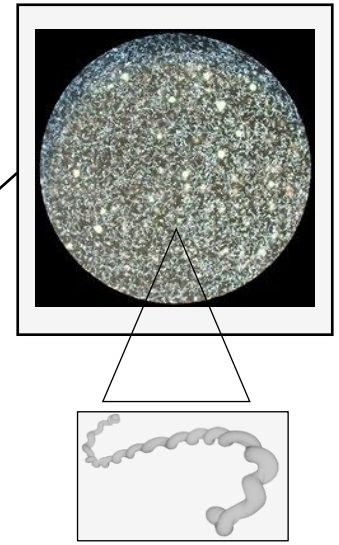
“Criterios de Diagnóstico de Laboratorio para Leptospirosis”

Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas
Centro Nacional de Salud Pública
Instituto Nacional de salud



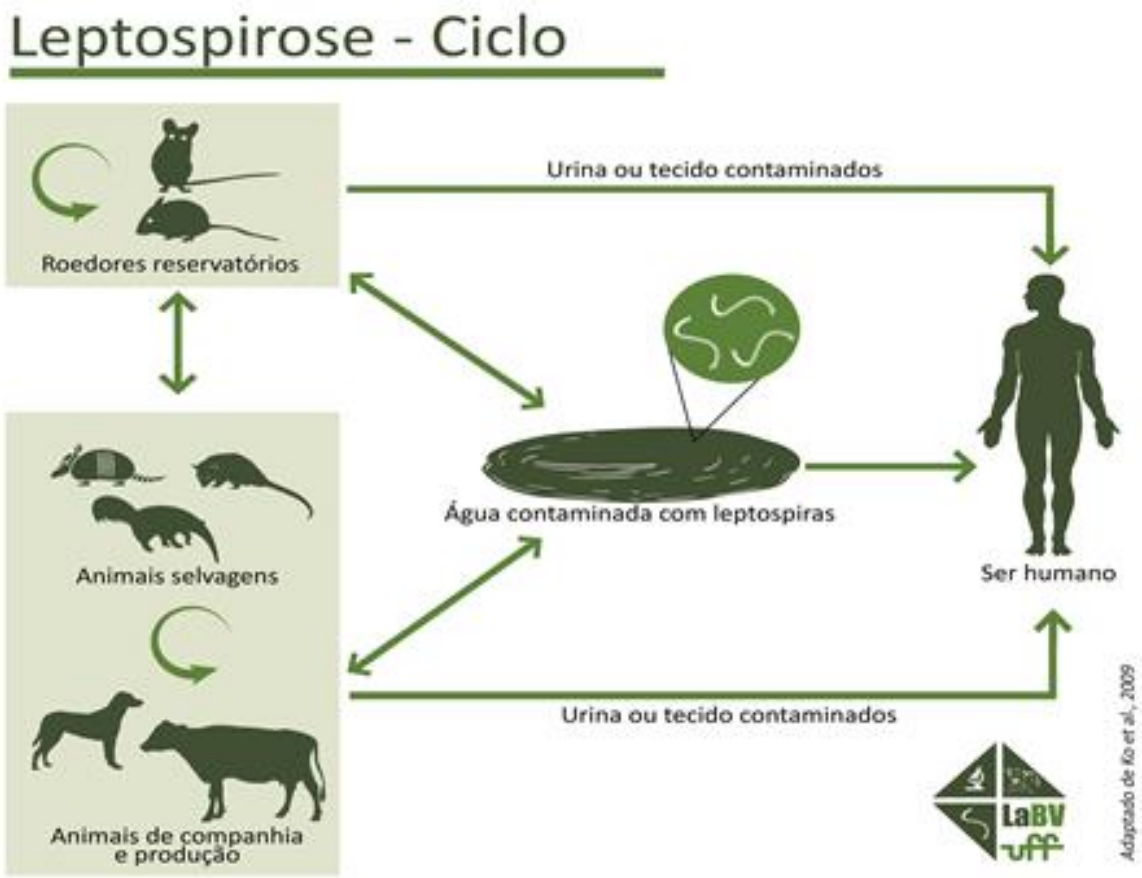
Leptospira spp.

LEPTOSPIROSIS

Enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas llamadas **leptospiras** que son transmitidas, directa o indirectamente, desde los animales a los seres humanos siendo, por tanto, una **zoonosis**. La transmisión entre humanos ocurre muy raramente.

Existen dos grupos de leptospiras:

- **Patógenas (Infecciosos)**, se han descrito alrededor de 200 serovares.
- **Saprofíticas (No infecciosos).**



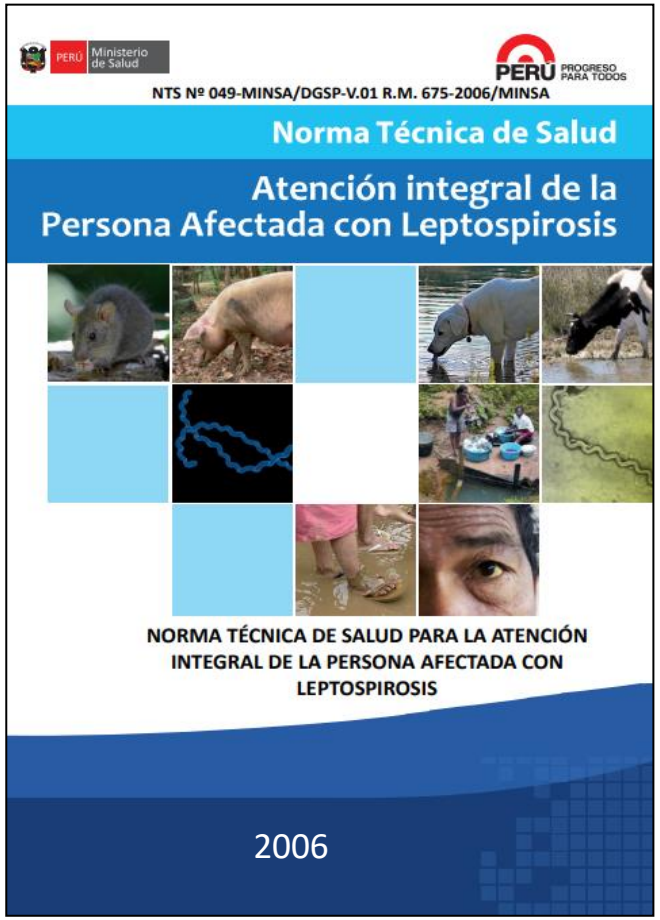
APOYO DEL DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO

El apoyo del laboratorio es necesario para:

- **CONFIRMAR EL DIAGNÓSTICO;** la leptospirosis es difícil de diferenciar desde el punto de vista clínico de un gran número de enfermedades. Los métodos de laboratorio ayudan a confirmar la leptospirosis en donde se sospecha la enfermedad en base a los aspectos clínicos.

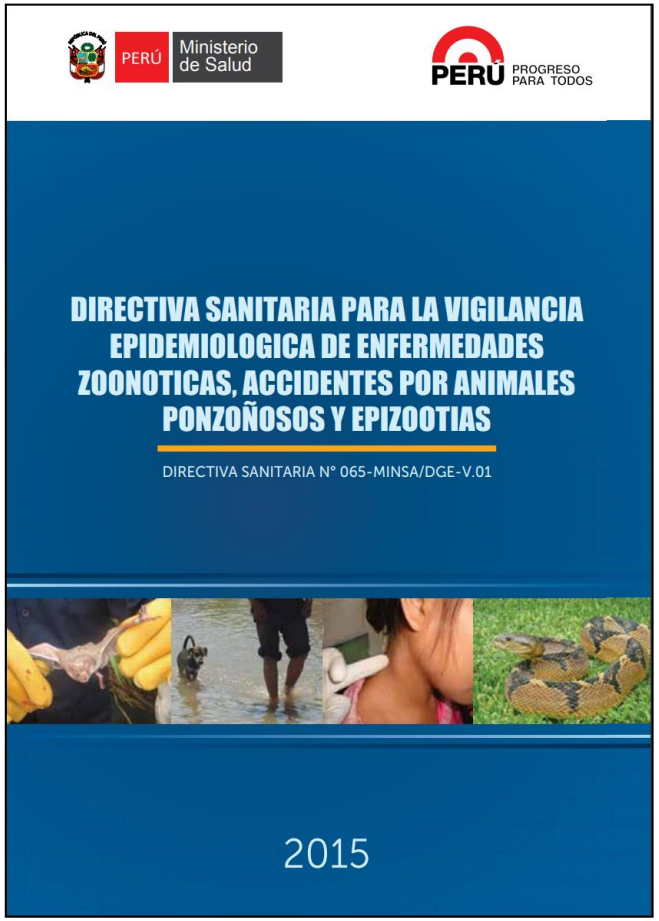
- **RAZONES EPIDEMIOLÓGICAS Y DE SALUD PÚBLICA;** tales como determinar el serovar que está causando la infección, la probable fuente de infección, el reservorio potencial y su ubicación, todo lo que contribuye a definir las estrategias de control.

NORMATIVA VIGENTE PARA LA VIGILANCIA DE LEPTOSPIROSIS EN EL PERÚ



Definición de Casos

Ficha Clínica_epidemiologica



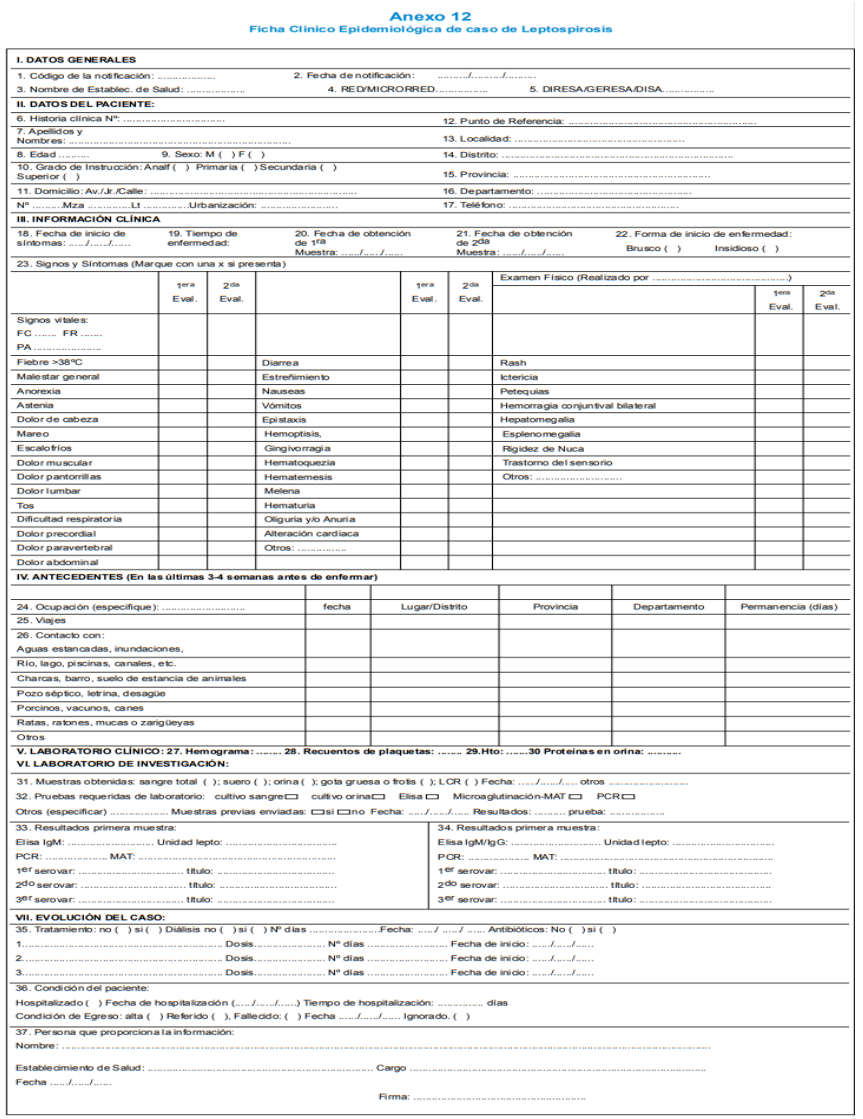
http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3418.pdf

1. FICHA CLÍNICA- EPIDEMIOLÓGICA

Recomendaciones

- Registrar completamente los datos en forma completa, clara y legible.
- Emplear la ficha clínico epidemiológica adecuada.
- Consignar datos como:
  - ✓ **Nombres y apellidos completos.**
  - ✓ **DNI**
  - ✓ **Fecha toma de muestra.**
  - ✓ **Fecha inicio de síntomas.**
  - ✓ **Tiempo de enfermedad.**
  - ✓ **Sintomatología.**

http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3418.pdf



Anexo 12
Ficha Clínico Epidemiológica de caso de Leptospirosis

I. DATOS GENERALES

1. Código de la notificación: ..... 2. Fecha de notificación: ...../...../.....
3. Nombre de Establec. de Salud: ..... 4. RED/MICRORRED..... 5. DIRESA/GERESA/DISA.....

II. DATOS DEL PACIENTE:

6. Historia clínica Nº: ..... 12. Punto de Referencia: .....
7. Apellidos y Nombres: ..... 13. Localidad: .....
8. Edad ..... 9. Sexo: M ( ) F ( ) 14. Distrito: .....
10. Grado de Instrucción: Analf ( ) Primaria ( ) Secundaria ( ) Superior ( ) 15. Provincia: .....
11. Domicilio: Av./Jr./Calle: ..... 16. Departamento: .....
Nº ..... Mza ..... Lt ..... Urbanización: ..... 17. Teléfono: .....

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

18. Fecha de inicio de síntomas: ...../...../..... 19. Tiempo de enfermedad: 20. Fecha de obtención de 1ra Muestra: ...../...../..... 21. Fecha de obtención de 2da Muestra: ...../...../..... 22. Forma de inicio de enfermedad: Brusco ( ) Insidioso ( )

23. Signos y Síntomas (Marque con una x si presenta)

	1era Eval.	2da Eval.		1era Eval.	2da Eval.	Examen Físico (Realizado por .....)	1era Eval.	2da Eval.
Signos vitales: FC ..... FR ..... PA								
Fiebre >38ºC			Diarrea			Rash		
Malestar general			Estreñimiento			Ictericia		
Anorexia			Nauseas			Petequias		
Astenia			Vómitos			Hemorragia conjuntival bilateral		
Dolor de cabeza			Epistaxis			Hepatomegalia		
Mareo			Hemoptisis,			Esplenomegalia		
Escalofríos			Gingivorragia			Rigidez de Nuca		
Dolor muscular			Hematoquezia			Trastorno del sensorio		
Dolor pantorrillas			Hematemesis			Otros:		
Dolor lumbar			Melena					
Tos			Hematuria					
Dificultad respiratoria			Oliguria y/o Anuria					
Dolor precordial			Alteración cardiaca					
Dolor paravertebral			Otros:					
Dolor abdominal								

IV. ANTECEDENTES (En las últimas 3-4 semanas antes de enfermar)

	fecha	Lugar/Distrito	Provincia	Departamento	Permanencia (días)
24. Ocupación (especifique):					
25. Viajes					
26. Contacto con: Aguas estancadas, inundaciones,					
Río, lago, piscinas, canales, etc.					
Charcas, barro, suelo de estancia de animales					
Pozo séptico, letrina, desagüe					
Porcinos, vacunos, canes					
Ratas, ratones, mucas o zarigüeyas					
Otros					

V. LABORATORIO CLÍNICO: 27. Hemograma: ..... 28. Recuentos de plaquetas: ..... 29.Hto: .....30 Proteínas en orina: .....

VI. LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN:

31. Muestras obtenidas: sangre total ( ); suero ( ); orina ( ); gota gruesa o frotis ( ); LCR ( ) Fecha: ...../...../..... otros .....
32. Pruebas requeridas de laboratorio: cultivo sangre☐ cultivo orina☐ Elisa ☐ Microaglutinación-MAT ☐ PCR☐
Otros (especificar) ..... Muestras previas enviadas: ☐si ☐no Fecha: ...../...../..... Resultados: ..... prueba: .....

33. Resultados primera muestra:	34. Resultados primera muestra:
Elisa IgM: ..... Unidad lepto:	Elisa IgM/IgG: ..... Unidad lepto: .....
PCR: ..... MAT:	PCR: ..... MAT: .....
1er serovar: ..... titulo:	1er serovar: ..... titulo: .....
2do serovar: ..... titulo:	2do serovar: ..... titulo: .....
3er serovar: ..... titulo:	3er serovar: ..... titulo: .....

VII. EVOLUCIÓN DEL CASO:

35. Tratamiento: no ( ) si ( ) Diálisis no ( ) si ( ) Nº días .....Fecha: ...../...../..... Antibióticos: No ( ) si ( )
1..... Dosis..... Nº días ..... Fecha de inicio: ...../...../.....
2..... Dosis..... Nº días ..... Fecha de inicio: ...../...../.....
3..... Dosis..... Nº días ..... Fecha de inicio: ...../...../.....

36. Condición del paciente:
Hospitalizado ( ) Fecha de hospitalización (...../...../.....) Tiempo de hospitalización: ..... días
Condición de Egreso: alta ( ) Referido ( ), Fallecido: ( ) Fecha ...../...../..... Ignorado. ( )

37. Persona que proporciona la información:
Nombre: .....
Establecimiento de Salud: ..... Cargo .....
Fecha ...../...../.....
Firma: .....

2. TIPOS DE MUESTRAS CLÍNICAS

2.1. Sanguíneas
- **Sangre Total**
- Suero

2.2. Otros Fluidos
- Orina
- LCR

2.3. Tejidos
- Riñón
- Hígado
- Otros

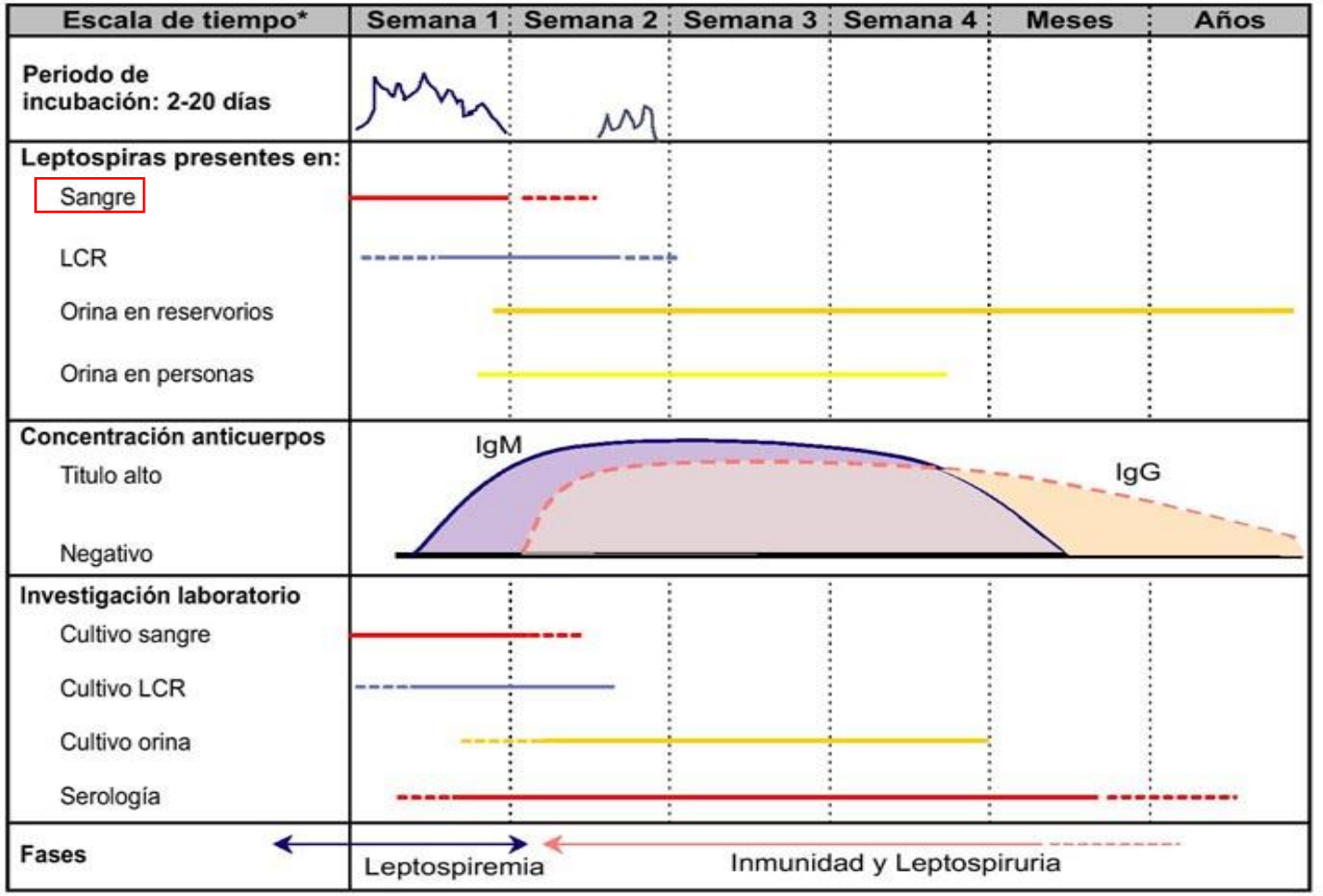
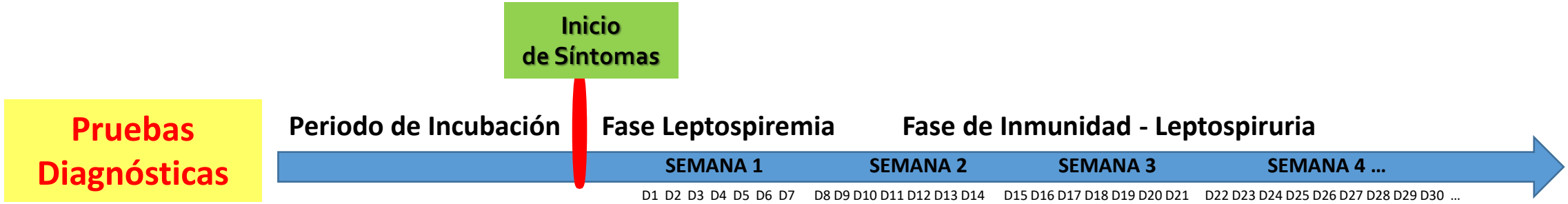


Figura 3. Leptospirosis naturaleza bifásica e investigación dentro de sus diferentes estados de enfermedad.* *Desde inicio de sintomatología.*

3. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS CLÍNICAS :



ELISA y MAT

SUERO: **1era :** 1-2mL **2da:** 1-2mL: 10 a 28 día de tomada la primera muestra

SANGRE TOTAL* : 2mL

CULTIVO* y PCR

LCR : 2mL

ORINA : 50mL/ Sedimento: de 10 a 28 días de inicio de síntomas

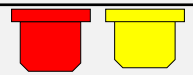
TEJIDOS : 5mm³ : Necropsia

Transporte y conservación:** **Refrigerado 2-8ºC, Temperatura de Ambiente

4. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS :

Las **muestras sanguíneas validadas** para el diagnóstico de Leptospirosis es el **suero** y **sangre total** :

- Para la obtención de **suero** se utilizarán tubos de extracción al vacío sin anticoagulantes (Tapa roja o amarilla).
- Para la obtención de **sangre total** se utilizarán tubos de extracción al vacío con anticoagulante EDTA (tapa lila).

CÓDIGO DE COLOR	ADITIVO	MUESTRA	ANÁLISIS
	Sin aditivo	**Suero**	**Serología**
	**Gel/Sin aditivo**	**Suero**	**Serología**
	Citrato	Plasma	Coagulación
	EDTA	**Sangre Total**	**Molecular / Microbiología**
	Heparina	Plasma	Química Serología
	Citrato	Plasma	Velocidad Horaria de Sedimentación
	Fluoruro	Plasma	Glucosa

5. RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS :

ORINA: **Campo Oscuro**

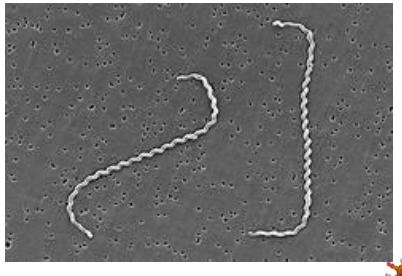
Alcalinizar

- 24 horas antes, administrar una tableta de acetazolamida 250mg, o
- 12 horas antes, ½ cucharadita de bicarbonato de sodio disuelto en un vaso con agua.

6. PRUEBAS DE LABORATORIO USADAS EN EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS

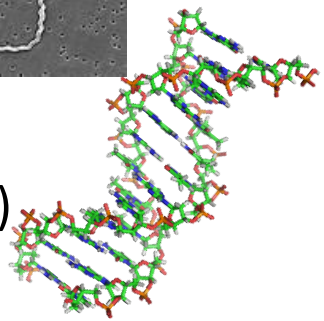
PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS :

CULTIVO → Aislamiento de la Leptospira (**Viabilidad de la bacteria**)



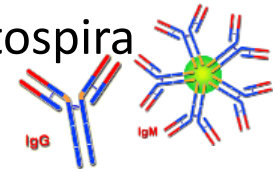
PRUEBAS MOLECULARES :

PCR → ADN de la Leptospira (**Viabilidad y No Viabilidad de la bacteria**)

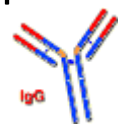


PRUEBAS SEROLÓGICAS :

MICROAGLUTINACIÓN-MAT → Anticuerpos Totales contra Leptospira (**Actividad de los anticuerpos**)

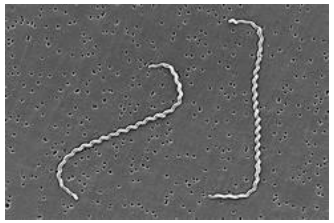
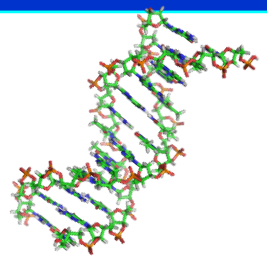
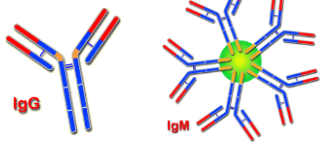
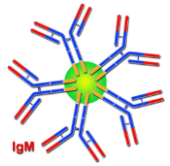


ELISA IgM → Anticuerpos IgM contra Leptospira (**Actividad de los anticuerpos**)



7. MÉTODOS DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS :

ACCESIBILIDAD

MÉTODOS DIRECTOS		MÉTODOS INDIRECTOS	
			
Cultivo (aislamiento)	PCR (detección de ADN)	Microaglutinación (MAT)	ELISA IgM

CONFIANZA

8. CLASIFICACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LEPTOSPIROSIS :

8.1. PRUEBA DE TAMIZAJE → **alcanza** → **Diagnóstico probable de leptospirosis**

Prueba de **ELISA IgM**, siendo necesaria realizar su confirmación mediante la **prueba MAT.**

8.2. PRUEBAS CONFIRMATORIAS → **alcanza** → **Diagnóstico Confirmatorio de leptospirosis**

- Prueba de **Cultivo**
- Prueba de **PCR**
- Prueba de **Microaglutinación (MAT)**

CARTERA DE SERVICIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS

MÉTODO DE ENSAYO	DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO	TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN REQUERIDO DE LA MUESTRA O CANTIDAD	INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL PACIENTE	CONDICIONES DE LA MUESTRA	ENVASE PARA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA PRIMARIA	CONSERVACIÓN Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO LUEGO DE LA TOMA DE MUESTRA	INSTRUCCIONES PARA EL TRANSPORTE DE LA MUESTRA
ELISA para detección de anticuerpos IgM e IgG de Leptospira.	Se basa en la reaccion antigeno-anticuerpo mediante la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG producto de una infección por Leptospira spp. Es considerada una prueba de tamizaje	Suero	≥ 1ml	Debe encontarse en fase aguda a partir de 2 dias de iniciado los sintomas, para deteccion de IgM ó a partir de los 11 dias para deteccion de IgG. .	Sin preservantes, no hemolizado.	Tubo para extracción de sangre al vacío, sin anticoagulante.	La muestra debe mantenerse en cadena de frio de 2 a 8ºC, maximo por 7 dias.	En contenedores que cumplan las medidas de bioseguridad (sistema triple embalaje) en cadena de frío de 2 a 8 °C.
Cultivo para el diagnóstico de leptospirosis	El cultivo se basa en el crecimiento de leptospiras en un medio que contengan suero albúmina bovina fracción V, vitaminas y ácidos grasos de cadena larga, requerimientos indispensables para su desarrollo óptimo en condiciones de aerobiosis, pH y temperatura	*Sangre total. * Líquido céfalo raquídeo (LCR). * Orina. * Tejido (Riñón, Hígado, Pulmón, cerebro). * Cepa sospechosa.	* Sangre total: ≥ 2 ml * LCR: 0.5 a 2 ml. * Orina: 50 ml * Tejido: 6-8 mm^3 * Cepa sospechosa: colonias bacterianas en 5mL de medio de cultivo.	* Sangre total: Debe obternerse en fase aguda de 1 a 5 dias de inicio de sintomas, de preferencia sin tratamiento antimicrobiano previo. * LCR: Fase aguda de 4 a 7 días de inicio de sintomas, de preferencia sin tratamiento antimicrobiano previo. * