.(Álvarez, 2013).

Las *leptospiras* solo pueden ser visibles por microscopia de campo oscuro o por microscopia de contraste de fase, pero no por microscopia de luz de campo brillante, mas pueden impregnarse por plata (Fontana-Tribondeau, Levaditi), por fluoresceína, peroxidasa conjugada más reactivos coloreados o por hibridización del ADN con reactivos coloreados de biotina-avidina (DAB) (Winn.,1998).

Se cultivan en medios artificiales, que deben contener 10 % de suero de conejo ó 1 % de albúmina bovina sérica y Tween 80, a un pH 6,8 - 7,4; el crecimiento óptimo es entre 28°C y 30°C. Para evitar la contaminación del medio se pueden adicionar antimicrobianos o intercalantes como el 5-fluorouracilo y sulfato de neomicina para hacerlo selectivo. Los medios más usados son el Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) con 1% BSA y Tween 80; así como Korthoff y Fletcher (Faine et al., 1999).

➤ Requerimientos para el crecimiento

Estos microorganismos utilizan los ácidos grasos de cadena larga (Tween) como fuente de carbono y las sales de amonio constituyen la fuente principal de nitrógeno. No aprovechan los aminoácidos o los carbohidratos como fuentes principales de energía. Las vitaminas B12 y la tiamina estimulan el crecimiento, además necesitan fósforo y algunos iones metálicos, las leptospira sobreviven semanas en el agua, en particular si esta tiene un pH alcalino.

Taxonomía

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

Aspectos taxonómicos

Clasificación tradicional de las leptospiras

Serovariedades

Debido a la diversidad de *leptospiras*, hay dos grandes métodos de clasificación. Las pequeñas variaciones en las cadenas polisacáridicas del lipopolisacárido de este microorganismo determinan la existencia de más de 200 serovares patógenos agrupados en 21 serogrupos, esto significa que, debido a su estructura antigénica se pueden dividir en serotipos y especies, la primera se determina mediante la prueba de absorción de aglutinación cruzada (CAAT) que define las similitudes y diferencias antigénicas (Velázquez Z, 2014). El género *Leptospira* incluye dos especies tipos: *Leptospira interrogans* sensu lato que comprende a todas las cepas patógenas para el hombre y los animales, mientras que la otra especie tipo, *Leptospira biflexa* sensu lato abarca las cepas saprofitas o de vida libre, aisladas del medio ambiente (Levett, 2001; Toshiyuki et al., 2006; Abgueuen., 2009).

➤ Clasificación genotípica

El empleo de las técnicas moleculares y el incremento del uso de la información genómica redundan en que el género *Leptospira* es objeto de una reorganización en las últimas décadas. Existen 21 genomoespecies nueve patógenas: *L. alexanderi*; *L. weilii*; *L. borgpetersenii*; *L. santarosai*; *L. kmetyi*; *L. alstonii*; *L. interrogans*; *L. kirschneri*; *L. noguchii*; seis intermedias: *L. licerasiae*; *L. wolffii*; *L. fainei*; *L. inadai*; *L. broomii*; *L. idonii*; y una cifra similar de no patógenas: *L. vanthieli*; *L. biflexa*; *L. wolbachii*; *L. terpstrae*; *L. meyeri*; *L. yanagawae* (Levett PN., 2015).

Está basada en la homología del ADN, definida en 70 % de homología y 5 % de divergencia.

➤ Características genéticas

El genoma de las leptospiras está distribuido en cromosomas circulares, uno grande, el cromosoma I y otro pequeño, el cromosoma II; con un rango de longitud aproximado entre 3500-4300 kb y 300-350 kb, respectivamente (Bulach et al., 2006; Picardeau et al., 2008). Se sugiere que los genes presentes en las especies patógenas, ya sea en *L. interrogans* o *L. borgpetersenii*, pueden codificar proteínas asociadas con la virulencia; sin embargo, se desconoce la función en el 62,4 % de ellos (Nascimento et al., 2004; Picardeau et al., 2008;).

➤ Factores de virulencia

El primer factor genético de virulencia formado es el gen de la lipoproteína de superficie Loa 22, conservado en las leptospiras patógenas y expresado en la fase aguda de la enfermedad. Se detectan cinco genes codificadores de esfingomielinasas, entre ellos el gen sphA y sphH, que codifica la esfingomielinasa C y la SphH, respectivamente, las cuales tienen función de lisis celular de los eritrocitos y contribuyen al daño del endotelio de pequeños vasos (Narayanavar et al., 2012). Entre los factores putativos de colonización del tejido del hospedero están las adhesinas; están identificados los genes lig (lig A y lig B) que codifican proteínas de superficie con dominios parecidos a las inmunoglobulinas, las cuales se unen a la elastina, tropoelastina, laminina y fibronectina (Choy et al., 2007).

Genes que codifican a las proteínas de membrana parecidas a la endostatina humana (proteínas de la familia Len) se unen a la laminina, el fibrinógeno y la fibronectina (Stevenson et al., 2007) y el gen lipL32, que codifica la lipoproteína LipL32, de 32 kDa, considerada de superficie pero ubicada en la subsuperficie (Pinne M., 2013); esta lipoproteína está conservada en las leptospiras patógenas, expresada durante la infección humana, es la proteína más abundante en las leptospiras con un estimado de 38 000 copias por célula (Malmstrom et al., 2009), se encuentra altamente conservada en las especies patógenas y ausente en especies saprófitas (Murray, 2013). Esta importante PME se une a colágenos (I, IV y V), plasminógeno y a laminina (Carvalho et al., 2009; Vieira et al., 2010). Las lipoproteínas son el mayor componente de la membrana externa de las leptospiras, la cual es rica en lipopolisacáridos (LPS) (Haake, 2015).

Epidemiología de la leptospirosis

Factores de los que depende la supervivencia de leptospiras en el ecosistema.

La supervivencia de las leptospiras en el ecosistema depende de las variaciones del pH en el suelo y de las condiciones ambientales, ya sea la temperatura o la humedad relativa (Bernal et al., 2002). Estas bacterias son muy sensibles a la desecación, así como a la luz solar directa, al pH ácido y alcalino, un pH inferior a 6 o mayor que 8, tiene un carácter inhibitorio sobre este microorganismo, son destruidas igualmente con una temperatura menor o igual a 13⁰C o mayor o igual a 35 ⁰C (Levett, 2001; Sandow y Ramírez, 2005). Pueden vivir hasta 183 días en los suelos con una humedad alta, permanecen viables durante 30 minutos en suelos secos (Osés et al., 2010) y en condiciones naturales por algunas horas en la leche materna de los animales lactantes en fase septicémica (Ellis, 2008).

Durante los últimos años las condiciones ambientales que prevalecen en la mayoría de los países tropicales y subtropicales tales como las lluvias abundantes, el desborde de las aguas residuales durante las inundaciones, los suelos no ácidos y húmedos, así como las altas temperaturas, se consideran factores que favorecen la transmisión de esta enfermedad.

Tipos de hospederos

En el caso específico de la leptospirosis se describen los hospederos de mantenimiento y los accidentales (Oliveira et al., 2009), que aunque desde el punto de vista teórico a veces no se corresponden con los conceptos establecidos al respecto, ayudan a comprender la complejidad en la transmisión de esta zoonosis.

Hospederos de mantenimiento

Es aquel animal que asegura la perpetuación de una población determinada de microorganismos sin la intervención de ningún hospedero accidental (Toledo et al., 2005). En el caso de la leptospirosis, los hospederos de mantenimiento se caracterizan por tener una gran receptividad a la infección por el serovar frente al que se mantiene como hospedero (la dosis infectiva es menor), relativa baja patogenicidad del microorganismo en el hospedero, la presencia de infección

renal con leptospiuria prolongada, una infección crónica y una transmisión eficaz de la infección a los animales de la misma especie por contacto directo (Kokudo et al.,2009).

Hospederos accidentales

Cualquier mamífero puede ser, potencialmente, un hospedero accidental de leptospiras. En ellos la transmisión es intraespecie y esporádica, tienen signos de forma aguda grave (hepatitis, crisis hemolítica), la duración de la leptospiuria se extiende por semanas y se detecta un bajo porcentaje de animales seropositivos (Kokudo et al., 2009).

Formas de transmisión

La leptospirosis puede transmitirse por vía directa e indirecta (Chin, 2005; Zunino, 2007; Mir, 2010).

- ❖ Vía directa: es la menos frecuente. Se produce a través del contacto con los productos del animal, por el coito (poco fundamentada) y por la vía transplacentaria; esta última da lugar a abortos, partos prematuros, raras veces conduce a formas congénitas de la enfermedad y es casi exclusiva de los animales (Chin, 2005; Zunino y Pizarro, 2007; Mir, 2010).
- ❖ Vía indirecta: ocurre a través de la sangre y la orina de los animales infectados y los enfermos que contaminan los suelos, el agua y los alimentos. Las bacterias penetran por las mucosas intactas como la conjuntival, oral y nasal a través de la inhalación de gotas o aerosoles de fluidos que contengan leptospiras o por lesiones de la piel (Chin, 2005; Zunino y Pizarro, 2007; Mir, 2010).

La transmisión indirecta, sobre todo por vía hídrica, es la más importante por constituir el mecanismo más frecuente y el que determina las características epidemiológicas de la enfermedad (CDC, 2018).

Las enfermedades zoonóticas como la leptospirosis tienen una diversa gama de reservorios, tanto de naturaleza doméstica como agropecuaria por ejemplo:perros,gatos,conejos,mangostas,zorros,erizos,vacas,cerdos,caballos,ovejas,ratas,ratones y otros(Chin, 2001; Adler y De La Peña, 2010).

Período de incubación

El periodo de incubación de la leptospirosis es variable y se describen diferentes intervalos de tiempo. Por lo general oscila entre los 2 y 30 días posteriores a la infección (Chin, 2005), con un término medio de entre 10 y 14 días, en dependencia de la especie animal, el serovar infectante, la virulencia del germen y la inmunidad del hospedero (La Roque et al., 2005).

Inmunoprofilaxis

La inmunoprofilaxis constituye una de las medidas más efectivas para el control de las enfermedades infecciosas. En Cuba desde el año 1983 se establece la inmunización contra la leptospirosis, a todos los trabajadores expuestos al riesgo de enfermar, con una vacuna de procedencia rusa integrada por gérmenes muertos por el calor, correspondientes a los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Griptotyphosa y Hebdomadis. En 1991 deja de aplicarse esta vacuna por dificultades en su suministro. Con el objetivo de continuar la inmunización a los grupos de riesgo, se desarrolla en el Instituto "Finlay", Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros, una vacuna adyuvada (vax-SPIRAL®). La misma contiene cepas autóctonas de gran importancia epidemiológica por ser las de mayor circulación (serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola y Pomona) (Martínez et al., 1998).

Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis es una de las medidas específicas más importantes que se aplica en el control de un brote de leptospirosis. El medicamento de elección es la doxiciclina (tabletas o cápsulas de 100 mg). Se administran 200 mg semanales, hasta una semana después de la exposición, por un lapso de tiempo no mayor de seis semanas. En personas expuestas al riesgo permanente debe valorarse la inmunización, criadores de animales, agricultores, pescadores de ríos, jardineros, trabajadores de alcantarillados, empleados de mataderos, mineros, poceros (OMS, 2003; Programa Nacional de prevención y control de la leptospirosis humana, 1997).

En los niños menores de 12 años y con un posible riesgo de enfermar no debe emplearse la doxiciclina por las contraindicaciones de este medicamento. Debe

valorarse el uso de la amoxicilina a una dosis de 40 mg/kg/día dividido en tres subdosis durante siete días (Céspedes M, 2005).

Patogenia

La leptospirosis se presenta en el humano como una enfermedad sistémica, con afectación de prácticamente todos los órganos y sistemas de la economía, pudiendo producir disfunción orgánica múltiple, causa frecuente de muerte en la enfermedad.(Zunino E, 2007; Kumar , 2009 ; García, 2009).

Aún no están bien definidos los mecanismos patogénicos por los cuales las leptospiras producen enfermedad (Lee et al., 2000; Levett, 2001). Recientemente se ha planteado que los pacientes con leptospirosis severa experimentan una tormenta de citoquinas caracterizadas por altos niveles de interleucina(IL), IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF) alfa e IL-10, la presencia del alelo HLA DQ6 muestra elevado riesgo de enfermar, sugiriendo un alto nivel de estimulación linfocitaria por un súper antígeno leptospiral.(Haake DA, Levett PN., 2015). Tres mecanismos se invocan en la patogénesis de la leptospirosis humana, que suman sus efectos de invasión y multiplicación bacteriana, los factores inflamatorios no específicos y los mecanismos inmunológicos, expuestos a continuación:

➤ Invasión y multiplicación bacteriana

Después de su entrada al organismo a través de la piel erosionada o las mucosas sanas (nasal, conjuntival, oral o tonsilar), los microorganismos resisten los mecanismos innatos de la defensa inmune, se multiplican en el torrente sanguíneo, invaden los órganos y sistemas de la economía, lo que explica su carácter sistémico. La leptospiremia se mantiene entre los 3 y 10 días, por lo que pueden aislarse en la sangre durante esta etapa. Por medio de la respuesta inmune se logra la opsonización, la fagocitosis y eliminación de los gérmenes por el sistema retículo endotelial; debido a esta respuesta inmune, el organismo puede eliminar del torrente circulatorio a las leptospiras, pero estas se localizan en diferentes órganos, como la cámara anterior del ojo, el cerebro, las meninges, el hígado, los riñones y el corazón (García, 2009, Bertherat et al., 2014). Durante su invasión y multiplicación, las leptospiras producen daño celular, no solo por el

efecto mecánico, sino por la producción de sustancias, como el factor citotóxico, que produce lesión del endotelio capilar. Esta proteína citotóxica se halla en los serovares Pomona y Copenhageni (García, 2009; Zunino & Pizarro, 2007). Se producen además enzimas hemolíticas, como las fosfolipasas y la esfingomielinasa C, que ocasionan hemólisis al afectar la fosfatidiletanolamina y esfingomielina de la membrana del hematíe. Se demuestran hemolisinas del tipo esfingomielinasa en los serovares Ballum, Hardjo, Pomona y Tarassovi. Las especies virulentas exhiben quimiotaxis hacia la hemoglobina (García.,2009; Zunino & Pizarro., 2007).

En el endotelio vascular, la referida proteína citotóxica ocasiona extravasación de sangre, emigración de leptospira a los tejidos, anoxia local relativa, generación de radicales libres de oxígeno y daño isquémico, con el consecuente depósito de inmunocomplejos circulantes, los que unidos al complemento causan lesión endotelial (Ortega y Verdasquera, 2012).

En el riñón las leptospiras, por vía sanguínea, llegan al glomérulo y de ahí se diseminan al intersticio, donde producen nefritis intersticial y a los túbulos renales, se adhieren y asocian de manera estrecha al borde luminal de las células tubulares proximales, hasta que se eliminan por la orina. Los daños glomerulares mínimos observados por microscopía electrónica ocasionan la proteinuria (García, 2009). La inflamación aguda en el riñón se asocia con necrosis tubular aguda y nefritis intersticial (Bertherat et al., 2014).

La lesión de túbulos renales proximales es la lesión fisiopatológica primaria en la leptospirosis aguda, con incremento en los túbulos distales de la excreción de potasio, la consiguiente hipopotasemia y la poliuria, que contribuyen a la astenia marcada que se presenta en un número elevado de pacientes (García, 2009; Bertherat et al., 2014). La insuficiencia renal aguda es una importante causa de muerte, en su patogénesis se invoca la lesión enzimática de las leptospiras, las alteraciones de la perfusión renal y la rhabdomiólisis como factor adicional (García., 2009; Carvajal et al., 2010). En el pulmón, los hallazgos de los pacientes con leptospirosis son la hemoptisis, distress respiratorio, la tos, dificultad para respirar y la hemorragia pulmonar. El síndrome de hemorragia pulmonar severo (SPHS) debida a la hemorragia alveolar extensa tiene una mortalidad que sobrepasa el 50 % (Martinelli, 2015) más que un problema

pulmonar estricto, se suman otros factores de riesgo ocasionales como la hipopotasemia, la elevación de la creatinina sérica, el shock y alteración de la escala de Glassgow para el coma (Haake & Levett, 2015).

