

# Leptospirosis crónica en México:

diagnóstico microscópico y evidencias que respaldan su existencia e importancia

## Palabras clave:

Leptospira, pomona, leptospirosis crónica, videograbación en campo oscuro, inmunohistoquímica, impregnación argéntica.

## Key words:

Leptospire, pomona, chronic leptospirosis, videorecording in dark field, immunohistochemistry, silver impregnation.

Recibido: 08/07/2009

Aceptado: 16/07/2009

Oscar Velasco-Castrejón,\* Beatriz Rivas-Sánchez,\*  
María Esther Sánchez-Spíndola,\*\* Juan Soriano,\*\*\*  
Héctor Hugo Rivera-Reyes,\*\*\*\* Vicente Garibay Sebles\*\*\*\*\*

- \* Laboratorio de Medicina Tropical, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina (FM), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)– Hospital General de México (HGM).
- \*\* Unidad de Microscopía Electrónica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN).
- \*\*\* Departamento de Anatomía Patológica, FM, UNAM-HGM.
- \*\*\*\* Departamento de Terapia Intensiva, HGM.
- \*\*\*\*\* Laboratorio de Microscopía Electrónica de Ultra Alta Resolución. Instituto Mexicano del Petróleo.

## Correspondencia:

Dr. Óscar Velasco Castrejón.  
Hospital General de México  
Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726 México, D.F.  
Tel: (55) 5623-2678, (55) 5623-2677 E-mail: oscarvel@medicina-tropical.com

157

## Resumen

La leptospirosis crónica es una forma clínica común pero poco conocida, simuladora de múltiples enfermedades, que hace que los pacientes peregrinen de médico a médico e incluso mueran sin diagnóstico preciso. **Material y métodos:** Se estudiaron 374 pacientes de uno a 86 años, con diagnóstico clínico de leptospirosis crónica de más de seis meses de evolución. Se les realizó serología, búsqueda de leptospiras mediante videograbación en campo oscuro, impregnación argéntica y/o inmunodetección en sangre y orina. A 10 se les realizó microscopía electrónica en sangre y en otros 10 que murieron, se buscó leptospiras en diversos órganos mediante impregnación argéntica e inmunodetección. **Resultados:** 75.7% de los pacientes presentaron títulos de anticuerpos bajos (< 1:80). Se observó leptospiras en 85 y 89.9% mediante videograbación en campo oscuro, en 75 y 77% por impregnación argéntica y en 77 y 85% mediante

## Abstract

Chronic leptospirosis is a common clinical form but little-known and simulator of multiple diseases, which makes patients peregrinate from physician to physician and even tend to die without accurate diagnosis. **Material and methods:** We studied 374 patients of both sexes, 1 to 86 years, clinically diagnosed with chronic leptospirosis for more than 6 months of evolution. Serology was performed by MAT. The leptospiras were detected by dark field videorecording, silver impregnation and immunodetection in blood and urine. A 10 electron microscopy was performed in blood and in another 10, who died, the leptospiras were searched in various organs by silver staining and immunodetection techniques. **Results:** 75.7% of patients had low titers (< 1:80). Leptospiras was observed in 85% and 89.9% by dark field videorecording, in 75% and 77% by silver staining and by 77% and 85% by immunodetection in blood and urine. Furthermore electron

inmunodetección en sangre y orina. Además, se obtuvieron microfotografías electrónicas en tres casos. Aunque 82% de los cultivos fueron positivos, sólo se recuperaron tres cepas, las que fueron tipificadas como *Leptospira* Pomona. Se observaron leptospiras en 87% de los tejidos de los individuos fallecidos. **Discusión:** Estos resultados, particularmente los obtenidos por necropsia, ultramicroscopía y cultivo, asociados a la larga evolución del cuadro clínico, algunas veces de varios años, confirman la existencia de leptospirosis crónica y su importancia como causa de muerte, así como el elevado valor diagnóstico de la videograbación en campo oscuro.

## Introducción

**L**a leptospirosis es la zoonosis más difundida en el mundo y es particularmente prevalente en los países subdesarrollados.<sup>1,2</sup> Hasta hace poco se creía que los humanos sólo enfermaban de leptospirosis aguda, enfermedad de presentación brusca, esporádica, accidental y habitualmente grave, donde los pacientes, cuando no fallecen, se recuperan «ad integrum»; pero desde mediados de la década de los 80, ha venido tomando fuerza la presencia de la leptospirosis crónica en animales y simultáneamente se ha iniciado el conocimiento de esta fase de la enfermedad en el hombre.<sup>3-17</sup>

La recuperación de leptospira a partir de los especímenes clínicos de un enfermo sospechoso constituye el diagnóstico definitivo de la leptospirosis.<sup>1</sup> Su demostración puede realizarse por tinción con sales de plata, detección de antígeno mediante inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia (IFI-ag), PCR, microscopía electrónica y cultivo. Este último, a pesar de su escasa sensibilidad y lentitud en desarrollarse, en caso de lograrse, es muy superior a los otros y constituye una prueba irrefutable de la etiología de la enfermedad y, por lo tanto, es capaz de avalar la positividad de cualquier técnica diagnóstica utilizada concomitantemente. Sin embargo, estos exámenes, aunque confirmatorios, pueden ser muy laboriosos y apropiados únicamente para laborato-

micrographs were obtained in 3 cases. Although 82% of cultures were early positive only we could get 3 strains. This strains were typify as *Leptospira* Pomona. Furthermore leptospire were observed in 87% of the tissue of deceased individuals. **Discussion:** These results, particularly those obtained by necropsy, ultramicroscopy and culture, associated with the long evolution of clinical, sometimes several years, confirm the existence of chronic leptospirosis and its importance as a cause of death. This report demonstrates too the high diagnostic value of dark field videorecording.

rios de referencia, por lo que es necesario una prueba diagnóstica rápida y confiable superior a las serológicas disponibles hasta ahora, que poseen escasa sensibilidad.

La leptospirosis humana crónica es una enfermedad multiorgánica, clínicamente polimorfa, de evolución crónica, caracterizada habitualmente por fatiga rápida, cefalea, hipersomnolia diurna, dolores mioosteoarticulares, frecuente depresión, dolor espontáneo y/o a la presión de globos oculares, y molestias del órgano o sistema más afectado: hígado, riñón, pulmón, sistema nervioso central, etcétera; además, es a menudo incapacitante y de muy difícil diagnóstico, simplemente porque no se piensa en ella.<sup>14-16</sup>

Aunque pueden existir antecedentes de enfermedad aguda, habitualmente no los hay, porque la fase aguda pudo haber cursado en forma asintomática o fue confundida con otras enfermedades comunes, infecciosas o no, a las que simula frecuentemente: influenza, hepatitis viral, dengue, salmonelosis, brucelosis, toxoplasmosis, púrpuras, artritis reumatoide, histoplasmosis, tuberculosis, rickettsiasis, mononucleosis infecciosa, enfermedad de Lyme, etcétera.<sup>16</sup>

La enfermedad humana crónica como tal, aunque sospechada desde muchos años atrás,<sup>2,5-12</sup> fue reconocida aparentemente por primera vez por nosotros en 1985, cuando fueron enviados o llegaron espontáneamente al Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la Secretaria

ría de Salud (ISET, hoy Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos: InDRE), decenas de pacientes de supuesta malaria crónica, ya que en ese año se suscitó una hiperendemia palúdica en México, y los casos rebasaron la capacidad de diagnóstico de los servicios de salud pública estatales.<sup>17</sup>

Sin embargo, muy pocos de estas decenas de pacientes con cuadros clínicos extraños para nosotros (en aquel entonces), correspondieron a fiebre palúdica (seis por *P. vivax* y dos casos por *P. falciparum*), y otros a enfermedades conocidas: dos a brucelosis, tres a salmonelosis, uno a tuberculosis renal, otros dos a toxoplasmosis, uno a histoplasmosis, cinco a uncinariasis grave, dos a triquinosis, uno a fasciolosis, dos a neurocisticercosis y uno a paragonimiasis. A la mayoría de ellos, constituida por pacientes febriles y afebriles, con cuadros clínicos que simulaban enfermedades comunes, no se les pudo realizar el diagnóstico definitivo mediante los estudios de laboratorio habituales, por lo que fueron etiquetados de síndrome febril oscuro, síndrome de fatiga crónica, síndromes ictericos y fiebre por hepatopatía aguda no viral, hepatitis crónica activa, miocardiopatía a determinar, neumonitis atípica, etcétera.

En esos pacientes, después de descartar las enfermedades conocidas y analizar y reanalizar sus cuadros clínicos, llegamos a la conclusión de que estábamos en presencia de una enfermedad o un conjunto de enfermedades crónicas, desconocidas hasta entonces para nosotros e incluso para la salud pública mexicana, por lo que, después de volver a analizar los diferentes cuadros clínicos, pensamos en leptospirosis; pero no en la forma aguda grave, que es muy conocida en el mundo, sino en leptospirosis crónica, entidad que no se había descrito hasta ese momento en humanos, según supimos tiempo después.

Después de diagnosticar entre esos pacientes, cinco casos de leptospirosis por serología con títulos de anticuerpos  $\geq 1:100$  por microaglutinación en placa (MAT) y descartar 35 por los crite-

rios serológicos considerados diagnósticos para leptospirosis aguda,<sup>1,18</sup> se enviaron muestras de sangre y orina de estos pacientes al Laboratorio de Leptospirosis del propio ISET, para búsqueda de estas bacterias por microscopia de campo oscuro y realización de serología por MAT a títulos bajos, iniciando desde 1:10, apoyándonos en ese momento en un criterio de Frenkel, quien en presencia de un cuadro clínico sugestivo de toxoplasmosis recomendó que incluso un título de anticuerpos tan bajo como 1:2 se considere significativo,<sup>19</sup> y además del título 1:25 sugerido por CEPANZO (Centro Panamericano de Zoonosis) como título diagnóstico en estudios seroepidemiológicos;<sup>20</sup> en nuestro caso, teníamos la ventaja de la observación del agente etiológico, que prácticamente en todas las enfermedades infecciosas constituye el diagnóstico confirmatorio.

Por lo tanto, basándonos en el hallazgo de leptospiras en fluidos orgánicos, en la serología a títulos bajos y en la larga evolución del cuadro clínico, 32 de 35 pacientes, fueron diagnosticados de leptospirosis crónica. También resultaron positivos a esas pruebas algunos pacientes encuadrados en otros diagnósticos, que no habían respondido adecuadamente al tratamiento específico.

La respuesta al tratamiento con penicilina y doxiciclina en algunos de estos casos fue espectacular, lo que confirmó el diagnóstico (prueba terapéutica); sin embargo, por apegarnos a las normas internacionales que indicaban periodos cortos de terapia (menos de 20 días),<sup>2,18</sup> 28 de los pacientes recayeron antes de un mes o después de dos a seis meses de haber suspendido el tratamiento, y sólo cuatro (12.5%) se consideraron curados, al permanecer asintomáticos por más de seis meses.

Posteriormente hemos estudiado centenares de pacientes de leptospirosis crónica. En esta ocasión presentamos 374 casos, seleccionados por poseer información adecuada sobre ellos, y con esto intentamos informar y alertar a médicos, epidemiólogos, patólogos, veterinarios, qui-

micos y en general a personal dedicado a salvar la salud, acerca de la presencia de la leptospirosis crónica en México y seguramente en muchas otras partes del mundo y del peligro de subestimarla, simplemente por no conocerla adecuadamente y por creer que los humanos sólo pueden enfermar de leptospirosis aguda grave (enfermedad de Weil), que es ocasional y/o que la serología constituye la mejor forma de diagnosticarla,<sup>1,2,5,18</sup> cuando ésta frecuentemente falla,<sup>15,21-23</sup> mientras que es fácil la observación y demostración de leptospiras mediante videograbación en campo oscuro, impregnación argéntica o inmunohistoquímica de sangre, orina y otros fluidos orgánicos, así como de tejidos de animales o de humanos, negativos a la serología.<sup>15,21,23-25</sup> Además, por parecerse mucho al dengue (que en México produce frecuentemente grandes brotes), en nuestra ignorancia, creemos que todos los casos resultantes de brotes sufren esta virosis, aunque sólo se pueda diagnosticar por laboratorio como dengue un porcentaje bajo de los enfermos, particularmente de aquéllos con manifestaciones hemorrágicas graves y que muchos de ellos, al ser tratados con antibióticos, principalmente penicilina o doxiciclina, mejoran con rapidez, observación común entre el personal médico de algunas entidades federativas de México, donde los brotes de dengue son frecuentes.

160

## Material y métodos

Entre 2002 a 2005, se estudiaron 374 pacientes de uno u otro sexo, con edades que oscilaron desde un recién nacido, cuya madre sufría de leptospirosis crónica indeterminada, hasta un individuo de 86 años de edad (*cuadro I*), que sufrieron enfermedad crónica, habitualmente de seis meses a varios años de evolución, casi todos multitratados, etiquetados con diversos diagnósticos, por sufrir variadas manifestaciones clínicas. Las más frecuentes fueron: febrícula, malestar general, cefalea, mialgias, artralgias, dolor de globos

**Cuadro I.** Edad y sexo de los pacientes con leptospirosis crónica estudiados.

Edad	Femenino	Masculino	Total	
			n	%
< 1 año	1	–	1	0.3
1 – 4	–	4	4	1.0
5 – 9	11	7	18	4.8
10 – 14	5	11	16	4.3
15 – 24	37	27	64	17.1
25 – 34	46	28	74	19.8
35 – 44	35	31	66	17.7
45 – 54	38	30	68	18.2
55 – 64	21	12	33	8.8
≥ 65	15	15	30	8.0
<b>Total</b>	<b>209 (55.9%)</b>	<b>165 (44.1%)</b>	<b>374</b>	<b>100.0</b>

oculares, síndrome asténico, enfermedad renal y hepática; algunas veces acompañadas de ictericia, sangrados de piel y mucosas, dolor y otras molestias abdominales, palpitaciones, disnea de esfuerzo, fatiga crónica, hipersomnias diurnas, otros problemas neurológicos, todos de evolución crónica. Algunos casos se agudizaron y presentaron cuadros similares a la enfermedad de Weil, meningitis o meningoencefalitis aséptica, neumonía, cuadros hematológicos, cuadros neurológicos, miocardiopatía, acompañados frecuentemente de síndromes hemorrágicos y distrés respiratorio.

**Estudios.** A cada paciente se le realizó perfil diagnóstico de leptospirosis, consistente en: serología por microaglutinación en placa (MAT), videograbación en microscopía de campo oscuro y cultivo en medio EMJH de sangre y orina. En 100 casos se realizó impregnación argéntica, inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia indirecta (IFI-ag), para la observación de las leptospiras o la detección de sus antígenos en sangre y orina. En dos casos con dermatosis atípicas, también se realizó impregnación argéntica en biopsias de piel y cultivo.

La serología se realizó mediante la técnica de MAT, a diluciones dobles, comenzando la lectura

a partir de 1:20, utilizando un condensador de campo oscuro de inmersión,<sup>18</sup> y a 400 aumentos.

La videograbación en campo oscuro (vdgnCO) se realizó utilizando un microscopio Zeiss con condensador de inmersión, a 400 aumentos y una cámara digital Sony VTR conectada a un monitor Sony y a una videocasetera JVC; a este método se le llamó VECOVISION y lo hemos utilizado desde el 2001.<sup>26</sup>

La impregnación argéntica fue realizada con la técnica de Fontana modificada.<sup>27,28</sup>

La IFI-ag fue realizada utilizando anticuerpos anti-leptospira obtenidos de conejos hiperinmunizados, por la inoculación repetida de un «pool» de *Leptospira interrogans*,<sup>18</sup> que contenía las serovariedades Canicola, Pomona, Pomona vecorisa (aislada de orina de una paciente mexicana con leptospirosis crónica en el año 2001 y tipificada como *L. interrogans* serovar Pomona, en el Laboratorio de Referencia para Leptospirosis del Instituto Pablo Kouri de La Habana, Cuba y ratificada por el laboratorio Internacional de Referencia de Holanda), Icterohaemorrhagiae y Hardjo. Se utilizó un suero antiinmunoglobulinas totales de conejo, marcado con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA) y se leyó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss, con una fuente de luz ultravioleta producida mediante una lámpara de mercurio.<sup>29</sup>

Para la inmunohistoquímica se utilizó el suero hiperinmune de conejo anteriormente descrito, suero antiinmunoglobulinas totales de conejo, conjugado con peroxidasa (SIGMA); como sustrato se utilizó peróxido de hidrógeno (JTBaker) y 3,3,9 dietil-carbamizina (SIGMA) como revelador.<sup>29</sup>

El cultivo se realizó inoculando tubos conteniendo medio EMJH (Difco) suplementado con albúmina bovina fracción V (SIGMA), suero de conejo (0.4%) y 5-fluorouracilo; ocasionalmente se hizo a partir de líquido cefalorraquídeo, médula ósea, microbiopsias de piel de individuos con dermatosis, ganglio linfático y líquidos pleural y pericárdico.

**Microscopia electrónica.** A partir de la sangre periférica de 10 pacientes seleccionados por mostrar muy abundantes leptospiras a la VECOVISION, se les realizó estudios de microscopia electrónica de barrido y transmisión, para tratar de demostrar fehacientemente que las imágenes de las bacterias observadas por microscopia de campo oscuro correspondían a leptospira y no a otras espiroquetas. Este estudio fue realizado utilizando un microscopio de barrido y otro de transmisión, ambos marca Leica. Las muestras de sangre periférica fueron preparadas por fijación con glutaraldehído a 2% (SIGMA), tetraóxido de osmio (SIGMA) y recubiertas con oro.

**Necropsias.** En el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General-UNAM, con quien trabajamos en colaboración, se realizaron las autopsias de 10 individuos diagnosticados en vida como casos de leptospirosis crónica. Se nos proporcionaron fragmentos de piezas de diversas vísceras sin fijar, para su observación por videograbación, previa trituración en mortero. También se nos proporcionaron cortes histológicos previamente fijados, montados y cortados a partir de bloques de parafina para impregnación argéntica y/o detección de antígeno por IFI-ag, al término del protocolo del estudio histopatológico realizado por ellos.

## Resultados

De los 374 pacientes estudiados, 209 pertenecieron al sexo femenino (55.9%). Respecto a la edad, el mayor número de casos estuvo comprendido en los grupos de 15 a 54 años (72.8%) (*cuadro I*).

En 283 casos (75.7%) se detectaron títulos de anticuerpos bajos a la microaglutinación en placa (MAT) (< 1:80); sólo en 91 (24.3%) los títulos fueron  $\geq$  1:80 (*cuadro II*). Por otro lado, 318 (85%) de los casos fueron positivos a VECOVISION en sangre y 336 (89.8%) lo fueron en orina.

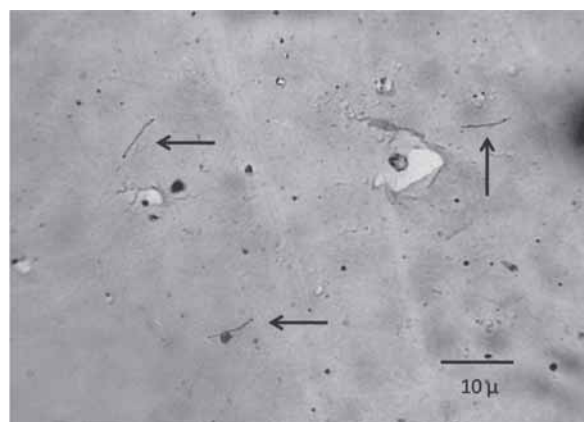
En cuanto a los 100 casos a los que se realizó impregnación argéntica, IFI-ag e inmunohistoquímica, 75% fueron positivos a la impregnación argéntica por Fontana en sangre y 77% en orina (figura 1). Mediante inmunohistoquímica obtuvimos 77% de positividad en sangre y 85% en orina; mientras que con IFI-ag se registró 78% de positividad (figuras 2 y 3).

**Cuadro II.** Título de anticuerpos mediante microaglutinación en placa (MAT), detectados en los 374 sujetos con leptospirosis crónica analizados.

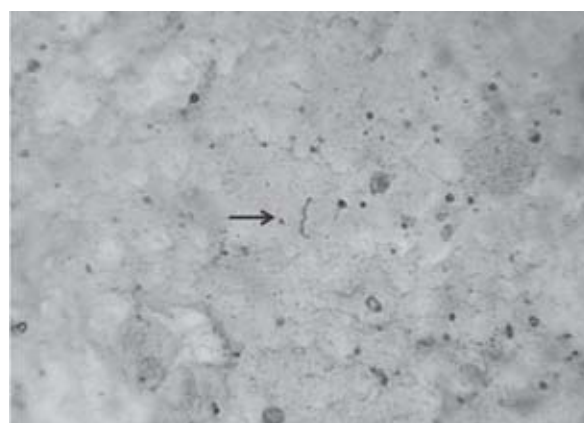
Título	Casos n	%
Negativo	7	1.9
1:20	101	27.0
1:40	175	46.8
1:80	64	17.0
1:160	18	4.8
1:320	8	2.2
1:5120	1	0.3
<b>Total</b>	<b>374</b>	<b>100.0</b>

**Cuadro III.** Resultados de la búsqueda de leptospirosis por impregnación argéntica (W-S) e inmunofluorescencia indirecta (IFI-ag) en los órganos de los pacientes fallecidos.

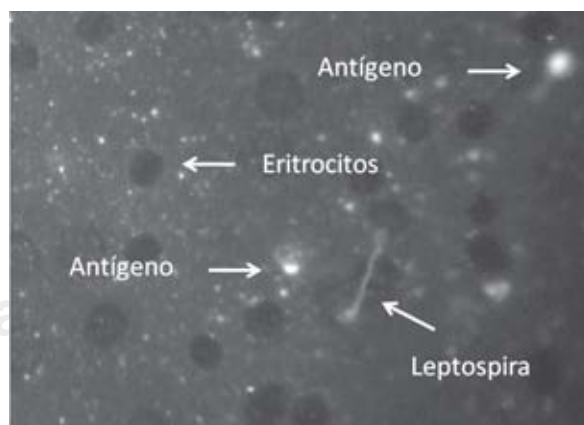
Órgano	Pacientes n	W-S		IFI - ag	
		n	%	n	%
Corazón	10	5	50	6	60
Pulmón	10	9	90	7	70
Riñón	10	10	100	9	90
Hígado	10	10	100	9	90
Bazo	10	5	50	9	90
Suprarrenales	5	3	60	4	80
Páncreas	5	3	60	4	80
Médula ósea	4	3	75	2	50
Ganglios linfáticos	4	4	100	4	100
Esófago, estómago, yeyuno	3	Negativo		2	66
Tiroides	3	2	66	2	66
Cerebro	3	3	100	2	67



**Figura 1.** Leptospiras en orina (tinción de Warthin-Starry).

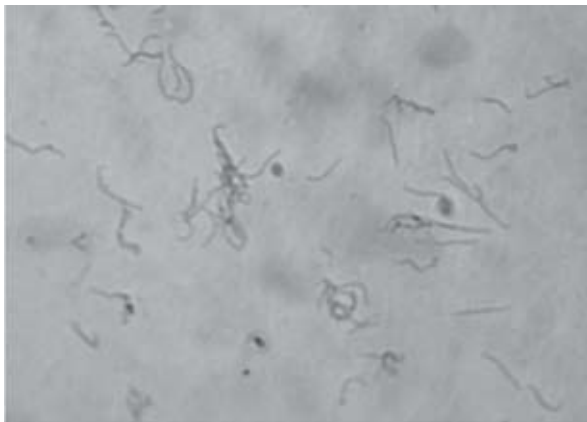


**Figura 2.** Leptospiras detectadas en orina mediante inmunohistoquímica.

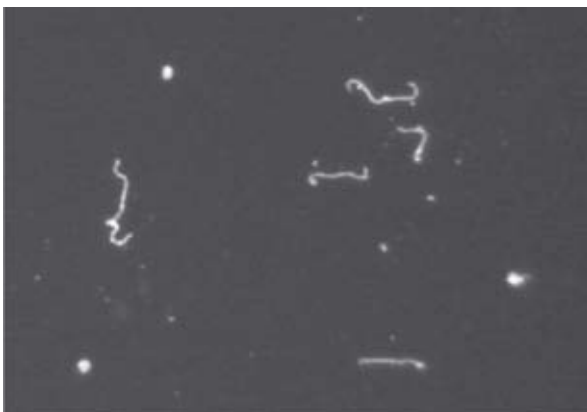


**Figura 3.** Leptospira y su antígeno en sangre periférica, detectadas mediante inmunofluorescencia indirecta.

El cultivo de sangre y orina resultó positivo (primocultivos positivos) inicialmente en 305 muestras (82%) en los primeros dos meses; pero sólo cuatro se lograron adaptar al medio, evolucionando a cepas, y de éstas, se recuperaron tres: la primera fue aislada a partir de la sangre de una mujer que murió con fiebre de origen oscuro; la segunda, de la orina de un hombre con cardiomegalia grado IV, quien también falleció; y la tercera, de la sangre de una mujer con leptospirosis crónica, quien respondió al tratamiento específico. En los tres casos, los títulos de anticuerpos



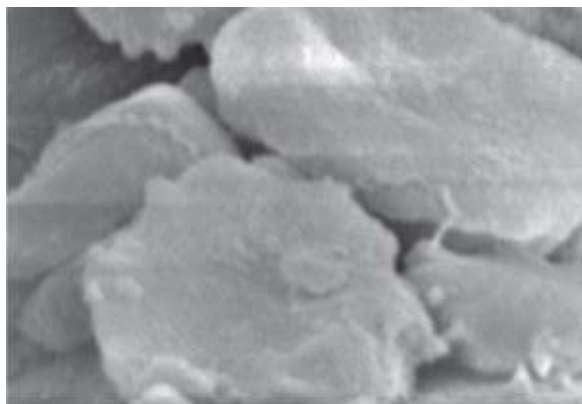
**Figura 4.** Leptospiras de primocultivo aisladas de pacientes con leptospirosis crónica en México (tinción de Fontana).



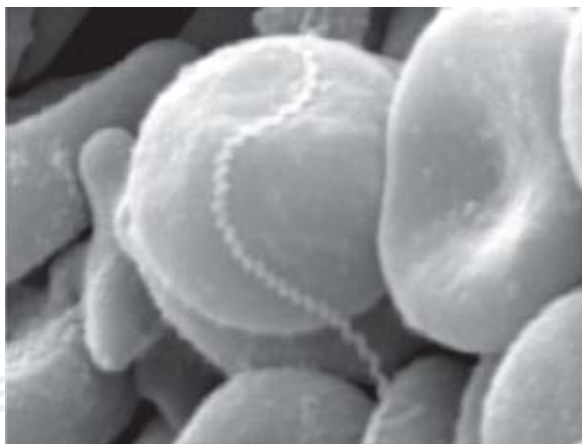
**Figura 5.** Leptospiras de primocultivo aisladas de pacientes con leptospirosis crónica en México, detectadas mediante inmunofluorescencia.

fueron de 1:160, 1:80 y 1:40, respectivamente. El resto han permanecido estacionarias como primocultivos positivos, con sus altibajos y las bacterias en cultivo muestran todos los rasgos compatibles con leptospira a la tinción con sales de plata e IFI-ag (figuras 4 y 5).

**Microscopia electrónica.** Después de muchos ensayos fallidos, se estudiaron 10 casos con microscopia electrónica de barrido y de transmi-



**Figura 6.** Leptospira sobre la superficie de un eritrocito obtenido a partir de sangre periférica de un paciente con leptospirosis crónica, observada con microscopia electrónica de barrido.

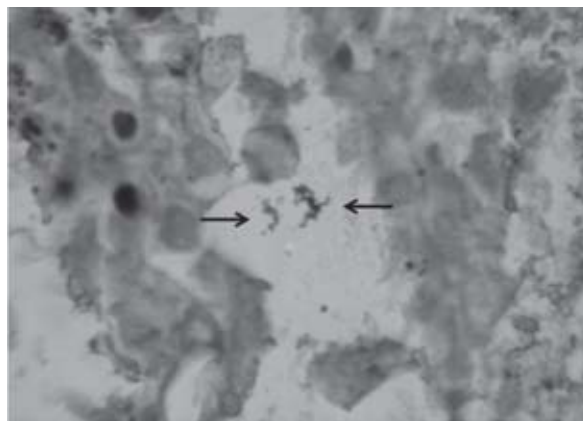


**Figura 7.** Leptospira sobre la superficie de un eritrocito obtenido a partir de sangre periférica de un paciente con leptospirosis crónica, observada con microscopia electrónica de barrido.<sup>15</sup>

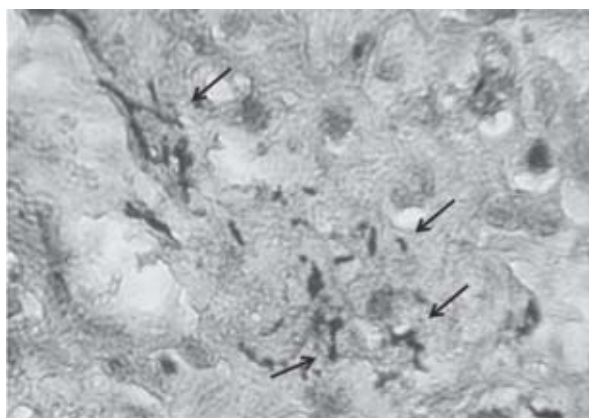
sión; en cuatro se logró obtener microfotografías muy nítidas de leptospiras sobre y/o adheridas a eritrocitos y en otro caso se observaron fragmentos de leptospiras (figuras 6 y 7).

En los 10 pacientes fallecidos, en los que se realizó la necropsia, se observaron leptospiras en diversos tejidos (figuras 8 a 10 y cuadro III). Cabe mencionar que dos aislados que lograron adaptarse al medio, correspondieron a 2 de estos individuos.

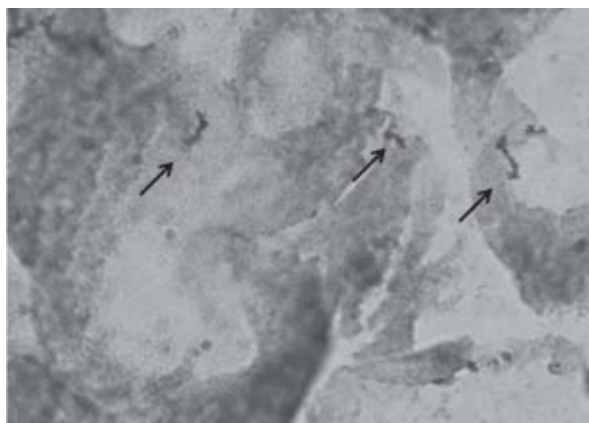
**Aislados.** Los aislados recuperados fueron tipificados como *L. interrogans* Pomona en el Labo-



**Figura 10.** Leptospiras observadas en pulmón (tinción de Warthin-Starry).



**Figura 8.** Leptospiras observadas en riñón (tinción de Warthin-Starry).



**Figura 9.** Leptospiras observadas en hígado (tinción de Warthin-Starry).

ratorio de Referencia de Leptospirosis de La Habana, Cuba. Después, uno de ellos se envió, junto con otras 14 cepas aisladas posteriormente, al Laboratorio de Referencia de Leptospirosis para la OMS/FAO/OIE en Amsterdam, Holanda, donde se confirmó como *L. Pomona*.

## Discusión

Como se ha mencionado previamente, el diagnóstico serológico por microaglutinación en placa (MAT) tiene escasa sensibilidad. En nuestro estudio, sólo 27 pacientes fueron positivos a títulos considerados significativos:  $\geq 1:80$ ; y 27 (7.2%) lo fueron a títulos  $\geq 1:160$ , estos últimos títulos considerados diagnósticos. Esto ratifica la escasa sensibilidad de la prueba; particularmente si la comparamos con la videograbación y con los resultados de la submuestra aleatorizada de 100 casos, ya que los obtenidos por serología fueron muy inferiores a los logrados mediante pruebas consideradas confirmatorias como la impregnación argéntica por Fontana (75%), la inmunohistoquímica (77%) y la IFI para detección de antígenos (78%), a la que sumaríamos los 10 casos estudiados por histopatología, a la cual todos fueron positivos, y de la que sólo cuatro fueron se-



ropositivos a la MAT a títulos  $\geq 1:80$ ; lo que sugiere que títulos  $\leq 1:40$  (76%) a la serología deben ser considerados significativos como lo han propuesto Myers<sup>20</sup> y Schollum,<sup>30</sup> con los títulos  $\geq 1:24$ .

Todas estas pruebas, incluyendo la ultramicroscopía y el aislamiento de tres cepas y su tipificación como *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona, provenientes de sangre y orina de enfermos crónicos de leptospirosis, infectados en años diferentes y que cursaban con diferentes cuadros clínicos, avalan el diagnóstico por videograbación en microscopía de campo oscuro y la existencia de la enfermedad crónica en el hombre, que hasta ahora sólo había sido considerada en animales y sospechada, aunque casi siempre refutada en humanos.<sup>3,4,9,10,13</sup>

El que sólo hayamos logrado aislar tres cepas del total de cultivos indica, ~a pesar de que 80% fueron primocultivos positivos durante los dos primeros meses y que las bacterias desarrolladas como lo confirmó la tinción de plata y la IFI-ag realizados a estos cultivos fueron leptospiros (*figuras 4 y 5*)~ la gran dificultad para aislar *Leptospira*, lo que probablemente se deba a que las bacterias procedentes de casos crónicos sean más difíciles de cultivar por poseer un metabolismo ligeramente diferente a las que se aíslan durante la etapa aguda o a que estamos trabajando con miles de tubos, por lo que quizá no logremos observar el momento preciso en que éstas se transforman en cepas y mueran al no ser alimentadas o a ambas cosas.

Por otro lado, *L. interrogans* serovariedad Pomona es considerada uno de los agentes etiológicos más comunes de leptospirosis crónica en animales en el mundo, especialmente en el perro y en el cerdo, debido a que es una serovariedad poco virulenta y muy adaptable al huésped, que se aloja habitualmente en los túbulos renales y aparentemente es incapaz de producir enfermedad aguda y a pesar de su presencia, los animales huéspedes producen títulos bajos de anticuerpos.

Por lo mismo, en el norte de Irlanda, a pesar de haberla aislado de caballos, ganado vacuno, cerdos y ovejas, Munday no pudo detectar la presencia de anticuerpos específicos de acuerdo a las normas técnicas para su diagnóstico (títulos  $\geq 1:100$ ),<sup>21</sup> por lo que no es de sorprender que sea la serovariedad involucrada en la leptospirosis crónica humana en México. En este caso parece indicar la estrecha correlación existente en la transmisión de las zoonosis entre animales enfermos, particularmente cerdos y perros (animales convivientes muy cercanos al hombre en México) y huéspedes humanos y otros animales susceptibles en contacto con éstos.<sup>15,21,30-35</sup>

Por otro lado, la vdgncO a 400X utilizando un condensador de inmersión y lámparas de mayor potencia (mayor wattaje), nos permitió observar con claridad las imágenes, el tiempo y las veces necesarias para tener la certeza de que lo observado es una espiroqueta (que por los resultados ulteriores resultó cierto que se trata de una leptospira) en lugar de hacer la simple observación microscópica a 200X, sin incrementar la luminosidad, como habitualmente se practica en casi todos los laboratorios, lo cual dificulta observar no sólo la diferencia entre leptospiros y fibras de actina, fibrina u otros artefactos, sino a la propia bacteria. Debido a todo lo anterior, consideramos a la videograbación en campo oscuro, una técnica diagnóstica rápida, muy sensible y eficaz, ya que en 82% de los casos en que se videograban leptospiros, se logra la obtención de primoaislamientos positivos de esta bacteria en medio EMJH en 30 a 60 días. Otra evidencia muy importante fue la demostración de la presencia de leptospiros en los tejidos de diversas vísceras, mediante impregnación argéntica e IFI-ag, de individuos fallecidos por, o sospechosos de, haber padecido leptospirosis crónica y, desde luego, la obtención de microfotografías por microscopía electrónica de barrido y de transmisión de la sangre periférica en cuatro de 10 pacientes crónicos estudiados (*figuras 6 y 7*), y que parecen ser las

primeras en el mundo obtenidas directamente de la sangre de enfermos y, en nuestro caso, de la sangre de pacientes crónicos.

Por otro lado, la elevada frecuencia de leptospirosis humana crónica (LHC) que observamos cotidianamente sugiere la existencia de un grave problema de salud pública no reconocido y que por esta circunstancia es aún más grave. Al no ser diagnosticada y sí confundida con otras enfermedades, los pacientes con leptospirosis humana crónica van a permanecer enfermos por largas temporadas e incluso por toda la vida, lo que repercute gravemente en la economía familiar y, por su gran prevalencia, en la del país. Posiblemente es la enfermedad que mayores pérdidas económicas produce por discapacidad en México, además de ser causa frecuente de cuadros letales, porque cuando esta enfermedad se agudiza, se torna grave y, al ser confundida con muchas otras enfermedades y no ser tratada en forma rápida y adecuada, puede conducir a la muerte.

166

Finalmente, queremos recalcar la importancia diagnóstica de la videograbación en campo oscuro que en nuestras manos se ha mostrado muy superior a la MAT a títulos  $\geq 1:100$ , la cual constituye sólo una prueba presuntiva; mientras que a la videograbación en campo oscuro se le debe considerar una prueba confirmatoria, ya que permite observar y reobservar al agente etiológico todo el tiempo que deseemos, hasta tener la plena seguridad de que la imagen microscópica es realmente una espiroqueta e incluso una leptospira, y no una fibra de actina o miosina como se ha dicho para satanizar la observación microscópica en campo oscuro desde los primeros años del siglo XX, cuando la filmación de imágenes microscópicas constituía un lujo y, desde luego, no existía la videograbación.

## Referencias

- Barthi AR, Jarlath EN, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilmant RH, Willing MR, Gotuzzo E, Vinetz JM, Peru. USA Leptospirosis Consortium. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (12).
- Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. Geneva: WHO; 1982.
- Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: Ellis WA (eds). *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff; 1986. p. 13-31.
- Ellis WA. OIE, Office International des Epizooties. 2000. *Manual of Standards for Diagnostic test and vaccines*. Paris.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14 (2): 296-326.
- Murgatroyd F. Chronic meningitis in Weil's disease. *Br Med J* 1937: 711.
- Nicolescu M, Andrescu N. May human leptospirosis develop as a chronic infection? *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Htg* 1984; 257: 531-534.
- Rathnam SR. Ocular manifestations of leptospirosis. *JPGM* 2005; 51: 189-194.
- Tripathy DN, Hanson LE. Some observations on chronic leptospiral carrier state in gerbils experimentally infected with *Leptospira grippotyphosa*. *J Wildl Dis* 1976; 12: 55-58.
- Leptospirosis Information Center. *Persistent Human Leptospirosis (update August 2001)*. Disponible en: <http://www.leptospirosis.org>
- Avdeeva MG. Outcome and tendency of late convalescence in icterohemorrhagic leptospirosis. *Klin Med (Mosk)* 2003; 81 (6): 42-47.
- Mel'ink GV, Degtiar LD. Renal involvement in convalescents after icterohaemorrhagic leptospirosis. *Klin Med (Mosk)* 2000; 78 (12): 40-43.
- Shpilberg O, Shaked Y, Maier MK, Samra D, Samra Y. Long-term follow-up after leptospirosis. *South Medical J* 1990; 83 (4): 405-407.
- Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B, Gutierrez E, Chávez L, Duarte P, Chavarría S, Rivera-Reyes HH. Leptospira: ¿simulador o causante de leucemia? *Rev Cub Med Trop* 2005; 57: 17-24.
- Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B., Rivera-Reyes HH. Leptospirosis humana crónica. En: Narro-Robles SO, López BJJ (eds). *Diagnóstico y Tratamiento en la Práctica Médica*. 3a ed. México: Manual Moderno; 2008.
- Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B. Enfermedades simuladas y acompañantes de leptospirosis. *Rev Cub Med Trop* 2005. 57:75-76.
- Velasco-Castrejón O. Seguimiento de casos de leptospirosis. En: *Importancia de la leptospirosis como una zoonosis emergente en México*. México: Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, SSA; 1998.
- WHO/ILS. *Human Leptospirosis. Guidance for diagnosis surveillance and control*. WHO-ILS; 2002.
- Frenkel JK. La inmunidad en la toxoplasmosis. *Bol Sanit Panam* 1986; 100.
- Centro Panamericano de Zoonosis. *Procedimientos para estudio de prevalencia de enfermedades crónicas en el ganado*. OPS-OMS. Nota técnica No. 18. 1993.
- Munday BL, Corbould. *Leptospira pomona* Infections in wombats. *J Wildlife Dis* 1973; 9: 72-73.
- Travejo RT, Rigau PJG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin GC, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Kaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Bolin CA, Braga SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua 1995. *J Infect Dis* 1998; 178: 1457-1463.

23. Chandrasekaran S, Gomathi S. A standard screening test for the early and rapid diagnosis of leptospirosis. *Indian J Medical Microbiol* 2004; 22 (1): 23-27.
24. Anderson JF, Miller AD, Post J, Johnson RC, Magnarelli LA, Andreades TG. Isolation of *Leptospira interrogans* from the skin of a dog. *JAMVA* 1993; 203: 1550-1551.
25. Tappero JW, Sanders EJ, Ashford DA, Perkins BA, Shutt KA, Leake JA, Bragg SL, Spiegel RA, Rigau-Perez JG, Bruce MG, Zaidel O, Aye T, Deseda CC. Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. *Acta Tropica* 2005; 96 (1): 36-46.
26. Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B, Becker I, Velasco CA. VECOVISION, un nuevo método imagenológico para el diagnóstico definitivo de leptospirosis. *Rev Cub Med Trop* 2002; 54: 67.
27. Bartholomew JW. Stains for microorganisms in smears. In: Clark George (ed). *Staining Procedures*. 4th ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; 1981. p. 409-410.
28. Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, Obregón AM, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez N, Rodríguez JE, Martínez MB. International course of laboratory methods for diagnosis of leptospirosis. II Taller Internacional de Leptospirosis, La Habana, Cuba.
29. Javois Lorette C. *Immunocytochemical methods and protocols* 115. 2nd ed. Totowa, NJ: Human Press; 1999.
30. Schollum LM, Blackmore DK. Leptospirosis of pigs farms. The results of a serological survey. *NZ Med J* 1982; 12 (95): 299-301.
31. Kingscote BF. Leptospirosis: An occupational hazard to veterinarians. *Can Vet J* 1986; 27: 78-81.
32. McDonough. Leptospirosis in dogs – current status. In: *International Veterinary Information Service* (www.ivis.org) L Carmichael (ed). Ithaca, New York, USA. 2001.
33. Biosecurity Australia. A scientific review of leptospirosis and implications for quarantine policy. Australia: Department of Agriculture, Fisheries & Forestry; 2000.
34. Srivastava SK, Gupta BR, Harbola PC. Humoral immune response in *Leptospira* infected experimental goats. *Ind J Anim Sci* 1989; 59: 1213-1216.
35. Morales GA, Guzmán VH, Beltrán LE. Leptospirosis in Colombia: Isolation of *Leptospira* spp from the kidneys of brown rats (*Rattus norvegicus*) trapped on infected piggeries. *Trop An Health Prod* 1978; 10: 121-123.