En el hígado, los hallazgos histopatológicos en los fallecidos se asocian con disrupción de la cohesión celular y necrosis celular periportal (Trevejo et al., 1998). La ictericia en la enfermedad es de origen hepatocelular por lesión de los hepatocitos y disrupción de las uniones intracelulares entre los hepatocitos (Trevejo et al., 1998). En el sistema nervioso central y periférico pueden presentarse manifestaciones, tanto en fase leptospirémica como inmune.

➤ **Factores inflamatorios no específicos**

Pueden observarse en otras enfermedades infecciosas, pero en la leptospirosis contribuyen a causar una disfunción orgánica (García, 2009; Farreras-Rozman, 2011). Entre ellos se encuentran:

- Hipovolemia: dada por una disminución de la ingestión de líquidos, un aumento de las pérdidas insensibles y un incremento de la permeabilidad capilar, causada por los mediadores químicos liberados durante la inflamación, se produce una fuga capilar y la poliuria dada por la lesión tubular distal renal referida (Longo et al., 2012).
- Hiperviscosidad plasmática: dada por la hipovolemia, lo que permite el aumento del fibrinógeno.
- Fenómenos de coagulación intravascular diseminada a bajo ruido, expresados por un aumento de productos de degradación del fibrinógeno (García, 2009; Longo et al., 2012).

Estos factores pueden conducir a éstasis capilar y anoxia hística, lo que implica un incremento de la permeabilidad, pérdida de líquidos, hemoconcentración y un aumento adicional de la viscosidad sanguínea, de esta forma se crea un círculo vicioso.

➤ **Mecanismos inmunológicos**

La producción en la fase inmune de anticuerpos IgM e IgG, como respuesta inmunológica defensiva puede dar lugar a la formación de inmunocomplejos, que

depositados en los tejidos y con la participación del complemento sérico, ocasionan daño (Longo et al., 2012; Medeiros, 2010). En la meningitis ocurrida en la fase inmune, así como en la uveítis, se detectan aumentos del título de anticuerpos, sin aislarse leptospiras, aceptándose un mecanismo inmune.

La inmunogenicidad es uno de los parámetros más importantes en el estudio de los inmunógenos, por lo que el desarrollo de una inmunidad duradera en el tiempo es uno de los elementos más importantes en la vacunología profiláctica. (Cuba et al., 2016). La respuesta inmune humoral durante la leptospirosis es importante para la resistencia a la infección. La inmunidad pasiva transferida mediante el suero de individuos vacunados puede ser conferida solamente por anticuerpos, aunque se reconoce también el papel que puede jugar la respuesta inmune mediada por células (Adler, 2009).

Manifestaciones clínicas

La expresión clínica de la leptospirosis es muy variada, se caracteriza por ser: subclínica o silente, leve o febril anictérica (90% de los casos), grave o febril ictérica "Síndrome de Weil", renal pura (5-10% de los casos) y meníngea (Levett, 2001). En la leptospirosis la severidad del cuadro clínico depende de varios factores teniendo en cuenta las condiciones epidemiológicas, susceptibilidad del huésped, virulencia del agente patógeno, su dosis y el órgano afectado (Levett, 2001; Badell et al., 2014).

Leptospirosis anictérica

Generalmente es benigna y representa el 90 % de los casos. Puede presentarse como un proceso seudogripal agudo con fiebre, escalofríos, cefalalgia intensa, náuseas, vómito y mialgias. Suele tener un comienzo brusco con escalofríos y fiebre de 39 °C-40 °C, acompañado de mialgias y cefalea intensa. Las mialgias, sobre todo en las pantorrillas, músculos lumbosacros y abdominales, constituyen uno de los datos clínicos más relevantes. A menudo hay anorexia, náuseas y vómitos, cuya asociación con dolor abdominal obliga a su diferenciación con un cuadro de abdomen agudo. Otras manifestaciones menos frecuentes son el dolor de garganta y la erupción cutánea, fiebre, junto con la conjuntivitis, hiperemia

faríngea, erupción cutánea, hepatomegalia y esplenomegalia, a veces se detecta ictericia leve (Sánchez, 2011).

Los síntomas remiten en la mayoría de los enfermos en una semana. La enfermedad recidiva en algunas ocasiones tras un plazo de 1 a 3 días. El comienzo de esta segunda fase (inmune) coincide con la aparición de los anticuerpos.

Leptospirosis grave (síndrome de Weil)

Es la forma más grave de leptospirosis, se caracteriza por ictericia, disfunción renal, diátesis hemorrágica y una mortalidad de 5 al 15%. El síndrome suele acompañar a la infección por la serovariedad *Icterohaemorrhagiae/Copenhageni*. La enfermedad comienza del mismo modo que la leptospirosis leve, pero a los 4 o 9 días suele aparecer ictericia, así como alteraciones de la función renal y vascular, se observa hepatomegalia y esplenomegalia. La insuficiencia renal aparece casi siempre en la segunda semana de la enfermedad, el daño pulmonar es frecuente y concurre con tos, disnea, dolor de pecho acompañado de expectoración teñida de sangre o incluso hemoptisis e insuficiencia respiratoria. El síndrome de Weil conlleva a manifestaciones hemorrágicas como epistaxis, petequias, púrpura y equimosis, (Shah et al., 2010, Velasco et al., 2019). En la leptospirosis grave se describen rabdomiólisis, hemólisis, miocarditis, pericarditis, insuficiencia cardíaca congestiva, choque cardiogénico, síndrome apnéico del adulto y fracaso multiorgánico, que pueden confundirse con cardiopatías por enfermedad de Chagas, común en Latinoamérica (Shah et al., 2010, Velasco et al., 2019)

La severidad de la hemorragia pulmonar y del daño renal parecen estar en relación directa con la intensidad de la respuesta inmune humoral, valorada por las concentraciones de IgG específicas (los pacientes con mayor repercusión clínica presentan valores superiores de IgG) (Nally et al., 2004). Asimismo, la demostración del depósito de IgG, IgA y C3 en la membrana basal alveolar, similar a lo que ocurre en el síndrome de Good pasture.

La mortalidad por el Síndrome de Weil y la LSHP puede alcanzar entre el 10 y el 50 %, respectivamente, se estima una cifra superior a 500 000 casos severos anuales (Helmerhorst et al., 2012; Lehmann et al., 2014).

Leptospirosis en las Américas y el impacto de la leptospirosis severa con hemorragia pulmonar (LSHP)

Tres subregiones en las Américas se consideran de alto riesgo para la presentación de brotes de leptospirosis humana, debido a sus características ambientales y humanas: la zona oriental de Brasil, el Caribe y América Central (Hotez et al., 2008). Según una revisión sobre la tendencia de la incidencia de la enfermedad en el mundo, 12 de los 20 primeros puestos corresponden a países de las Américas (ocho en Centroamérica), donde Trinidad y Tobago, Barbados y Jamaica ocupan los primeros tres puestos de la región, con una incidencia anual por millón de 120,4; 100,3 y 78 casos, respectivamente (Pappas et al., 2008). Los primeros casos de LSHP se notifican en Brasil (Nicodemo et al., 1997) y en Nicaragua (Trevejo et al., 1995); en esta última, la hemorragia pulmonar asociado a la leptospirosis (LSHP) se presenta con hemorragia pulmonar, hemoptisis y disnea, pero sin ictericia ni manifestaciones renales, los pacientes habitan en zonas rurales y se aísla *L. interrogans* serovariedad Canicola.

Leptospirosis como diagnóstico diferencial

La leptospirosis no suele tenerse en cuenta cuando se aborda a un paciente con hemorragia pulmonar difusa (HPD) o con un síndrome renopulmonar, por ello es importante que se incluya la leptospirosis entre los diagnósticos diferenciales (Groot k et al., 2009). Como ninguno de los síntomas de la leptospirosis es específico, con frecuencia se plantean otros diagnósticos como la influenza, fiebre amarilla, la meningitis viral, la encefalitis, la hepatitis viral, el dengue, fiebre chikungunya, virus del ébola, en presencia de estas infecciones virales concomitantes, el tratamiento antibiótico oportuno puede reducir significativamente la mortalidad (Wijesinghe et al., 2015; Nhan TX et al., 2016). Se debe diferenciar de infecciones por hantavirus, por Rickettsia, brucelosis, fiebre tifoidea, toxoplasmosis, malaria, y otros diagnósticos como pielonefritis aguda, ictero hemolítico - obstructivo, fiebre reumática y otras (Chandy et al., 2009; Koizumi et al., 2009).

Hallazgos del laboratorio clínico

Los resultados de los exámenes del laboratorio clínico a pesar de no ser específicos de la enfermedad, son determinantes en la orientación del médico de asistencia (Fauci AS et al., 2008) en el hemograma la mayoría de las veces se observa leucocitosis (con una franca neutrofilia), aunque el conteo de leucocitos en algunos casos puede ser normal o bajo, la eritrosedimentación se presenta aumentada y el coagulograma puede ser normal aunque a veces la actividad de la protrombina plasmática puede estar disminuida, hasta el 50% de los enfermos presentan trombocitopenia leve, que se relaciona con la insuficiencia renal, (Golman L, 2007). En la leptospirosis es característico la elevación de la bilirrubina y de la fosfatasa alcalina en suero, además de las aminotransferasas, si reacción meníngea la concentración de proteínas en el LCR se eleva pero la concentración de glucosa es normal (Golman L, 2007; Fauci AS et al., 2008) comparando el daño renal se muestra desde una proteinuria leve hasta una insuficiencia renal en los casos graves (Golman L, 2007).

Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de la leptospirosis resulta complejo, dado que esta enfermedad puede cursar con una sintomatología similar a la que se manifiesta en otras enfermedades infecciosas. Por esta razón, se requiere de datos clínicos, epidemiológicos, microbiológicos para la definición de un caso de leptospirosis (Levett et al., 2001).

El éxito del diagnóstico microbiológico de la leptospirosis depende del conocimiento adquirido sobre la patogenia de esta enfermedad y de los mecanismos que demuestren las propiedades invasivas de su agente causal (Levett, 2001). En ocasiones el diagnóstico se dificulta por la diversidad de su sintomatología clínica y depende de una variedad de exámenes de laboratorio, tales como la detección de los anticuerpos específicos por el examen de microaglutinación (MAT), la hemoaglutinación indirecta (HA) y por los exámenes inmunoenzimáticos o ELISA. Las leptospiras pueden detectarse en la orina o los tejidos por cultivo (prueba de oro para la confirmación retrospectiva de esta enfermedad). Además, suelen visualizarse por la observación microscópica en campo oscuro o hacer su identificación por la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), entre otros. Sin embargo, la MAT es considerada la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la leptospirosis (Adler y De la Peña, 2010).

La obtención de sangre para el cultivo constituye una muestra útil a partir del segundo y hasta el quinto día después del inicio de la sintomatología y los hemocultivos deben realizarse en los pacientes no tratados con antimicrobianos. Las muestras de suero son importantes para el diagnóstico etiológico, casi siempre, se utilizan sueros pareados obtenidos con intervalos entre 7 a 10 días, de forma tal, que representen las dos fases clínicas de la enfermedad (Levett, 2001).

El valor práctico de la muestra de orina es vital en la fase de leptospiuria e inmune, aunque en algunos ensayos, al procesar las muestras colectadas durante la fase leptospirémica se obtienen resultados satisfactorios (Van Eys et al., 1991; Gravekamp et al., 1993). La obtención del LCR se recomienda a partir del quinto y hasta el decimonoveno día posterior a la infección. Los cortes de tejidos (riñón, hígado y pulmones) no congelados deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio de Microbiología, lugar donde se inocularán en los medios selectivos para leptospiras, con la finalidad de aislar al microorganismo. Para estudios epizootiológicos son importantes las muestras de agua y de los suelos vinculados con la fuente de infección (Levett, 2001).

Las herramientas moleculares basadas en PCR constituyen uno de los métodos más ampliamente usados debido a la alta especificidad que ofrece y que la misma juega un papel importante en el diagnóstico rápido de la infección activa (Branger et al., 2005; Manu et al., 2009). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) permite obtener “in vitro” millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. Esta técnica se basa en la síntesis de dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato et al., 2014), permiten realizar un diagnóstico rápido, sensible y específico de la enfermedad, pueden utilizarse a partir de diferentes muestras clínicas como sangre, orina, LCR, tejidos de fallecidos, entre otras; aunque también han encontrado aplicabilidad en estudios taxonómicos y epidemiológicos (Merien et al., 2005).

Los primeros estudios en biología molecular realizados para detectar ADN en *leptospiras* fueron el dot blotting e hibridación in situ, Una limitación del diagnóstico por PCR de la leptospirosis es su incapacidad para identificar el serovar, en la mayoría de los casos. Esto no es significativo para el tratamiento del paciente, pero tiene un gran valor en la epidemiología y la salud pública. La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR o Q-PCR, siglas en inglés de quantitative polymerase chain reaction) es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional (o punto final), un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, deoxinucleótido trifosfato (dNTP), un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Bartlett & Stirling, 2003). Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real, es decir, PCR inmediata o simultánea (Poitras y Houde, 2002).

Fundamento

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Este termociclador es un aparato con capacidad para calentar y enfriar rápidamente las muestras, de modo que se aprovechen las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimáticas del ADN polimerasa.

El proceso de PCR, al igual que la PCR convencional, por lo general consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten en 25-40 veces, llamados ciclos, donde cada uno posee un mínimo de tres etapas; la primera, en torno a los 95°C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; el segundo, a una temperatura en torno a los 50-60°C, facilita el alineamiento de los cebadores al ADN molde y el tercero, a 68°C -72°C, permite la polimerización por parte de la ADN polimerasa (Bustin, 2005).

Tratamiento

El tratamiento de esta infección se basa en la vigilancia estricta de aquellos pacientes cuyo cuadro clínico sea compatible con leptospirosis, identificando tempranamente la aparición de signos y síntomas compatibles con formas severas de la misma, iniciando con el monitoreo de las funciones vitales y de soporte (que comprende la vigilancia de los estados: hemodinámicos, hidroelectrolítico, acido-básico, renal, pulmonar y neurológico), así como el uso de antibióticos (Ortega Lilia et al., 2012). Debe indicarse de inmediato y en correspondencia con los síntomas del paciente (Sandow y Ramírez, 2005). Debe ser en los primeros cuatro días de iniciados los síntomas y constituye aún la penicilina el fármaco de elección a pesar de la reacción de Jarisch-Herxheimer además de la doxiciclina, que constituyen los más utilizados y aceptados en la práctica clínica diaria. En las formas graves se recomienda utilizar una dosis de 1.5 millones de unidades c/6h de Penicilina G sódica intravenosa por 7 días, Ceftriaxone 1g c/12h intravenosa por 7 días o Cefotaxime 1g c/6h intravenosa por 7 días. En las formas moderadas y leves el antimicrobiano de primera elección es la Penicilina G procaínica, dosis 1 millón c/12h intramuscular por 7 días, siendo también eficaces ampicilina, doxiciclina, cefalosporinas, quinolonas, aminoglucósidos y otros. La vía de administración y duración del tratamiento recomendada dependen de la intensidad del cuadro clínico (Ortega Lilia et al., 2012; Mir et al., 2010; Zunino, 2007; Daher, 2000).

Los enfermos con leptospirosis grave, pueden presentar complicaciones hepato renales y respiratorias, las cuales precisan tratamiento dialítico precoz y diario, y merecen ventilación mecánica invasiva y protectores. Aquellos con síndrome de Weil requieren transfusiones de sangre entera, de plaquetas o de ambos tipos (Harrison, 2006). En estudios realizados y publicados, en casos con Hemorragia pulmonar difusa incluyen en la terapéutica bolos de metilprednisolona (500mg y 1000mg) o ciclofosfamida con buena respuesta, pero aún no se encuentra en los protocolos y guías para el tratamiento y control de esta infección.

Prevención

La primera línea de prevención de la leptospirosis es evitar la exposición, se debe evitar tragar agua dulce posiblemente contaminada (de ríos, arroyos), así como

caminar, nadar, bañarse o sumergir la cabeza en ella, especialmente después de periodos de lluvias torrenciales o inundaciones. Evitar el contacto con agua de inundación, no consumir alimentos contaminados con esa agua o con orina de roedores, usar el equipo de protección personal adecuado (botas de goma, overol o ropa y guantes impermeables) cubrir las heridas abiertas con vendajes impermeables. Se recomienda hervir el agua para beber, mantener bajo control las poblaciones de roedores (ratas y ratones) u otras plagas de animales (Adler y De la Peña, 2010).

Algunos estudios han demostrado que la quimioprofilaxis con doxiciclina podría ser eficaz para prevenir la enfermedad sintomática, y podría tenerse en cuenta para las personas en alto riesgo y con exposiciones breves (Schonfeld A et al., 2012; Sarkar J et al., 2012).

II Material Y Métodos

Diseño de estudio: Observacional de corte transversal descriptivo durante el período enero/2018 a junio/2019.

Universo y muestra: Fueron estudiadas 99 muestras de tejidos de pulmón, hígado y riñón de 33 fallecidos cubanos con sospechas de leptospirosis, enviados al Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras y Brucelas procedentes de instituciones cubanas de salud; de ellas 39 muestras de órganos frescos y 60 muestras embebidas en bloques de parafina.

Criterios de inclusión:

- ✓ Fragmentos de pulmón, hígado o riñón embebidos en parafina y órganos frescos de fallecidos cubanos con sospechas clínicas o epidemiológicas de leptospirosis, correctamente conservados.
- ✓ Una de las muestras de órganos tiene que ser pulmón.

Criterios de exclusión:

- ✓ Fragmentos de tejidos embebidos en parafina u órgano fresco sin identificación del órgano de procedencia.

Métodos analíticos

PCR en tiempo real cuantitativa para la detección de *Leptospira interrogans*.

Se utilizó un protocolo de PCR-TR basado en la amplificación del gen que codifica la lipoproteína de membrana externa LipL32, que utiliza los cebadores y la sonda descritos por Villumsen y colaboradores en el 2012 (Villumsen *et al.*, 2012):

LipL32F: 5´- AGA GGT CTT TAC AGA ATT TCT TTC ACT ACC T - 3´ y

LipL32R: 5´- TGG GAA AAG CAG ACC AAC AGA - 5´

Sonda: FAM - 5´- TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC - 3´- BHQ1

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 25 µL (15 µL de mezcla más 10 µL del extracto de ácidos nucleicos). Cada mezcla contenía 11µL de Hot Star Taq Plus Master Mix 2x, 1 µM de cada cebador, 0,5 µM de la sonda, 0,5 mM de MgCl₂ y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final.

La amplificación y análisis de los resultados se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-

Plex-HRM (Qiagen, Alemania), utilizando un programa de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos a 94°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min con lectura de fluorescencia en el canal verde y una temperatura final de incubación de 4°C.

Preparación de la curva estándar.

Cepa: se empleó la cepa de referencia Castellon de *L. borgpetersenii* serovar Castellonis.

Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos: se tomó 1mL de la cepa, se centrifugó durante 30 minutos a 14 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL de agua ultrapura con calidad para Biología Molecular. Al extracto de ácidos nucleicos se le determinó la concentración de ADN y pureza a partir de las lecturas de las densidades ópticas (DO) a 260 nm y 280 nm en el equipo Colibri Microvolumen Nanodrop Spectrophotometer_(Titertek-Berthol, PforZheim, Alemania).

La extracción se realizó con el estuche QIAamp^RDNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) de forma automatizada en el equipo Qiacube (Qiagen, Alemania) según protocolo del fabricante. Se añadieron al equipo de extracción automatizada los 200 µL previamente preparados de la cepa, los extractos de ADN finales se obtuvieron en volúmenes de 100 µL.

Preparación de los estándares: al extracto de ADN se le realizaron diluciones decimales y seriadas en agua ultrapura desde 2×10^7 geq/µL hasta 0,2 geq/µL.

A cada de una de las diluciones (puntos de la curva estándar) de ADN, en réplicas de tres, se les realizó la PCR-TR descrita anteriormente.

Evaluación de la curva estándar: se evaluaron como valores de desempeño de la curva el coeficiente de regresión (r^2), la pendiente y la eficiencia de la curva estándar obtenida. El ensayo se consideró válido cuando se obtuvo la amplificación de, al menos, dos de las diluciones evaluadas, el control negativo no mostró amplificación, el r^2 de la curva fue >0,98, la pendiente de la curva con un valor cercano a -3,322 y la eficiencia 1 (www.qiagen.com).

Procesamiento de las muestras de órganos.

Las muestras de tejido de riñón, hígado y pulmón, embebidas en parafina o frescos, contaban con su identificación requerida según tejido y código de entrada.

Extracción de ácidos nucleicos.

Para las muestras embebidas en parafina se cortaron fragmentos de 10 μm con el micrótopo y posteriormente de forma más fina con ayuda de un bisturí. Aproximadamente 50 mg de cada tejido embebido en parafina se sometieron a extracción de ADN utilizando el estuche QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) de forma automatizada en el equipo Qiacube (Qiagen, Alemania) según protocolo del fabricante. Los extractos de ADN finales se eluyeron en volúmenes de 100 μL .

A los fragmentos de órganos frescos se les cortó con ayuda de un bisturí un fragmento pequeño de tamaño aproximado al de un grano de arroz, se colocaron en tubos de 2 mL y se les adicionó perlas magnéticas de 5 mm de diámetro (Qiagen, Alemania), se les adicionó 500 μL de solución tamponada de fosfatos 1X (PBS), y se procedió a la ruptura mecánica con el equipo Tissuelyser II (Qiagen, Alemania) durante 4 min, luego de estar homogenizado bien el tejido se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min, se tomó 200 μL del sobrenadante y se depositó en otro tubo de 2 mL. Los remanentes de las muestras se guardaron a -80°C .

A continuación se procedió a la extracción de ácidos nucleicos, siguiendo protocolo empleado para los tejidos embebidos en bloques de parafina.

PCR para la amplificación de un fragmento del gen que codifica la β - globina humana.

Cada uno de los extractos de ácidos nucleicos obtenidos de las muestras de tejido se evaluó con la aplicación de una PCR-TR para la amplificación de un fragmento de ADN de 268 pb del gen que codifica la β -globina humana (PCR- β -globina) (Talmaci *et al.*, 2004). La PCR se realizó a partir de una mezcla de reacción para volúmenes finales de 25 μL (15 μL de la mezcla de reacción y 10 μL de ADN), que contenía 11 μL de mezcla maestra Hot Start Taq Plus Master Mix 2X (Qiagen, Alemania), 500 nM de cada cebador (bglob fw 5'- ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC - 3', bglob rv 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'), 200 nM de la sonda TaqMan FAM - 5'- TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC - 3'- BHQ1, 2,5 mM de MgCl_2 (Qiagen,

Alemania), 200 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final. Se utilizó como control positivo un extracto de ADN a partir de células Hela donadas por el laboratorio de cultivo celulares del IPK y como control negativo agua ultrapura estéril.

La amplificación se realizó en el equipo Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (Qiagen, Alemania), utilizando como programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 50 ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 1min con lectura de fluorescencia en el canal verde y una temperatura de incubación final de 4°C.

Estimación de la carga bacteriana de infección por leptospiras patógenas en pulmón, riñón e hígado de humanos fallecidos por leptospirosis.

Los extractos de ADN que resultaron positivos por la PCR-β-globina se sometieron a la PCR-TR cuantitativa para la detección de leptospiras patógenas, descrita anteriormente.

Se emplearon los estándares preparados previamente a partir de la cepa de referencia y como control negativo agua para Biología Molecular. Se determinó la positividad y carga bacteriana (geq/μL) para cada tejido.

Las cargas bacterianas, según criterio opinático del equipo de investigación y con objetivos estadísticos posteriores se agruparon en los siguientes rangos:

- no detectable
- 0,1-10 genomas equivalentes/μL
- 11-100 genomas equivalentes/μL
- ≥101 genomas equivalentes/μL

Relación de variables clínicas con la positividad y carga bacteriana por órganos.

Se describió la positividad por órganos, así como la carga bacteriana atendiendo a las manifestaciones clínicas según órganos afectados en los fallecidos para los que al menos se obtuvo una muestra de tejido positiva.

Descripción de los daños histopatológicos en muestras de pulmón, riñón e hígado humanos infectados por leptospiras y su relación con la carga bacteriana n=7.

A los tejidos embebidos en parafina que resultaron positivos por la PCR en tiempo real cuantitativa se les realizó nuevos cortes para el estudio histopatológico por las técnicas de tinción convencionales de hematoxilina y eosina (Stanly *et al.*, 2000) lo que permitió describir las lesiones observadas para cada órgano.

A partir de la discusión en grupo con objetivos estadísticos posteriores, se realizó el análisis del grado de afectación observado en los cortes de los órganos y se clasificaron en: leve, moderado y severo, los que de forma cualitativa se relacionaron con el nivel de carga bacteriana detectada previamente.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se introdujeron en una base de datos diseñada al efecto mediante el empleo del programa Excel (Microsoft Office). Para el análisis de los mismos se utilizaron medidas de estadística descriptiva (porcentajes) y de tendencia central (mediana). Fue utilizado el programa SPSS v.21 para la comparación de proporciones y medianas en muestras independientes.

Operacionalización de las variables

Para dar cumplimiento a los objetivos de la investigación se estudiaron las variables que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Operacionalización de las variables

Variab les	Clasificación de las variables	Categorías de la escala	Definición de categorías de la escala
sexo	Cualitativa nominal dicotómica	-Masculino -Femenino	Según sexo biológico
Edad	Cuantitativa continua	18-30 años 31-40 años 41-50 años 51-60 años ≥ 60 años	Se tendrá en cuenta la edad en años cumplidos.
Antecedentes de vacunación contra la	Cualitativa nominal	Si no	Según información del

VARIABLES	Clasificación de las variables	Categorías de la escala	Definición de categorías de la escala
leptospirosis			modelo de envío de muestras
Lugar de residencia	Cualitativa nominal	Rural Urbano	Según información del modelo de envío de muestras
Antecedentes Patológico Personales	Cualitativa nominal	Sí No	Según información del modelo de envío de muestras
Manifestaciones clínicas	Cualitativa nominal	Generales, respiratorias, renales, hepáticas	Según información del modelo de envío de muestras
Provincia de residencia	Cualitativa nominal	Pinar del Rio Artemisa Mayabeque La Habana Matanzas Cienfuegos Villa Clara Sancti Spíritus Ciego de Ávila Camagüey Las Tunas Holguín Granma Santiago de Cuba Guantánamo Isla de la	Según información del modelo de envío de muestras

VARIABLES	Clasificación de las variables	Categorías de la escala	Definición de categorías de la escala
		Juventud	

Consideraciones éticas

Este trabajo responde a una de las tareas del proyecto institucional: Evaluación del pulmón como órgano diana de la infección natural por leptospiras patógenas. Jefe del proyecto: Dr.C Islay Rodríguez González. El Protocolo de tesis fue evaluado y aceptado por la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM) y Comité de Ética Institucional (CEI-IPK 22-18.)

Se cumplieron las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y manipulación de microorganismos y muestras según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006.

La información fue conservada con carácter confidencial. No se reveló la identidad de los individuos fallecidos de los que se recibieron muestras clínicas para su estudio. Los datos solo estuvieron accesibles a los investigadores participantes en el estudio. Los resultados de la prueba molecular se utilizaron sólo por el equipo de investigación con fines científicos.

Para esta investigación no se requirió de consentimiento informado pues la aplicación de una prueba molecular ya está incluida en el algoritmo confirmatorio de leptospirosis humana en fallecidos en Cuba.

Toda la información relacionada con esta investigación en general se encuentra en formato electrónico, conservada y protegida por el responsable del proyecto en el Laboratorio Nacional de Treponemas y Patógenos Especiales del IPK. Se realizaron copias (salvas) de la información.

Limitaciones del estudio

Entre las principales limitaciones del estudio está el número pequeño de muestras estudiadas, dado por la casuística de fallecidos con sospechas clínicas y epidemiológicas de leptospirosis durante el período de estudio. Los resultados de las

cargas bacterianas y la descripción de los daños histopatológicos están en función del corte o fragmento del tejido estudiado y no del órgano en sentido general.

IV Resultados y Discusión

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa aguda ampliamente distribuida a nivel mundial, afecta al hombre y a diferentes especies animales, tanto silvestres como domésticos y debido a las afecciones que causa en estos, así como por su repercusión económica en los países desarrollados y en vías de desarrollo, constituye una preocupación importante y permanente para la medicina humana y veterinaria (Adler, 2015).

Durante los últimos años se ha comenzado a reportar al pulmón como órgano diana fundamental de la infección por leptospiras, sustentado en el síndrome hemorrágico pulmonar asociado a leptospirosis (SHPAL) (Gouveia et al., 2008; Assimakopoulos et al., 2012); hecho interesante pues rompe con el paradigma previamente establecido de que riñón secundado por hígado, se presentaban como los órganos dianas principales de las leptospiras patógenas (Faine, 1982).

En la presente investigación se estudiaron 33 fallecidos cubanos con sospecha de leptospirosis, según se muestra en la tabla 1 el 21,2% eran del sexo femenino y el 78,8% masculino, los cuales pertenecían a 12 provincias de nuestro país correspondiente a las tres regiones (oriente, centro y occidente). Se puede apreciar que el predominio del sexo masculino puede deberse a que este grupo genérico se vincula con mayor frecuencia a actividades laborales consideradas como de riesgo para contraer la infección por *Leptospira* spp. Esta asociación es reportada por numerosos autores (Cruz, 2002; Verdasquera, 2009; Cairo y Vázquez, 2018). Las edades más afectadas se encontraban fundamentalmente en los mayores de 60 años, seguidas por el grupo etéreo de 51-60 años de edad coincidiendo este resultado con lo reportado por (Verdasquera 2009, Cairo y Vázquez, 2018) y solo el 3% se encontraba vacunado contra la enfermedad, siendo el área urbana la más afectada. Las manifestaciones clínicas más frecuentes resultaron ser las hepáticas seguidas de las respiratorias y luego renales.

Tabla 1. Caracterización de los fallecidos sospechosos de leptospirosis humana.

Variables socio-demográficas y epidemiológicas (n=33)		No.	%
Provincia	Artemisa	3	9,1
	Camagüey	1	3,0
	Ciego de Avila	3	9,1
	Granma	2	6,1
	Guantánamo	1	3,0
	La Habana	12	36,4
	Matanzas	1	3,0
	Mayabeque	1	3,0
	Pinar del Río	2	6,1
	Sancti Spiritus	3	9,1
	Santiago de Cuba	1	3,0
	Villa Clara	3	9,1
Sexo	Masculino	26	78,8
	Femenino	7	21,2
Rango de edades de fallecidos (años)	18-30	4	12,1
	31-40	3	9,1
	41-50	4	12,1
	51-60	10	30,3
	>60	12	36,4
Ocupación	Ama de casa	7	21,3
	Estudiante	1	3,0
	Jubilado	6	18,2
	Obrero agrícola	17	51,5
	Cuenta propista	2	6,1
Vacunación	Vacunado	1	3,0
	No Vacunado	32	97,0
Manifestaciones	Renales	12	36,4

clínicas	Respiratorios	16	48,5
	Hepáticas	22	66,7
Lugar de residencia	Urbano	18	54,5
	Rural	15	45,5

La detección de leptospiras en muestras de fallecidos con sospecha clínica y epidemiológica de la infección está sustentada en la realización de tinciones con carácter presuntivo como la de Hematoxilina-Eosina, el cultivo bacteriológico que a pesar de ser confirmatorio posee una probabilidad de éxito muy baja dado el alto grado de contaminaciones presentes en órganos frescos, además del lento crecimiento de las leptospiras, y finalmente las herramientas de biología molecular sobre todo aquellas basadas en PCR que aunque han sido poco desarrolladas para este tipo de muestra, prometen constituir la piedra angular en la confirmación post-mortem de la infección por leptospiras.

La PCR como técnica molecular de amplificación de ADN se ha caracterizado por un rápido funcionamiento y una alta sensibilidad de reconocimiento, al permitir la detección de un patógeno determinado a partir de la presencia de pocas copias de ADN del mismo en la muestra de partida (Cerar et al., 2008). Por su parte los ensayos de PCR en tiempo real, mayormente utilizados en la actualidad en países con recursos para ello, han reportado valores de sensibilidades sumamente buenos que oscilan desde 10 hasta 1 geq/ μ L (Levett, 2005; Subharat et al., 2011). Además, el número de espiroquetas en tejidos de fallecidos por leptospirosis, atendiendo a la patogenia de la infección, debe ser mayor que en sangre, donde se reportan 16×10^3 leptospiras/mL como promedio (Agampodi et al., 2012), por tanto la PCR debe funcionar sin problemas en las muestras de tejidos.

La detección de ADN en muestras de fallecidos constituye un reto que se ha mantenido a través de los años, no solo por lo fastidioso de las muestras en cuestión y el considerable número de inhibidores de la PCR que pudieran estar presentes, sino por los requisitos que deben cumplir las PCR sobre todo aquellas diseñadas para muestras embebidas en bloques de parafina.

La PCR como técnica molecular de amplificación de ADN se ha caracterizado por un rápido funcionamiento y una alta sensibilidad de reconocimiento, al permitir la detección de un patógeno determinado a partir de la presencia de pocas copias de ADN del mismo en la muestra de partida (Cerar et al., 2008). Sin embargo, la PCR como reacción multietapa puede verse afectada por disímiles razones como son: la presencia de sustancias inhibitorias en la matriz de la muestra clínica, errores técnicos a la hora de preparar las mezclas de PCR, actividad pobre de la ADN polimerasa debido a conservación inadecuada de la misma, el mal funcionamiento del termociclador, entre otras (Radstrom et al., 2003).

Los inhibidores pueden bloquear la actividad enzimática de las ADN polimerasas afectando la disponibilidad de cofactores requeridos por esta actividad, inducen la degradación o captura de los ácidos nucleicos o interfieren con el paso de lisis celular durante el proceso de extracción del ADN (Champlot et al., 2010). Por ejemplo, cualquier sustancia que reduzca la disponibilidad de Mg^{2+} o interfiera con su unión a la ADN polimerasa, puede inhibir la PCR (Bessetti, 2007). Las ADN polimerasas presentan diferencias en cuanto al grado de sensibilidad o resistencia que manifiestan frente a la acción de los inhibidores de la PCR. Se ha demostrado que la *Taq* polimerasa es más sensible a la acción de los inhibidores que otras polimerasas termoestables como la *Tth* polimerasa, de *Thermus thermophilus*, y la *Tfl* polimerasa de *Thermus flavus*. Esto corrobora la afirmación de que el grado de inhibición de la PCR depende del tipo de polimerasa termoestable usada en la reacción (Wiedbrauk, 1995).

Otro factor importante es el método de extracción de ácidos nucleicos empleado, debido a que los inhibidores de las polimerasas de ADN pueden ser extraídos conjuntamente y la calidad y cantidad de la secuencia blanco condicionan los pasos siguientes (Vinayagar moorthy et al., 2015).

Los inhibidores de la PCR pueden encontrarse en las muestras originales y pueden ser añadidos además a la mezcla de reacción durante el procesamiento de la muestra, previo a la amplificación del ADN, entre ellos se encuentran los reactivos usados durante el paso de extracción y purificación del ADN, ejemplos conocidos son el etanol, fenol, isopropanol, detergentes iónicos como el desoxicolato de sodio, sarcosil y duodecil sulfato de sodio (SDS, siglas en inglés

de Sodium Duodecil Sulphate); algunas sales cuando se encuentran en exceso en la mezcla de reacción pueden tener acción inhibitoria sobre la amplificación de los ácidos nucleicos, como KCl, NaCl, entre otras (Bessetti, 2007), y las sustancias que se liberan del poliestireno después de la exposición de las pipetas a la luz ultravioleta durante su decontaminación también pueden inhibir la amplificación del ADN. Los controles internos de amplificación han sido ampliamente utilizados durante el desarrollo y aplicación de las herramientas moleculares basadas en PCR para la detección de microorganismos en muestras clínicas (Radstrom *et al.*, 2003).

La amplificación de un fragmento del gen que codifica la β -globina humana ha sido utilizada como control interno no competitivo, los que han sido ampliamente utilizados en ensayos de PCR con fines diagnósticos, a diferencia de los controles internos de tipo competitivos que suponen una competencia entre el material genético utilizado como control interno y el ADN diana por los cebadores, provocando una disminución en el límite de detección del ensayo y por tanto en la eficiencia de amplificación (Hoorfar *et al.*, 2004).

La PCR-RT para el gen que codifica la β -globina humana ha sido utilizada en gran medida para comprobar la eficiencia de la extracción de ácidos nucleicos en muestras clínicas con una considerable fracción de células humanas en su composición (Vinayagamoorthy *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2016). La β -globina humana está compuesta por cadenas polipeptídicas que forman parte de una de las subunidades proteicas de la hemoglobina (Brandan *et al.*, 2008), esta proteína globular se encuentra en altas concentraciones en los hematíes o glóbulos rojos (Ruiz *et al.*, 2003, Weatherall *et al.*, 2001).

La PCR β -globina mostró la eficacia de la extracción de ácidos nucleicos de cada muestra de tejido en el presente estudio, así como la ausencia de inhibidores en los extractos de ADN para la reacción de amplificación.

Al aplicar la PCR en tiempo real cuantitativa a los tejidos en estudio se obtuvo positividad en el 36%(12/33) de los fallecidos, similar a los resultados de los estudios anteriores en Cuba, Rodríguez *et al.*, 2013, durante el periodo 2008-2011 reportó 32%(16/50) de positividad en órganos frescos, Noda *et al.*, 2014

reportó 36% (16/44) en órganos frescos y en igual período 50% (12/44) en órganos embebidos en parafina.

El 91,6% (11/12) de los fallecidos con resultados positivos asistieron a su primera consulta médica a los hospitales provinciales y solo el 8,4% recibió atención médica en el policlínico de su área de salud. Demoraron entre 1-7 días (mediana 5 días) de iniciado los primeros síntomas para asistir a consulta médica, lo que conlleva a tardanza en imponer el tratamiento correcto con antibióticos, así como conducta a seguir según el cuadro clínico en ese momento. Estos resultados discreparon con los encontrados en el trabajo de Verdascuera, 2010 para el cual solo ocurrió en el 56% y en el reportado por Cairo y Vázquez, 2018 solo el 29% demoraron en asistir a consultas 4 días, lo que implica un pronóstico desfavorable para la recuperación de un paciente con leptospirosis, porque a partir de ese tiempo se pueden presentar fallos multiorganos, lo que es incompatible con la vida.

De los fallecidos en estudio el 58,4% (7/12) tuvieron diagnóstico presuntivo de leptospirosis complicada al ingreso, el 25% de leptospirosis asociada a otras patologías y solo el 16,6% se diagnosticó como leptospirosis leve e igual porcentaje a otras infecciones no asociadas a la zoonosis referida. El 25% de los pacientes presentaron una evolución fatal en menos de 24 horas después de realizado el ingreso hospitalario, el 58,4% entre 24 y 72 horas, sólo un 16,6% en un lapso de tiempo mayor de 72 horas (ver tabla 2).

Tabla 2. Fallecidos por leptospirosis según indicadores de asistencia médica seleccionados.

Variables		No de fallecidos (%)
Lugar de la primera consulta	Hospital	11(91,6)
	Policlínico	1(8,4)
	Consultorio médico	0(0,0)
	No recogido el dato	0(0,0)
	Total	12(100)
Tiempo Transcurrido entre el inicio de los primeros síntomas y primera consulta	Menos de 24 horas	0(0,0)
	Entre 24 y 72 horas	3(25)
	Más de 72 horas	9(75)
	No recogido el dato	0(0,0)
	Total	12(100)
Tiempo transcurrido entre el ingreso y el deceso	Menos de 24 horas	3(25)
	Entre 24 y 72 horas	7(58,3)
	Más de 72 horas	2(16,6)
	No recogido el dato	0(0,0)
	Total	12(100)

En la tabla 3 se puede apreciar que el 50 % de los fallecidos fueron diagnosticados al ingreso con sospecha de leptospirosis grave y solo el 16,8% con el diagnóstico de leptospirosis leve. Sin embargo, el 8,33% presentaban leptospirosis graves asociada a otras patologías complicadas al ingreso, igual porcentaje de causas infecciosas de etiología variadas, como infección urinaria y

dengue complicado. Ello demuestra que en el 75% de los fallecidos se pensó en leptospirosis, lo que indica buena percepción sobre esta enfermedad en las instituciones cubanas de salud.

Tabla 3. Diagnósticos al ingreso de los pacientes positivos a leptospirosis.

Diagnóstico presuntivo al ingreso(n=12)	# de Fallecidos (%)
Leptospirosis Grave	6 (50)
Leptospirosis Grave Bronconeumonía Bacteriana Extrahospitalaria, Insuficiencia Renal Aguda	1 (8,33)
Leptospirosis leve	2 (16,8)
Leptospirosis Complicada y Shock Séptico	1 (8,33)
Infección Viral, Infección del tracto urinario	1 (8,33)
Dengue hemorrágico	1 (8,33)

Entre los fallecidos el 25% eran sanos, el resto tenían como antecedentes una enfermedad previa a la leptospirosis. La hipertensión arterial fue la más frecuente (41,6%), seguida de diabetes mellitus (0,8%), insuficiencia cardíaca congestiva (0,8%), epilepsia (0,8%), gota (0,8%), colitis ulcerativa (0,8%), encontrándose ausente esta información en la microhistorias de dos fallecidos (ver tabla 4). Estudios similares demuestran la presencia de factores de riesgos y enfermedades asociadas previas a la infección.

Tabla 4. Enfermedades crónicas no transmisibles de los fallecidos.

Antecedentes patológicos personales (n=12)	# de Fallecidos (%)
Hipertensión arterial	5 (41,6)
Diabetes Mellitus	1 (0,8)
Insuficiencia Cardíaca Congestiva	1 (0,8)
Epilepsia	1 (0,8)
Gota	1 (0,8)
Colitis Ulcerativa	1 (0,8)
Sanos	3 (25)
Sin datos recogidos	2 (16,6)

Al estudiar la positividad según órganos, se obtuvo el 30% (10/33) en las muestras de riñón, seguida de pulmón e hígado con 21% (7/33) cada uno, no mostrando diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p>0,05$). Esta positividad encontrada según órganos difieren de lo reportado en estudios anteriores, Rodríguez et al., 2013 y Noda et al., 2014 encontraron que el órgano de mayor positividad en muestras embebidas en parafina, resultó ser el pulmón, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticas significativas respecto al resto de los tejidos ($p>0,05$)

De los doce fallecidos confirmados con leptospirosis, se detectó en cuatro de ellos positividad en riñón, pulmón e hígado, en tres en riñón e hígado y en uno en riñón y pulmón (Figura 1)

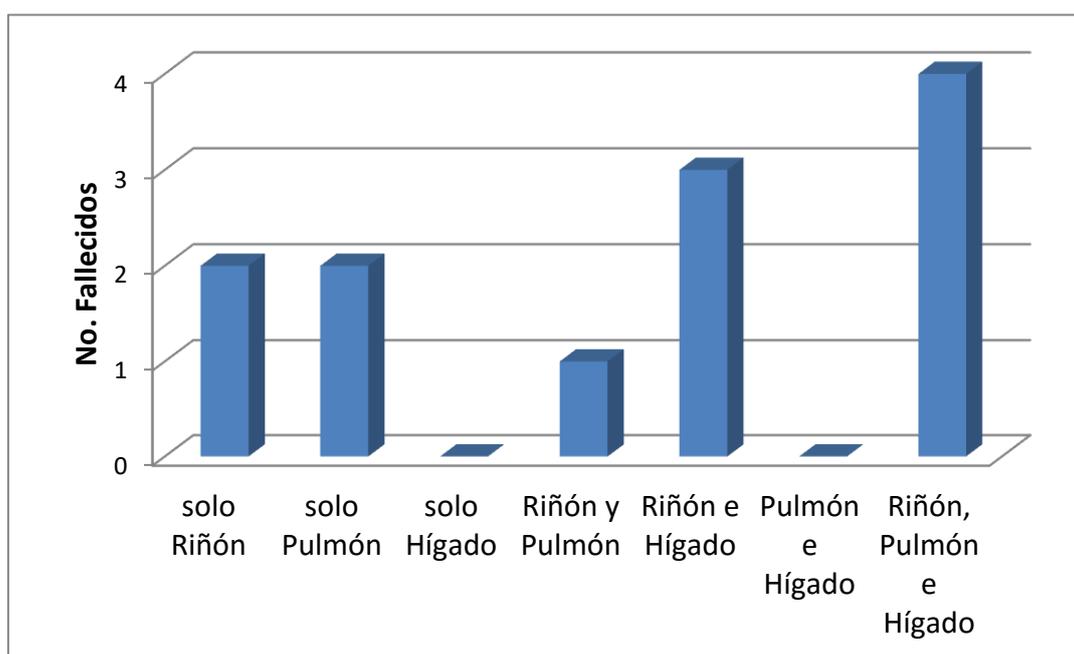


Figura 1. Número de fallecidos con sospechas de leptospirosis humana positivos por PCR-TR cuantitativa, según órganos (enero 2018 - junio 2019)

Teniendo en cuenta la carga bacteriana según órganos, las mayores cifras se presentaron en hígado, las cuales oscilaron entre 2,17 y 1 040 geq/ μ L con una mediana de 752 geq/ μ L, seguido por pulmón donde las concentraciones variaron de 1,06 geq/ μ L a 140 geq/ μ L con una mediana de 101 geq/ μ L y en riñón con cargas bacterianas entre 0,67 y 400 gen/ μ L, con una mediana de 21,8 copias/ μ L. Según la literatura científica revisada no existe nada publicado en relación a la carga bacteriana por leptospiras en muestras de órganos de fallecidos con sospecha clínica de leptospirosis, lo que dificulta la posibilidad de comparación de los resultados encontrados en esta investigación. Estudios similares se encontraron en un estudio experimental, realizado por Wunter et al., 2016, a través de la inoculación intraconjuntival de cepas de leptospiras en hamster, los mostraron que las mayores cargas bacterianas se encontraban en el hígado, con valor de 1×10^7 geq.

En un estudio previo en Cuba, se utilizó esta PCR real cuantitativa para el diagnóstico temprano de leptospirosis en pacientes con sospecha de

leptospirosis en muestras de suero, donde se obtuvieron cargas que oscilaron entre 3,43 y 59,37 geq/ μ L.

En la tabla 5 se muestran las manifestaciones clínicas en los 12 fallecidos positivos a leptospirosis. Como se aprecia mostraron variadas manifestaciones clínicas; el 100% presentó fiebre, seguidos de mialgias y disnea, sólo 5 de los fallecidos estudiados presentaron cefalea, diarreas, tos e ictero, el resto de síntomas y signos fueron en menor cuantía. A diferencia de lo reportado por Valencia et al., 2014 y por Tobías, 2009, donde muestran afectación de los pacientes por fiebre en el 100%, seguidos por cefalea, mialgias, artralgias con igual porcentaje como síntomas y signos clínicos más frecuentes en la primera fase de la enfermedad.

Tabla 5. Relación de los síntomas y signos clínicos asociados en los fallecidos positivos a leptospirosis.

Variables clínicas de los fallecidos con la positividad	TOTAL (n=12)	
	No.	%
Fiebre	12	100,0
Mialgia	10	83,3
Disnea	8	66,7
Cefalea	5	41,7
Diarreas	5	41,7
Ictero	5	41,7
Tos	5	41,7
Vómitos	4	33,3
Dolor Abdominal	4	33,3
Artralgias	3	25,0
Inyección Conjuntival	3	25,0
Escalofríos	3	25,0
Alteraciones neurológicas	1	8,3

Al analizar la relación entre las manifestaciones clínicas con la positividad y carga bacteriana según órganos se constató que de los 12 fallecidos confirmados, solo cuatro presentaban síntomas renales y en tres de ellos se detectó positividad a leptospira en riñón con cargas bacterianas que oscilaron entre 11-100 geq/ μ L, la muestra de riñón del otro fallecido resultó negativa; aunque se detectó positividad

en el pulmón de este, resultado que justifica los síntomas respiratorios reportados en el mismo. Sin embargo, en siete de los ocho fallecidos para los que no se describieron manifestaciones renales se detectaron leptospiras (dos con cargas entre 0,1-10 geq/ μ L, dos entre 11-100 geq/ μ L y tres con cargas superiores a 101 geq/ μ L).

En ocho de los fallecidos se presentaron manifestaciones hepáticas y en siete de ellos se detectaron leptospiras en hígado (con cargas entre 0,1-10 geq/ μ L en tres de los fallecidos, 11-100 geq/ μ L en uno y superiores a 101 geq/ μ L en tres). El otro fallecido con manifestaciones hepáticas y leptospiras no detectables en hígado, presentó positividad en pulmón con manifestaciones respiratorias. Los restantes cuatro fallecidos para los que no se describieron síntomas y signos hepáticos tampoco se detectaron leptospiras en las muestras de tejidos de hígado.

En cuanto a las manifestaciones clínicas respiratorias, estas se reportaron en nueve de los fallecidos, de los cuales cinco presentaron leptospiras en pulmón, con cargas que oscilaron de 0,1-10 geq/ μ L en cuatro de ellos y 11-100 geq/ μ L en el otro. Los restantes cuatro fallecidos con signos o síntomas respiratorios resultaron negativos a leptospiras en pulmón; aunque se detectaron leptospiras en sus riñones, presentando uno de ellos manifestaciones renales; además se obtuvo positividad en hígado en dos de ellos para los que se habían recogido manifestaciones hepáticas. Solo tres fallecidos carecían de síntomas y signos respiratorios aunque tenían positividad en pulmón dos de ellos, con cargas entre 11-100 geq/ μ L y >101 geq/ μ L, este último presentó también manifestaciones hepáticas con positividad en hígado y riñón, siendo la mayor carga bacteriana en hígado, seguida de pulmón y riñón.

Estos hallazgos sugieren que la presencia de leptospiras en hígado y pulmón conlleva a manifestaciones clínicas hepáticas y respiratorias, respectivamente, mientras que la presencia de leptospiras en riñón no se traduce necesariamente en manifestaciones renales, lo que sugiere que el riñón actúa como órgano de mantenimiento de las leptospiras.

Al analizar los valores de las cargas bacterianas respecto al tiempo de deceso, se comprobó que los tiempos entre el comienzo de los primeros síntomas y deceso variaron entre 5 y 13 días con una mediana de 6 días. Como se puede apreciar en la figura 2, las cargas bacterianas en hígado y pulmón disminuyen con el

transcurso del tiempo, no así en riñón donde la variación es mínima, ello apoya la observación mencionada anteriormente al sugerir al riñón como órgano de mantenimiento de las leptospiras.

Estos resultados se corresponden con lo experimentado en hámster, donde las cargas bacterianas son detectables a partir del día tres, se incrementan hasta el día ocho y luego disminuyen (Wunter et al., 2016). Fenómeno similar fue reportado por Rojas 2018 al estudiar carga bacteriana en muestras de sueros de pacientes con leptospirosis temprana, donde los valores disminuyeron con el tiempo.

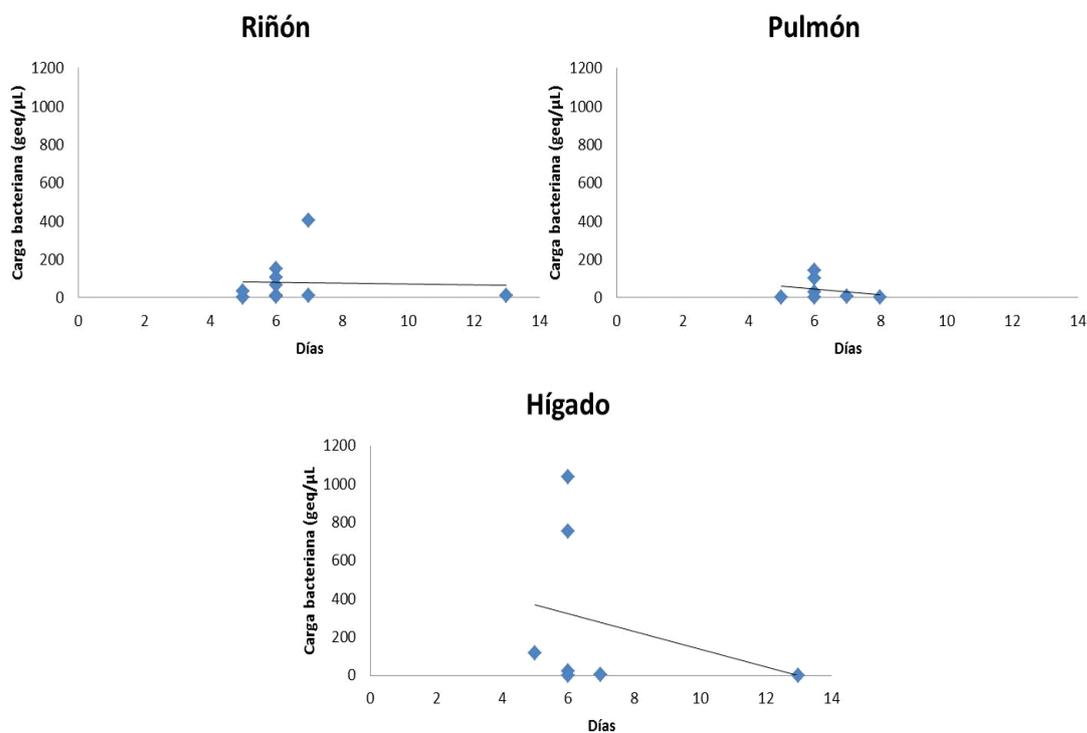


Figura 2. Relación entre carga bacteriana y tiempo de deceso por leptospirosis.

En la presente investigación las muestras de tejidos embebidos en parafina de los fallecidos que resultaron positivas a leptospirosis (n=7), se enviaron al departamento de Anatomía Patológica donde se le realizaron las tinciones de Hematoxilina-Eosina (tinción convencional con colorante nuclear), permitiendo teñir el núcleo de la célula de color azul oscuro y el citoplasma de color rosado.

Las muestras de tejido fresco no se procesaron porque no estaban en condiciones apropiadas para observar características morfológicas.

En la tabla 6 se resumen los hallazgos histológicos generales y específicos descritos para cada muestra de órgano estudiada. Entre los hallazgos histológicos encontrados a nivel del riñón se describió en el 85,7% de los fallecidos congestión severa y en el 57,1% infiltrado inflamatorio, siendo el 71,4% los que presentaban necrosis tubular aguda. A nivel pulmonar se destacó en el 42,8% áreas de atelectasia y el 100% presentaron hemorragias a nivel del órgano, además de edema pulmonar en el 57,1%. Los hallazgos encontrados a nivel hepático mostraron en el 85,7% de los fallecidos inflamación portal y esteatosis hepática en el 57,1%; en el 71,4% se evidenciaron colestasis Intrahepáticas y en el 100% de las muestras alteración en el patrón arquitectural.

Tabla 6. Alteraciones histológicas según órgano afectado por leptospiras(n=7)

Órgano	Hallazgos histológicos	Número de fallecidos con la condición	Hallazgos histológicos	Número de fallecidos con la condición
Riñón	Congestión Severa	6	Hemorragia	1
	Infiltrado Inflamatorio	4	Tumefacción Turbia	0
	Nefrosis osmótica	2	Necrosis Tubular Aguda	5
Pulmón	Áreas de Atelectasia	3	Hemorragia	7
	Congestión Pulmonar	2	Edema Pulmonar	4
	Enfisema	2	Neumonía Atípica	0
	Infiltrado Inflamatorio	2		
	Pulmón Estasis Crónico	1		
Hígado	Colestasis	1	Alteración del Patrón Arquitectural	7
	Necrosis medio Zonal	6	Separación de los Hepatocitos	2
	Inflamación Portal Anisonucleosis	4 1	Colestasis Intrahepáticas	5

	Esteatosis Hepáticas	4	
--	-------------------------	---	--

Teniendo en cuenta la aproximación a una clasificación sugerida para evaluar el daño histológico ocasionado en cada órgano y su relación con la carga bacteriana se obtuvo, según se aprecia en la tabla 7, que los daños identificados como leves se presentaron fundamentalmente en pulmón, a pesar de contar con carga no detectable o baja. Los daños considerados como moderados se evidenciaron en hígado y pulmón de cuatro de los fallecidos, con cargas bacterianas altas y superiores en relación al riñón. En cuatro de los fallecidos se describieron daños severos en hígado aunque las cargas bacterianas fueron no detectables o clasificadas como bajas; sin embargo, solo un fallecido tuvo afectación con carga bacteriana alta a nivel del riñón.

Tabla 7. Hallazgos histológicos a nivel visceral y su relación con la carga bacteriana

Clasificación del daño histopatológico	Rango de la carga bacteriana (geq/ μ L)	No de fallecidos (n=7)		
		Riñón	Hígado	Pulmón
Leve	No detectable	0	0	1
	0,1-10	1	0	1
	11-100	0	0	0
	>101	0	0	0
Moderado	No detectable	2	0	1
	0,1-10	2	0	2
	11-100	1	1	0
	>101	0	2	2
Severo	No Detectable	0	2	0
	0,1-10	0	2	0
	11-100	0	0	0
	>101	1	0	0

Los resultados anteriores demuestran que los tres órganos estudiados en esta investigación tuvieron afectación por la infección bacteriana; sin embargo, el hígado presentó mayor grado de severidad en los fallecidos a pesar de encontrarse con cargas no detectables o bajas. Se ha planteado recientemente que el desarrollo de casos severos depende fundamentalmente de tres factores; condiciones epidemiológicas, susceptibilidad del huésped y virulencia del agente patógeno.

La letalidad de la enfermedad en Cuba está alrededor del 3%, dependiendo el pronóstico tanto de la virulencia del microorganismo como del estado general del paciente. Se han aislado recientemente sustancias nocivas producidas por el microorganismo, inicialmente hipotéticas, como el factor citotóxico, que lesiona el endotelio vascular produciendo vasculitis y enzimas hemolíticas que dañan la membrana del eritrocito, se realza la importancia del endotelio vascular en la patogénesis, dada la vasculitis capilar, el depósito en éste de inmunocomplejos circulantes y complemento con producción de daño tisular, además de la activación patológica del mecanismo de la coagulación por el endotelio vascular lesionado.

Se ha planteado además, que la gravedad de la lesión pueda ser proporcional a la intensidad de la respuesta inmune. Por ejemplo, en el hígado cuando comienza la formación de anticuerpos, las leptospiras se refugian en el interior de la célula y luego comienzan a desaparecer tempranamente con la evolución de la enfermedad.

El daño en el tejido pulmonar se explica por dos mecanismos: la producción de endotoxinas por parte del microorganismo, las cuales median la vasculitis capilar, que es causa probada de la hemorragia pulmonar, o por citocinas producidas por el huésped como consecuencia de la inducción de la respuesta inmune por parte del patógeno; incluso, ambos podrían explicar dicho daño (Marchiori et al.; 2011). En pacientes fallecidos con síndrome pulmonar hemorrágico por leptospirosis, se han encontrado depósitos de inmunoglobulinas y de la fracción C3 del complemento en la superficie de los alvéolos. Además, la sobreproducción de los derivados del óxido nítrico explica el daño de los vasos sanguíneos y la

infiltración celular que desencadena la neumonía intersticial con edema franco y hemorragia (Croda et al., 2010).

Los resultados de esta investigación son similares a los reportados por Agudelo et al. 2014, en Medellín, Colombia, en un estudio experimental en hámster, realizado tras la inoculación intraperitoneal de un aislado obtenido a partir de un hemocultivo de un paciente. Ellos encuentran como hallazgos histopatológicos en el tejido del pulmón congestión y hemorragia alveolar, y a nivel del riñón describen congestión y glomerulonefritis con necrosis tubular aguda. Por otra parte Zhang et al, 2012, reportan congestión y hemorragia alveolar a nivel pulmonar y necrosis tubular aguda en riñón.

Similares reportes obtienen también Lemus et al., 2017, en una investigación experimental en rata Wistar gestantes inoculadas con leptospiras realizada en Pinar del Río, Cuba. Se inoculó por vía intraperitoneal 2 mL que contenían 3×10^6 leptospiras/mL de leptospiras de los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola y Pomona. Entre los daños en los órganos estudiados se describió el predominio de trastornos circulatorios con vasculitis, congestión y hemorragias en hígado, pulmón y riñón.

Según lo reportado por Sacc et al. 2006, en Bogotá, Colombia, en un estudio de un fallecido, que a pesar de su tratamiento tuvo un desenlace fatal, se observaron alteraciones histológicas caracterizadas por disociación de hepatocitos con cambios reactivos y necrosis focal a nivel hepático; en el riñón, engrosamiento de las asas capilares, con infiltrado linfoplasmocitario intersticial; y en el parénquima pulmonar edema intraalveolar, congestión y leve infiltrado inflamatorio linfocitario, similares hallazgos encontrados en esta investigación.

Para la patogénesis de las anomalías pulmonares en la leptospirosis se han postulado dos mecanismos, uno asociado a toxinas de leptospira y otro mediado por la respuesta inmune del huésped. El mecanismo asociado a toxina surge a partir del estudio de los tejidos pulmonares, los cuales muestran un recuento mucho menor de leptospiras que los hallados en tejido hepático o renal, lo que sugiere una exposición a toxinas circulantes producidas en sitios distantes.

El segundo mecanismo surge de algunos estudios que demuestran que títulos altos de IgG mayores a 400 se asocian a manifestaciones más severas de la

enfermedad tanto a nivel pulmonar y renal, lo cual pondría en evidencia que hay un relación de la severidad de la enfermedad con la intensidad de la respuesta inmune del huésped frente a las leptospiras.

Esta investigación, en sentido general es pionera en el estudio de las cargas bacterianas por leptospiras en órganos diana de la infección por este agente en humanos fallecidos por leptospirosis, su relación con los daños histológicos y su traducción en manifestaciones clínicas específicas de cada órgano afectado, existiendo solo información a partir de estudios experimentales en modelos animales. Los resultados de este estudio permiten comprobar y aceptar la hipótesis propuesta, resaltando la necesidad de incluir de forma definitiva al pulmón junto a riñón e hígado como los órganos dianas principales para la infección por leptospiras patógenas.

V. Conclusiones

1. Se verifica la afinidad de las leptospiras patógenas por riñón, hígado y pulmón; con cargas bacterianas superiores en hígado seguido de pulmón y riñón (aunque no soportado estadísticamente). Esto demuestra el nivel de infección por leptospiras en los órganos estudiados.
2. La presencia de leptospiras, con independencia de la carga bacteriana, en hígado y pulmón se relaciona con la aparición de sintomatología hepática y respiratoria; mientras que la presencia de la bacteria en riñón no se traduce necesariamente en manifestaciones clínicas renales.
3. La presencia de leptospiras en los órganos estudiados supone la aparición de daños histológicos, con independencia de la carga bacteriana, los que pueden conllevar a la muerte del paciente.

VI .Recomendaciones

1. Extender el estudio en el tiempo en aras de incrementar el número de muestras.
2. Implementar estudios de caracterización molecular del agente causal en fallecidos por leptospirosis humana.

VII .Referencias Bibliográficas

- ✚ Abgueden P, Pichard E. Leptospirosis. Rev Prat 2009; 59: 665-73.
- ✚ Abuauad MC, Osorio G, Rojas JL, Pino L. Leptospirosis: presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. Rev Chil Infect 2005;22(1):93-97.
- ✚ Acha PN, Scyffres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales [Internet]. Washington, DC: OPS; 2001 [citado 23 diciembre de 2009]. Disponible en: <http://www.infosalud.com.mx/Publicaciones/pc0580B>.
- ✚ Adler B, de la Peña M. *Leptospira* and Leptospirosis. Vet Microbiol 2009; 2:4382-92.
- ✚ Adler B, De la Peña A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 2010; 140(3-4):287-296.
- ✚ Adler B, De la Peña Moctezuma . *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 2010, v.140, n.3-4, p.287-296,
- ✚ Adler, B. (2015) *Leptospira* and Leptospirosis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ✚ Adler, B.; Lo, M.; Seeman, T. et al. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. Vet Microbiol, v.153, n.1-2, p.73-81, 2011.
- ✚ Agampodi BD, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of Quantitative Polymerase Chain Reaction in Leptospirosis Diagnosis: Association of Level of Leptospiremia and Clinical Manifestations in Sri Lanka. Clin Infect Dis 2012; 54(9):1249–55.
- ✚ Agudelo P, Durango H, Aranzazu D, Rodas JD, Travi B. Genotipificación y evaluación de la dinámica de infección de un aislamiento colombiano de *Leptospira santarosai* en el modelo experimental en hámster; Biomédica 2014; 34:460-72.
- ✚ Alan R, Arlene E, Kalani H, Sarah Y, Paul V. Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999-2008. Hawaii State Department of Health, Honolulu. 2011; 17(2):221-6.

- ✚ Alarcón, J.O.; Romani, F.; Tejada, R.A. et al. Seroprevalencia de leptospirosis y características asociadas en agricultores de arroz de una región tropical del Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, v.31, n.2, p.195-203, 2014.
- ✚ Andre-Fontaine G, Aviat F, Torin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water . *CurrMicrobiol* (2015) 71(1):136–142 Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-015-0836-4>
- ✚ Andre-Fontaine G, Aviat F, Torin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water . *CurrMicrobiol* (2015) 71(1):136–142 Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00284-015-0836-4>.
- ✚ Anuario estadístico de salud 2018.
- ✚ Araujo ER. Acute kidney injure in human leptospirosis: an immunohistochemical pathophysiological correlation. *Virchow Arch*. 2010; p. 456:367.
- ✚ Assimakopoulos S.F, Fligou F, Marangos M, Zotou A, Psilopanagioti A, Filosk S. Anicteric leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome: a case series study. *Am J Med Sci* 2012;344(4):326-29.
- ✚ Avila JL, Escalona R, Rodríguez Y. Método práctico para el control de la leptospirosis. *Correo Científico Médico de Holguín*. 2010; 14(2).
- ✚ Badell LE, Achón García M, Varen Alvarez A, Badell Taquechel E, Morales Pérez NF, Bolaños Valladares T. Aspectos clínicos y epidemiológicos de pacientes con leptospirosis en Cienfuegos. 2001-2010. *Medisur* [Internet] 2014 [citado 6 ago 2015];12 (4): [aprox. 9 p.]. Disponible en: <http://medisus.sld.cu/index.php/medisur/article/view/2731/1495>.
- ✚ Badell LE, Achón M, et al. Aspectos clínicos y epidemiológicos de pacientes con leptospirosis en Cienfuegos. 2001-2010. *Medisur* 2014;V12(4):601-608.
- ✚ BAL AM. Unusual clinical manifestation of leptospirosis. Department of Medical Microbiology. Aberdeen Royal Infirmary, Scotland, United Kingdom *Symposium* 2005; 51(3):179-183.

- ✚ Balassiano IT, Vital-Brazil JM, Pereira MM. Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: a new tool for early diagnosis and epidemiologic surveillance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(1):11-5.
- ✚ Barreto, G. , Rodríguez H, (2012). La nomenclatura científica en el caso particular de Salmonella. *Rev. prod. anim.*, 24 (2), 12-16.
- ✚ Bartlett J.M.S.,Stirling D.2003 A Short History of the Polimerase Chain Reaction.In :Bartlett J:M:S.,Stirling D.(eds) PCR Protocols.Methods in Molecular Biology, Vol 226 .Humana Press.
- ✚ Basile G. Epidemiología de la leptospirosis en República Dominicana: entre el urbanismo inequitativo, alta letalidad desigual y sistemas de respuesta ineficaces [Internet]. Buenos Aires: CLACSO; 2017. [cited 3 May 2018] Available from: Malne J, Pryor J, Lusangulira K. Leptospirosis in Ponpei (1986-1995). A case series in the use of dopamine/steroid for Weil`s syndrome. *Pacif Health Dialog.* 1996; 3:p. 153-61.
- ✚ Belg. *J.Zool.*135(supplement):17:19
- ✚ Benacer, D.; Lin, T.K.; Choung, M.N. et al. Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004-2012. *Acta Tropica*, v.157, p.162-168, 2016.
- ✚ Bernal J, Cañete Villafranca R, Martínez Sánchez R, Suárez Delgado O, López Piñera O.Leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop.* 2002;54(1):15-20.
- ✚ Bertherat E, Mueller MJ, Shako JC, Picardeau M. Discovery of a leptospirosis cluster amidst a pneumonic plague outbreak in a miners camp in the Democratic Republic of the Congo. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2014 Feb [citado 18 ago 2015]; 11 (2): [aprox. 8 p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3945570/>
- ✚ Bessetti J. An Introduction to PCR Inhibitors. Promega Corporation. 2007.
- ✚ Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(12): 757-71.
- ✚ Biswas D, Roy S, Vijachari P, Sugunan AP, Nararaja seenivasan K, Sehgal SC. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of *Leptospira* in Andaman Islands, India. *Indian J Med Res* 2005; 121:151-8. 8.

- ✚ Branda N, Aguirre MV, Gimenez CE. Hemoglobina. 2008. Cátedra de Bioquímica Facultad de Medicina –UMNE. Disponible en www.academia.edu.
- ✚ Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, Andre-Fontaine G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243:437-45.
- ✚ Braunwald E, Franci AS, Kasper DL, Hanser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*. 15ta ed. New York: Mc Graw-Hill; 2001.
- ✚ Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;2:375-80.
- ✚ Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14560-5.
- ✚ Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34:597-601.
- ✚ Caíno H, Scaglia J, Curcio F, Siquiroff G. Leptospirosis. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*. 2006; 1(3):30-6.
- ✚ Cairo JM, Vazquez A. Mortalidad por leptospirosis en la provincia de la Habana 1999-2016. *Convención internacional de salud, Cuba salud*. 2018.
- ✚ Campos N. Leptospirosis Reporte de un caso. *Med. leg. Costa Rica* vol.31 n.2 Heredia Sep./Dec. 2014.
- ✚ Cao Y, Faisal SM, Yan W, Chang YC, McDonough SP, Zhang N, et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster.
- ✚ Carrada T. Leptospirosis humana: historia natural, diagnóstico y tratamiento. *Rev Mex Patol Clin*. 2005;52(4):246-56.
- ✚ Carvajal Gutiérrez V, Murillo O, Campo N, Barrantes Boza M. Anemia hemolítica autoinmune con prueba de Coombs negativa. *RMSS (Internet)*. (actualizado 20 feb 2010; citado 16 mar 2010). Disponible en: <http://www.Binasss.sa.cr/revistas/rmcc/552/art8.htm>.

- ✚ Carvalho, E., Barbosa, A., Gomez, R. Cianciarullo, A., Hauk, P., Abreu, P., Fiorini, L., Oliveira, M., Romero, E., González, A., Morais, Z., Vasconcellos, S., y Ho, P. (2009) Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett*, 583, 1381–1385.
- ✚ Castiblanco –Valencia MM, Rodríguez L. La plasmina escinde el fibrinógeno y las proteínas C3b y C5 del complemento humano en presencia de proteínas *Leptospira interrogans*: un nuevo papel de LigA y LigB en la invasión y la evasión inmune del complemento. *Inmunobiol* 2016; V221, (5): 679-689.
- ✚ CDC ; CS287535E 26 enero 2018.
- ✚ Cerar T, Ruzić-Sabljić E, Glinsek U, Zore A, Strle F. Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp. in patients with erythema migrans. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 653–8.
- ✚ Céspedes M, Sihuincha M, Pachas P. Determinantes Ambientales y sociales para la Reemergencia de la Leptospirosis en la Región Amazónica del Perú. (Spanish). *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública* [revista en internet]. 2012 Apr [citado 5 de diciembre 2014]; 29(2): 280-284. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342012000200020&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- ✚ Céspedes M. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* [Internet]. 2005 [citado el 24 de enero de 2010]; 22(4): 290-307. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php>
- ✚ Chagas AD. et al., Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. February 2012 ; V 7(2), e32712.
- ✚ Chamizo García H, Cruz de la Paz R, Borroto Ponce R. Estudio geoepidemiológico de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 1996; 34(1): 15-22.
- ✚ Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett A, Grange T, Geigl EM. An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PlosOne* 2010; 5(9): 1-14.

- ✚ Chandy S, Boorugu H, Chrispal A, Thomas K, Abraham P, Sridharan G. Hantavirus infection:a case report from India. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27:267-70.
- ✚ Chin J. *El control de las enfermedades transmisibles*. 17a. ed. Washington DC: OPS; 2005.
- ✚ Chin J. *El control de las enfermedades transmisibles*.17ma. ed. Washington, DC.: OPS; 2001.
- ✚ Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun* 2007;75:2441-2450.
- ✚ Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in an endemic region with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:343.
- ✚ Colectivo de autores. Programa Nacional de Prevención y control de la leptospirosis Humana.(2da versión).la Habana :ministerio de salud pública;1997.
- ✚ Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgeson P, Martínez MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;17:9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- ✚ Coutinho ML , Matsunaga J , Wang LC ,de la Peña Monctezuma A , Lewis MS ,Babbitt TJ, et al. Kinetics of *Leptospira interrogans* Infection in Hamster after Intradermal and Subcutaneous Challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. [Internet]2015;2014 [Citado 27 de febrerode 2017];8(11). Disponible en:<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.000330>.
- ✚ Croda J, Neto A, Brasil A, Pagliari C, Nicodemo A, Duarte M. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:593-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02916.x>
- ✚ Croda J, Neto A, Brasil A, Pagliari C, Nicodemo A, Duarte M. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:593-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02916.x>.

- ✚ Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethn Dis.* 2009;19(1 Suppl 1):S37-41.
- ✚ Cruz R. Estrategia cubana para el control y prevención de la leptospirosis en Cuba. *Rev Latinoam Microbiol* 2002; 44 (Supl): 22.
- ✚ Cuba Y, Gainza N, Batista N, Saltaren A, Naranjo M. Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* para su uso en vacunas veterinarias. *VacciMonitor* 2016;25(1):5-11.
- ✚ Cullen P, Haake D, Adler B. Outer membrana proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Reviews* 2004; 28:291-318.
- ✚ D'Andrea A, Zamora Y, Alduina R, Monteverde V, Fernandez C, Vitale M. Comparison of two PCR methods for detection of *Leptospira interrogans* in formalin-fixed and paraffinembedded tissues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:85-8.
- ✚ Daher EF;nogueira,CB,Evaluation of penicillin therapy in patients with leptospirosis and acute renal failure. *Rev. Inst.med. Trop. S-paulo* 42(6):pp 327-33, 2000.
- ✚ Dassanayake DL, Wilmalaratna H, Agampodi SB, Liyanapathirana TA, Goonapienuwala BL. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis.* 2009;9:48-55.
- ✚ Day N. Epidemiology, microbiology, clinical manifestations and diagnosis of leptospirosis, 2017. Fecha de consulta: 2 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-microbiology-clinical-manifestations-and-diagnosis-of-leptospirosis>.
- ✚ De Armas Y, Capó V, González E, Mederos L, Díaz R. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. *Rev Esp Patol* 2006; 39:171-4.
- ✚ De Francesco Daher E, Soares de Abreu K, da Silva Junior GB. Leptospirosis associated acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2010;32(4):400-7.

- ✚ de Vries SG, Visser BJ, Nagel IM, Goris MG, Hartskeerl R, Grobusch MP. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: A systematic review. *Int J Infect Dis.* 2014;28:47-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.06.013>.
- ✚ Delgado F, Brihuega B, Venzano A, Funes D, Blanco F, Auteri C et al. Adaptación de un protocolo de histoquímica para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de tejido fijado en formaldehído. *Rev Cubana Med Trop* 2007; 59(1):14-8.
- ✚ Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CRR. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz J Inf Dis.* 2007;11(1):142---8. Available from: www.bjid.com.br
- ✚ Dupouey, J.; Faucher, B.; Edouard, S. et al. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.37, p.77-83, 2014.
- ✚ Echeverri-Toro LM, Penagos S, Castañeda L, Villa P, Atehortúa S, Ramírez F, et al. Características sociodemográficas y clínicas de pacientes con infección por *Leptospira* spp. atendidos en cuatro centros hospitalarios de Medellín, Colombia 2008-2013. *Biomédica.* 2017;37:62-7. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3280>.
- ✚ Edwaed CN, Everard CR. Hyperamylasemia and pancreatitis in leptospirosis. *Am J Gastroenterology.* 1991; 86:p. 1665-68.
- ✚ Ellis T., Imrie A., Katz A., Effler P. Underrecognition of leptospirosis during a dengue fever outbreak in Hawaii, 2001-2002. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8(4):541-7.
- ✚ Elsie A. Wunder, Jr.,a,b Claudio P. Figueira,b Gisele R. Santos,b Kristel Lourdault,c,d Michael A. Matthias,e Joseph M. Vinetz et al. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters ,*Infection and Immunity* 2016, V 84 (7).
- ✚ Evangelista K, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology* 2010;5(9)1413-25.

- ✚ Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 2010; 5(9):1413–25.
- ✚ Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva: World Health Organization; 2003.
- ✚ Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: Medisci; 1999.
- ✚ Farreras-Rozman. *Medicina Interna*. 13 th. ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2011.
- ✚ Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, editors *Harrisons Principles of internal medicine*, et al. 7ma ed. New York: McGraw-Hill; 2008.
- ✚ Fernández L , Arencibia D, Batista N, Jirón N, Infante B. Estudio anatomopatológico de aislados de *Leptospira* spp., provenientes de Nicaragua en *Mesocricetus auratus* como biomodelo. *Rev. MVZ Córdoba* 18(2):3484-3491, 2013.
- ✚ Gallegos MA, Sandí VL. *Leptospirosis*. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 2010; LXVII (592)115-21.
- ✚ Galloway RL, Levett PN. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *Plos Negl Trop Dis*. 2010; 14: e 824.
- ✚ Gangadhar NL, Prabhudas K, Bhushan S, Sulthana M, Barbuddhe SB, Rehaman H. *Leptospira* infection in animals and humans: A potential public health risk in India. *Rev Sci Tech*. 2008; 27(3):885-92.
- ✚ García R, Reyes A.; Basilio D. et al. *Leptospirosis; un problema de salud pública.. Rev Lat de Patol Clín y Med de Lab*, v.60, n.1, p.57-70, 2013.
- ✚ García R, Ruz M, García M, Marín D. *Leptospirosis con anemia hemolítica microangiopática. Presentación de un caso. Hospital "Abel Santamaría". Rev de Cien Méd [Internet]. 2011 ene-mar. [citado 8 abr. 2013]; 15(1) : (aprox. 8p.). Disponible en: <http://publicaciones.pri.sld.cu/index.thp/publicaciones/article/view/751/1404>.*
- ✚ García R. *Leptospirosis humana*. La Habana: Edi Cient Téc; 2009.

- ✚ Garcia, L.; Forster, K.; Jorge, S. et al. Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine fetus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.40, p.41-45, 2015.
- ✚ Garrity GM, Winters M, Searles DB. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Bergey's Manual Trust; 2001.
- ✚ Goldman L, Ausiello D, editores *Cecil Medicine*. 23ra ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
- ✚ Gomez-Roman JJ. Hemorragias alveolares difusas pulmonares. *Arch Bronconeumol*. 2008; 44:428-36.
- ✚ González M, Martínez R, Cruz de la Paz R, Infante JF, González I, Baró M y colaboradores. vax-SPIRAL. Vacuna antileptosirósica trivalente para uso humano, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2004; 2(2):107-111.
- ✚ Goonapienuwala BL. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis*. 2009;9:48-55.
- ✚ Goris MG, Leeflang MG , Loden M, Wagenaar JF, Klatser PR, Hartskeerl RA, et al. Prospective Evaluation of Three Rapid Diagnostic Tests for Diagnosis of Human Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):2290.
- ✚ Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho AL, Aires TS, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2008;14:505-8.
- ✚ Gravekamp C, van de Kemp H, Carrington D, van Eys GJJM, Everard COR,
- ✚ Groot K, Harper L, Jayne DR, Flores Suarez LF, Gregorini G, Gross WL et al; EUVAS. Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009; 150; 670-80.
- ✚ Guerra MA. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc*. 2009;234:472-8.

- ✚ Haake DA, Levett PN. (2015) Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol - Springer.*;387:65–97.
- ✚ Haake D A, Matsunaga J, Leptospiral membrane proteins- variation on a them? India. *Indian J Med Res* 2005.
- ✚ Haake D.A, Matsunaga J. *Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. Molec Microb* 2010; 77(4):805–14.
- ✚ Haake D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology.* 2000;146:1491-504.
- ✚ Haake D.A., Levett P.N. 2015 Leptospirosis in humans. *Curr Trop Microbiol Immunol [Internet]* 2015 [citado 11 ago 2015]; 387: [aprox. 21 p.] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442676>.
- ✚ Haake D.A1, Zückert WR. The leptospiral outer membrane. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015; 387:187-221. doi: 10.1007/978-3662-45059-8_8.
- ✚ Haake DA, Chao AG, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000; 68:2276-85.
- ✚ Haake DA, Levett PN. leptospirosis in humans. *Curr Trop Microbiol Duany Badell LE, Achon García M, VarenAlvarez A, Badell Taquechel E, Morales perez NF, Bolaños Valladares T. Aspectos clínicos Epidemiológicos de pacientes con leptospirosis en Cienfuegos 2001-2010. Medisur* 2014; 12(4).
- ✚ Hanvanich M, Moollaor P, Suwangool P, Sitprijja V. Hemolytic uremic syndrome in leptospirosis bataviae. 1985; 40 (2):p. 230-31 severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol.* 2004; 164(3):p.1115-27.
- ✚ Harrison, T. 2006. *Principios de Medicina Interna (16° ed.)*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- ✚ Hartskeerl RA, Pereira MC, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):494-501.

- ✚ Helmerhorst HJ, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP et al. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med* 2012;70:215-21.
- ✚ Herath, N., Kularatne, S., Weerakoon, K., Wazil, A., Subasinghe, N. y Ratnatunga, N. (2014) Long term outcome of acute kidney injury due to leptospirosis? A longitudinal study in Sri Lanka. *BMC Res Notes*, 7, 398.
- ✚ Hoorfar BM, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J Clin Microb* 2004;1863-8.
- ✚ Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;24:e300.
- ✚ Houwers DJ, Wagenaar JA, Hartskeerl RA, Hautvast JL, Stinis HP, Ruijs WL, et al. Leptospirosis (Weil disease) in a dog: a risk for people? *Tijdschr Diergeneeskd.* 2009;134:392-4.
- ✚ Hugo Álvarez V. Protocolo de vigilancia de Leptospirosis: Vigilancia y control en salud pública.(publicación periódica en línea) 2013
http://www.idesac.gov.co/files/archivos_pdf/leptospirosis%20protocolo.pdf
- ✚ *Infection* February 2019, Volume 47, Issue 1, pp 125–128 | Cite as Síndrome de hemorragia pulmonar severa en la leptospirosis en un viajero que regresa.
- ✚ International Committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of Leptospiraceae. (2014). Minutes of the closed meeting. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (1), 71-72.
- ✚ Jain AP, Narang P, Dey S, Mendiratta DK. Leptospirosis. A case report. *Indian J Pathol Microbiol.*2003;46(3):p.432-33.
- ✚ Jiménez JIS, Marroquin JLH, Richards GA, Amin P. Leptospirosis: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *J Crit Care.* 2018 Feb;43:361-365.

- ✚ Jobbins SE, Sanderson CE, Alexander KA. *Leptospira interrogans* at the Human– Wildlife Interface in Northern Botswana: A Newly Identified Public Health Threat. *Zoonoses and Public Health*. 2013;61(2):113-23.
- ✚ Juan Manuel Lemus Quintana¹, Hildefonso Cabezas Alfonso², Isvel Zaldívar Garitt³, Eilín Armas González⁴, Yerani Ramos Chang⁵ et al. Observaciones clínico patológicas en ratas Wistar gestadas infectadas experimentalmente con leptospiros Rev. Ciencias Médicas de Pinar del Río. Mayo-junio, 2017; vol 21(3)
- ✚ Kendall EA, La Rocque CR, Bui DM, Galloway R, Ari MD, Goswami D, et al. Leptospirosis as a Cause of Fever in Urban Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010;82(6):1127-30.
- ✚ Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:736-47.
- ✚ Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson WD, Riley LW, et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brasil. *Lancet*. 1999;354:820-5.
- ✚ Koizumi N, Gamage CD, Muto M, Kularatne SA, Budagoda BD, Rajapakse RP, et al. Serological and genetic analysis of leptospirosis in patients with acute febrile illness in kandy, Sri Lanka. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62:474-5.
- ✚ Kokudo T, Nakamura I, Nakamura-Uchiyama F, Komiya N, Ohnishi K. Weil's disease in a patient living in Tokyo. *Intern Med*. 2009;48:1707-10.
- ✚ Krojgaard LH, Villumsen S, Markussen MD, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect* 2009; 137: 1586-92.
- ✚ Kubista M, Andrade JM, et al. ;The real time polymerase chain reaction; *Mol.Aspects Med*. 2006.27(2-3) 95-125. Epub 2006.
- ✚ Kumar P, Clarrk M. eds , *Clinical Medicine*. 7thed. London: Sauder Elsevier; 2009.
- ✚ La Rocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, (2005) Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg infect dis*. 2005 ; 11: 766–769. PMID: 15890136.

- ✚ Laplume H, Sardi F, Samartino L, Vanasco B, San Juan J, Farace M, et al. Enfermedades infecciosas. Leptospirosis, Guía para el equipo de salud. Argentina: Ministerio de Salud, Dirección de Epidemiología; 2014.
- ✚ Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Gene* 2000;254:19-28.
- ✚ Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. Leptospirosis pathogenomics. *Pathogens* 2014 Apr 10;3(2):280-308. doi: 10.3390/pathogens3020280.
- ✚ Lemus JM, Cabezas H, Zaldívar I, Armas E, Ramos Y, et al. Observaciones clínico patológicas en ratas Wistar gestadas infectadas experimentalmente con leptospiras. *Rev. Cien. Méd de Pinar del Río*. Mayo-junio, 2017; vol 21(3)354-361.
- ✚ Lessa-Aquino C, Lindow JC, Randall A, Wunder E, Pablo J, Nakajima R, et al. Distinct antibody responses of patients with mild and severe leptospirosis determined by whole proteome microarray analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):1–18.
- ✚ Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospirae by real-time quantitative PCR. *J Med Microb* 2005; 54:45–9.
- ✚ Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2): 296-326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296326.2001.
- ✚ Levett PN. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clin Appl Immunol Rev* 2001; 4(6): 435-448.
- ✚ Levett, P.N. Systematics of Leptospiraceae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 38(1):11-20.
- ✚ Loffler S, Pavan M, Vanasco B, Samartino L, Suarez O, Auteri C, et al. Genotypes of pathogenic *Leptospiras* spp. isolated from rodents in Argentina. *Rio Janeiro :Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;1-5.

- ✚ Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser AS, Lescalkzo J. Harrison`s Principles of Internal Medicine. 18 th ed. E.U.A.: Mc Graw- Hill Companies; 2012.
- ✚ LuksAM, Lakshminarayanan S, Hirschmann JJ. Leptospirosis presenting as diffuse alveolar hemorrhage: case report and literature review. Chest. 2003;123:639---43.
- ✚ Lunn,K.F.(2015).overview of Leptospirosis.The Merck Veterinary Manual.Recuperado el 15 de enero de 2017,de [http:// www.merckvet manual.com/mvm/generalized_conditions/leptospirosis/overview_of_leptospirosis.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/generalized_conditions/leptospirosis/overview_of_leptospirosis.html).
- ✚ M. Cecilia Abuauad A, Guido Osorio S, Juan L. Rojas P y lorena Plno V. Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura, Rev Chil Infect 2005; 22 (1): 93-97.
- ✚ Machado ES, Feres JG, Feijo LA: Is CK- MB isoenzine useful for diagnosis of cardiac involment in icteric leptospirosis.? Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1995; 37 (5):p. 461-65.
- ✚ Machado ES,Feres JG,Feijo LA.Is CK-MB isoenzine useful for diagnosis of cardiac involment in icteric leptospirosis?.Rev Inst Med Trop Sao Paulo.1995;37(5):461-65.
- ✚ Malajov Y, Panin A, Sovoliova G. Leptospirosis de los animales. 3ra. ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, Cuba; 2007.p.24-53.
- ✚ Malmstrom, J., Beck, M., Schmidt, A. Lange, E., DeutschW. y Aebersold, R. (2009) Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. Nature, 460, 762–765.
- ✚ Manipol-Larano RJT, Danguilan RA, Santos S, Chavez J, Mendoza MT (2014) Effect of Methylprednisolone and Cyclophosphamide on the
- ✚ Manu V, Roy S, DuttaRoy AR, Sharma S, Vijayachari P, Kataria VK, Seghal SC. PCR on formalin-fixed necropsy tissues to diagnose leptospirosis. Indian J Med Res 2009; 129: 105-7.
- ✚ Marchiori E, Lourenco S, Setúbal S, Zanetti G, Gasparetto T, Hochhegger B. Clinical and imaging manifestations of hemorrhagic pulmonary leptospirosis: A

state-of-the-art review. *Lung*. 2011;189:1-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-010-9273-0>

✚ Marchiori E, Lourenco S, Setúbal S, Zanetti G, Gasparetto T, Hochhegger B. Clinical and imaging manifestations of hemorrhagic pulmonary leptospirosis: A state-of-the-art review. *Lung*. 2011;189:1-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-010-9273-0>

✚ Marco torres-castro, Bayron Cruz-Camargo, Rodrigo Medina-Pinto, Bibiana Reves-Hernandez Carlos Molecular detection of pathogenic leptospira in Synanthropic and wild rodents captured in Yucatacán, Mexico. *Biomedica* 38,51-58,2018.

✚ Marquez-Martín E, Valera-Bestard B, Luque-Marquez R, Alarcón-Gonzalez A. Afectación pulmonar en la leptospirosis. *Arch Bronconeumol*. 2006;42:202-4.

✚ Marquez-Martin, Valera-Bestard, Luque-Marquez, Alarcon-Gonzalez. Afectación pulmonar en la leptospirosis Lung Involvement in Leptospirosis *Arch de Bronconeumol*. 2006; V42 (4) p202-204.

✚ Martín Suárez I, Escalera Zalvide A. Protocolo diagnóstico de la hemorragia pulmonar. *Medicine*. 2009; 10:2096-9. [Links]

✚ Martinelli RM, Luna A, Rocha H. Is rhabdomyolysis an additional factor in the pathogenesis of acute renal failure in leptospirosis? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Trop Microbiol Immunol* [Internet] 2015 [citado 11 ago 2015]; 387: [aprox. 21 p.] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4442676> 94;36 (2):p.111-14

✚ Martínez R, Obregón AM, Pérez A, Baly A, Díaz M, Baró M, et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(2):159-66

✚ Martínez R, Pérez A, Quiñones MC, Cruz R, Álvarez AM, Armesto M, et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Rev Panam Salud Pública*. 2004;15(4):249-55.

✚ Medeiros FD. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop*. 2010; p.115:155.

- ✚ Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 139-47.
- ✚ Mesén AG, Sandí LV. Leptospirosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 2010;LXVII(592):115-21.
- ✚ Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud en Cuba. La Habana: MINSAP; 2013 [citado 30 Abr 2014]. Disponible en: <http://files.sld.cu/dne/files/2014/05/anuario-2013-esp-e.pdf>
- ✚ Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis Humana. Ciudad de La Habana: MINSAP; 1998.p.1-33.
- ✚ Mir NI, Ramírez NM, Huergo SV, Ramírez NA. Leptospirosis humana: revisión de tema [Internet].[citado el 10 de febrero de 2010]. Disponible en:<http://www.uvfajardo.sld.cu/Members/loana/leptospirosis-humana-revision-detema/Universidad Virtual Fajardo.htm>.
- model. *Vaccine*. 2011;29:7379-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.070>
- ✚ Monsuez JJ, Kidouche R, Le Gueno B, Postic D. Leptospirosis presenting as haemorrhagic fever in visitor to Africa. *Lancet* 1997; 349(9047): 254-55.
- ✚ Moreno N, Agudelo P. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Revista Peruana Medicina Experimental Salud Pública* 2010;27:548-56.
- ✚ Morgan AG, Cawish F. Ascending polyneuropathic in leptospirosis. A case study. *Ann Trop Parasit*. 1980; 4 (5):p. 567-68.
- ✚ Murray GL. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol*. 2013;162(2-4):305-14.
- ✚ Murray, G. (2013) The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol*, 162, 305–314.
- ✚ Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):245-52.

- ✚ Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Da Silva JJ, et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol.* 2004;164:1115---27.
- ✚ Nally JE, Chantranuwat X, Wu X, Fishbein MC. Alveolar septal seposition of inmunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of 22. Martinelli RM, Luna A, Rocha H. Is rhabdonyolisis an additional factor in the patogénesis of acute renal failure in leptospirosis? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994;36 (2):p.111-14.
- ✚ Narayanavari SA, Lourdault K , Sritharan M , Haake DA , Matsunaga J, Role sph2 Gene Regulation in Hemolytic and Sphingomyelinase Activities Produced by Leptospirainterrogans. *PLoS Negl Trop Dis.* [Internet] 2015;2015 Ago [Citado 7 de febrero de 2017]; 9(8): [Aprox. 6p.]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003952>.
- ✚ Narayanavari SA, Sritharan M, Haake DA, Matsunaga J. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). *Microbiology* 2012;158:1137-46.
- ✚ Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, VanSluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:459-77. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride FW, Figueira CP, Huerre M, Ave P et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog* 2007;3:e97.
- ✚ Nhan TX, Bonnieux E, Rovey C, De Pina JJ, Musso D. Fatal leptospirosis and chikungunya co-infection: Do not forget leptospirosis during chikungunya outbreaks. *IDCases.* 2016;5:12-4. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.06.003>
- ✚ Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, Takakura CF, Santos RT, Nicodemo EL. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:181-7.
- ✚ Noda AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Obregón AM. Evaluación de una PCR para la confirmación molecular de leptospirosis en fallecidos a partir de tejidos frescos. *Rev Cubana Med Trop.* 2014a;66(3):447-52.

- ✚ Noda AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón AM. High sensitive PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin embedded tissues. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014b;56(5):411-15.
- ✚ Obregón AM, Martell M. Diagnóstico serológico de la leptospirosis humana mediante tres variantes de la técnica de hemoaglutinación pasiva. Rev. Cubana Med Trop. 1999;51(1):60-2.
- ✚ Obregón Fuentes AM, Fernández Molina C, Martínez Motas I, Llop Hernández A, Rodríguez González I, Rodríguez Silveira J, et al. Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2011 Dic [citado 17 May 2014];63(3):239-45. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03757602011000300007&lng=es
- ✚ OGE/INS. (2000). Leptospirosis. Módulos Técnicos. Serie Documentos Monográficos N°2. p. 56. Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/m%C3%B3dulo%20t%C3%A9cnico%20%20leptospirosis.pdf>
- ✚ Oliva R. et al. Pathologic-Clinical characterization of Leptospirosis in a Golden Sirian Hamster Model. Archives of Medical Research 1994; 25(2):165-170.
- ✚ Oliveira DS, Guimarães MJ, Portugal JL, Medeiros Z. The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. Ann Trop Med Parasitol. 2009;103:149-57
- ✚ OMS. Ébola virus Disease. Nota descriptiva número 103 [Internet]. 2014 [citado 27 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/es/>
- ✚ OMS. Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2003 [citado 2014 Abr 30]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=19119&Itemid=2518&lang=en

- ✚ OMS. leptospirosis Humana; Guía para el diagnóstico ,vigilancia y control. Ginebra:OMS,2003.
- ✚ OPS/OMS. Fiebre Chikungunya. Información para proveedores de asistencia sanitaria. Ayuda memoria [Internet]. 2014 [citado 3 Nov 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/es/>
- ✚ Organización Mundial de la Salud. (2008). Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Recuperado el 28 de junio de 2014, de <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/guia-esp.pdf>.
- ✚ Ortega LM. Leptospirosis Humana: pautas para su prevención y control. (eds) Dampsa: La Habana / Panama; 2012.
- ✚ Osés R, Bonet J, Cerero O, Saura G, Pedraza A. Evaluación del comportamiento de la leptospirosis humana mediante un modelo matemático atendiendo a variables climáticas como predictoras. REDVET. 2010;11(3B): Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
- ✚ Pamplona E, Ribeiro Carvalho CR. Pulmonary leptospirosis. Curr Opin Pulm Med. 2000;6:436---41.
- ✚ Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. Int J Infect Dis 2008;12:351-7.
- ✚ Pelczar, M. J. y Reid, R. D. (1966). Microbiología. España: Ediciones del Castillo, S. A
- ✚ Pereira M, Pereira J, Pinto M, França da Silva M, Machado M, Lenzi H, et al. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. Am J Trop Med Hyg. 2005;72:13-20.
- ✚ Pérez Y; Obregón A; Rodríguez I; Alfonso MJ; Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana; 2015. Rev Cub de Med Mil. 2015;44(4):416-427.
- ✚ Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into

the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One* 2008;13:e1607.

✚ Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal Infect.* 2013;43(1):1-9

✚ Picardeau, M., & Bertherat, E. 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*

✚ Pinne M, Haake DA. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS One* 2013;8(1):e51025. doi: 10.1371/journal.pone.0051025.

✚ Poitras E, Houde Alain, 2002. PCR en tempo real. Principes et applications V(2). *Rewies in Biology and biotechnology.*

✚ Pol S, Bharadwaj R. Evaluation of high performance liquid chromatography purified leptospiral antigen for the diagnosis of leptospirosis. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62:428-31.

✚ Pulido Villamarín A, Carreño Beltrán G, Mercado Reyes M, Ramírez Bulla P. Situación epidemiológica de la leptospirosis humana en Centroamérica, Suramérica y el Caribe. *Univ. Sci.* 2014, 19 (3): 247-264. Disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/9100>.

✚ Radstrom P, Lofstrom C, Lovenklev M, Knutsson R, Wolffs P. Strategies for overcoming PCR inhibition. In C. W. Diefenbach and G. S. Dveksler (ed.), *PCR primer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2003, p. 149–161. *champlot*

✚ Ram P, Chandra MS. Unusual electrocardiographic abnormality in leptospirosis. Case report. *Angiology* 1985; 36 (7):p. 477-82.

✚ Ram P, Chandra MS. Unusual electrocardiographic abnormality in leptospirosis. Case report. *Angiology* 1985;36(7):477-82

✚ Ratram S. A manual on leptospirosis: a hazardous disease of pet and dear. Madras: Tamilnada Veterinary and Animal Sciences University; 1994. región tropical del Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, v.31, n.2, p.195-203, 2014

- ✚ Ratram S. A manual on leptospirosis: a hazardous disease of pet and dear. Madras: Tamilnada Veterinary and Animal Sciences University; 1994.
- ✚ Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by wholegenome sequencing. Nature 2003;422:888-93.
- ✚ Restrepo, A. 2003. Fundamentos de Medicina, Enfermedades Infecciosas (sexta edición ed.). Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas.
- ✚ Ríos Goncalves A, Carvalho JE, Silva J, Rozembaum R. Hemoptises e síndrome se angustia respiratoria do adulto como cause de morte na leptospirose. Mudancas dos padroes clinicote anatomopatologicos: relato de aso. Arq Bras Med. 1993; 67 (3):p. 161-63.
- ✚ Roca B. Leptospirosis. Rev Med Univ Navarra. 2006;50(2):3-6 [citado 22 Jul 2012]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16999233>.
- ✚ Rodríguez B, Gómez H, Cruz R. Leptospirosis humana ¿un problema de salud? Rev Cubana Salud Pública. 2000;26(1):27-4.
- ✚ Rodríguez B, Gómez H, Cruz R. Leptospirosis humana ¿un problema de salud? Rev Cubana Salud Pública [Internet]. 2000 [citado el 12 de agosto de 2007];26(1):27-4. Disponible en: : <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php>
- ✚ Rodríguez B, Gómez HJ, Pérez B, Cruz R. Algunos aspectos clínico epidemiológicos en fallecidos por leptospirosis humana en ciudad de la Habana. Rev Cubana Med Gen Integr 2001;17(1):21-6.
- ✚ Rodríguez et al. Detection of leptospire from in vitro infected urines and tissues using modified Fontana's silver staining. J Bras Patol Med Lab 2013; 49(1): 39-45.
- ✚ Rodríguez I, Fernández C, Obregón AM, Zamora Y, Rodríguez JE, Rodríguez N, et al. Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2007 [citado el 29 de julio de 2010];59(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602007000100004&script=sci_arttext.

- ✚ Rodríguez I, Fernández C, Obregón AM, Zamora Y, Rodríguez JE, Rodríguez N, et al. Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2007;59(1): 19-23.
- ✚ Rodríguez Y, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez JE, Valdés Y, Echevarria E, et al. Detección de ADN de leptospiras en tejidos frescos de fallecidos en Cuba, 2008-2011. *Rev Cubana Med Trop.* 2013;65:211-22.
- ✚ Rojas L. PCR en tiempo real cuantitativo para el diagnóstico temprano de la leptospirosis humana. Trabajo de diploma en opción al título de Licenciado en Microbiología. IPK; 2018.
- ✚ Romero-Borges, R.; Valido-Díaz, A.; Álvarez-Montano, A. Necesidades ecológicas y ambientales de las *Leptospiras* para su supervivencia en el ecosistema: conocerlas para evitarlas. *Medicentro Electrónica*, v.20, n.3, p.219-222, 2016. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300010&lng=es&tlng=pt Accesado en 24/07/2017.
- ✚ Rosario L, Arencibia D, Batista N, Jirón W, Infante. Estudio anatomopatológico de aislados de *Leptospira* spp., provenientes de Nicaragua en *Mesocricetus auratus* como biomodelo. *Rev.MVZ Córdoba* 2013; 18(2):3484-3491.
- ✚ Rosario L, Arencibia D, Batista N, Jiron W, Valdés B, Suárez Y, et al. Leptospirosis, una Revisión Actualizada. *Rev. Vet. Arg.* 2012; 29(291):1-20.
- ✚ Sánchez E. Detección de *Leptospira* patógena en orina de pacientes crónicos y perros mediante PCR en el Valle del Cauca. Trabajo de grado. Santiago de Cali: Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas; 2011.
- ✚ Sánchez, E. 2011. Detección de leptospira patógena en orina de pacientes crónicos y perros mediante pcr en el valle del cauca. . Recuperado el 26 de junio de 2014, de Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa Académico de Biología: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/3912/4/CB-0441166.pdf>.

- ✚ Sandow, K. y Ramírez, W. (2005) Leptospirosis, Revista Electrónica de Veterinaria <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605.html>.
- ✚ Santos L, Bilbao K, Segredo Y, Cartaya JM. Leptospirosis grave asociada con hemorragia pulmonar . Presentación de 3 pacientes pediátricos UCIP. Hospital Universitario Jose Luis Miranda. Rev. Panm. Infectol. 2008;10(4):36-42.
- ✚ Santos LA, Bilbao K, Segredo Y, Cartaya JM.; Leptospirosis grave asociada con hemorragia pulmonar. presentación de 3 casos pediátricos. Rev Panam Infectol 2008;10(4):36-42.
- ✚ Sarkar J, Chopra A, Katageri B, Raj H, Goel A. Leptospirosis: a reemerging infection. Asian Pac J Trop Med. 2012;5(6):500-2.
- ✚ Sarkar, J.; Chopra, A.; Katageri, B. et al. Leptospirosis: a re-emerging infection. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v.5, n.6, p.500-502, 2012
- Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J. Letal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2002;8.
- ✚ Schneider M, Jancloes M, Buss D, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, et al. Leptospirosis: A Silent Epidemic Disease. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2013;10:7229-34
- ✚ Schonfeld, A. B. Jensen, H. M. Orth, D. Tappe, T. Feldt, D. Haussinger. Severe pulmonary haemorrhage syndrome in leptospirosis in a returning traveller infection February 2019, Volume 47, Issue 1, pp 125–128 .
- ✚ Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Rical-di JN, Torres S, Silva H et al. Peru-United States Leptospirosis Consortium. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. Clin Infect Dis 2005;40:343-51.
- ✚ Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Garcia O, Collia O, Bassadon D, Schtirbu R, Olenchuk A, Orta de mazzonell, Parma A. med (Buenos Aires) 2002; 62: 135-140.
- ✚ Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J. Letal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2002;8.

- ✚ Seijo A, Romer Y, San Juan J, Prieto R, Noguerras M, De Vedia L, et al. Neumonía aguda de la comunidad y hemorragia pulmonar por leptospirosis en el área metropolitana Buenos Aires. *Medicina* 2011;71:127-34.
- ✚ Serrato A, Flores LL, Aportela J, Sierra E. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha MG, editores. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 1ra ed. México: México D.F.; 2014. p. 63-73.
- ✚ Shah K, Amonkar GP, Kamat RN, Deshpande JR. Cardiac findings in leptospirosis. *J Clin Pathol* 2010;63:119-23.
- ✚ Smolinski, M.S.; Hamburg, M.A.; Lederberg, J. *Microbial threats to health: emergence, detection and response*. Washington D.C.: The National Academies Press, 2003. 364p
- ✚ Smythe, L., Adler, B., Hartskeerl, R., Galloway, R., Turenne, C. y Levett, P.(2013) Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthieli* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Inter J Systematic Evolut Microbiol*, 63, 1859–1862.
- ✚ Sondergaard MM, Tursunovic A, Thye-Ronn P, Bang JC, Hansen IMJ. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome with lower back pain as an initial symptom. *Am J Case Rep*.2016;17:883–6.
- ✚ Speelman P. Leptospirosis. En: *Harrison Principios de medicina interna*. 14ta ed. Madrid: McGrawHill; 2000. p. 1187-9.
- ✚ Spichler A, Athanazio DA, Vilaça P, Seguro A, Vinetz J, Leake JA. Comparative analysis of severe pediatric and adult leptospirosis in Sao Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86:306-8
- ✚ Srikrum A, Wongratanacheewin S, Puapairoj A, Wuthiekanun V, Sermswan RW. Analyses of vaccination protocols for *Leptospira interrogans* serovar autumnalis in hamsters. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:779-86
- ✚ Stanly R et al.; 2000, *Patología estructural y Funcional*, sexta edición.

✚ Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2007;2:e1188.

✚ Suárez Conejero AM, Otero Morales JM, Cruillas Miranda S, Otero Suárez M. Prevención de leptospirosis humana en la comunidad. *Rev Cub Med Mil.* 2015 [citado 12 Jun 2015];44(1):86-95. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S013865572015000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es

✚ Suárez Olivares AT. Caracterización clinicoepidemiológica de pacientes con leptospirosis.[artículo en línea] *MEDISAN* 2009;13(1). <http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13_1_09/san04109.htm>[consulta: fecha de acceso].

✚ Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM. Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23(4):743-52.

✚ Suputtamongkol Y, Pongtavornpinyo W, Lubell Y, Suttinont C, Hoontrakul S, Phimda K, et al. Strategies for diagnosis and treatment of suspected leptospirosis: a cost-benefit analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(2):e610.

Survival of Patients with Leptospirosis, Renal Failure and Pulmonary Hemorrhage. *Trop Med Surg* 2: 171. doi:10.4172/2329-9088.1000171.

✚ T.Pumarola Suñé, M.a T.Jiménez de Anta Losada sección 17 enfermedades infecciosas parte II infecciones bacterianas CAP 288.(2364-2367)

✚ Tappero JW, Ashford DA, Perkins BA. Leptospirosis. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Principles and practice of infectious diseases.* 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone: 2000. 2495-501.

✚ Tappero JW, Ashford DA, Perkins BA. Leptospirosis in :Mandell G, Bennett J, Dalen R (eds). *Principles and practice of infectious diseases.* New York, 1999, pp 2495-2501.

✚ Terpstra WJ. Detection of leptospiral DNA by PCR in serum from patients with copenhageni infections. En: Kobayashi Y, editor. *Leptospirosis: proceedings*

of the Leptospirosis Research Conference. Tokio: University of Tokyo Press; 1991. p.151-64.

✚ Tobias A. Caracterización clínica epidemiológica de pacientes con leptospirosis. *Medisan* 2009.v.13 n.4.

✚ Toledo G. *Fundamentos de Salud Pública II*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas 2005.

✚ Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. (2015) Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis* 9(10): e0004122. doi:10.1371/journal.pntd.0004122.

✚ Torres-Castro M, B Cruz –Camargo, Medina-Pinto R, Molecular detection of pathogenic *Leptospira* in synanthropic and wild rodents captured in Yucatán, México, *Biomédica*, 2018.

✚ Toshiyuki M, Yoshihiro O, Yumi U, Takahiro T, Keiko T, Nobuo K, et al. Leptospirosis in squirrels imported from United States to Japan. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(7):1153-5.

✚ Trevejo RT, Rigau Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin González C, Amador JJ, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 1998; 178(5):1457-63.

✚ Trivedi SV, Chavda RK, Wadia PZ, Sheth V, Baghade PN, Trivedi SP, et al. Role of glucocorticoid pulse therapy in pulmonary involvement in leptospirosis. *J Assoc Physicians India*. 2001;49:901---3.

✚ Trivedi SV, Vasava AH, Patel TC, Bhatia LC. Cyclophosphamide in pulmonary alveolar hemorrhage due to leptospirosis. *Indian J Crit Care Med*. 2009;13:79---84.

✚ Trueba GA, Bolin CA, Zuerner RL. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol*. 1992;174:4761-8.

✚ Valencia N, Camargo JA, Muñoz H. Leptospirosis, revisión de manifestaciones clínicas en pacientes del estado de Tabasco, hospitalizados en el Hospital Regional de Alta Especialidad Dr. Gustavo A. Roviroso Pérez, durante el período 2007 a 2011. *Enf Inf Microbiol* 2014.v34(4):126-131.

- ✚ Van Eys GJJM, Gerritsen MJ, Korver H, Schoone GJ, Kroon CCM, Terpstra WJ. Characterization of serovars of the genus *Leptospira* by DNA hybridization with VII. 119 hardjobovis and icterohaemorrhagiae recombinant probes with special attention to serogroup Sejroe. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1042-48.
- ✚ Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B, Soriano-Rosas J, Rivera-Reyes HH. Severe myocardial damage caused by leptospirosis. Report of a fatal case in Mexico. *Arch Cardiol Mex* 2009; 79:268-73.
- ✚ Velazquez J, Pinzón Canterell J, Flores Castillo M. La leptospirosis en Yucatan. Estudio serológico en humanos y animales. *Sal Púb México*. 2014;26(3):254-59.
- ✚ Verdasquera D, Barreras BA, Barroso J, Pérez A, Fernández C, Ortega LM, et al. Mortalidad por leptospirosis humana. Ciudad de La Habana, 2005-2006. *Rev Panam Infectol*. 2009; 11(4):19-26.
- ✚ Verdasquera D, Galí L, Sánchez L, Alpízar D, Vega B, Calas V. Variación de la morbilidad y mortalidad por leptospirosis humana. Cuba, 1998-2007. *Rev Panam Infectol*. 2010;12(4):22-30.
- ✚ Verdasquera D, Ortega LM, Fernández C, Obregón AM, Rodríguez I, Miyar R. Enfrentamiento a brotes epidémicos de leptospirosis humana. *Rev Panam Infectol* 2011; 13(1):28-35.
- ✚ Vieira, M., Atzingen, M., Oliveira, T., Oliveira, R., Andrade, D., Vasconcellos, S. y Vijayachari, P., Sugunan, A. y Shriram, A. (2008) Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*, 33(4), 557-569
- ✚ Vijayachari P, Sugunan AP, Umapathi T, Sehgal SC. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. *Indian J Med Res*. 2001;114:54-8.
- ✚ Villumsen et al. 2012. Novel Taq-Man PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J Microb Meth*.
- ✚ Vinayagamoorthy T, Maryanski D, Viayagamoorthy D, Hay KS, YO J, et al. Improved internal control for molecular diagnosis assay. *Methods X*. 2015 Mar 12;2:159-64.

- ✚ Vital J, Balassiano I, Oliveira F, Costa A, Hillen L, Pereira M. Multiplex PCRbased detection of Leptospira in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Memoria Instituto Oswaldo Cruz* 2010;105(3):353-5.
- ✚ Weatherall DJ, Clegg JB, 2001. *The thalassemia Syndrome*. 4^a ed. Blackwell. Londres, RU. 846 pp.
- ✚ Werts C, Tapping R, Mathison J, Chuang T, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunol* 2001; 2:346-52.
- ✚ Wieldbrauk D, Werner JC, Drevon AM. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol* .1995;33(10):2643-6.
- ✚ Wijesinghe A, Gnanapragash N, Ranasinghe G, Rangunathan MK. Fatal co-infection with leptospirosis and dengue in a Sri Lankan male. *BMC Res Notes*. 2015;8:348. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1321-7>
- ✚ World Health Organization. Report of the second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group 2011 (consultado 2012 sept 12). Disponible en http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501521_eng.pdf
- ✚ World Health Organization/International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, 2003 [fecha de acceso: 26 de septiembre de 2014]. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>
- ✚ World Health Organization/International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, 2003 [fecha de acceso: 26 de septiembre de 2014]. Disponible en: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>
- ✚ World Health Organization-WHO. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland. 2011:1-34.)
- ✚ World Health Organization-WHO. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland. 2011:1-34.

- ✚ Wunder A, Claudio P, Figueira B, Gisele R. Santos, Kristel, et al. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. *Infection and Immunity* July 2016 Volume 84 Number 7: 2105-2115.
- ✚ Wunder EA, Figueira CP, Santos GR, Lourdault K, Matthias MA, et al. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of *Leptospira interrogans* after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. *Infect Immun*. [Internet] 2015; 2016 Jul disponible en: <http://iai.asm.org/content/84/7/2105.long>
- ✚ Zhang Y, Lou XL, Yang HL, Guo XK, Zhang XY, He P, et al. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect Dis*. 2012;12:20. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-20>.
- ✚ Zunino E, Pizarro R. Leptospirosis: puesta al día. *Rev Chil Infectol*. 2007;24(3):220-6.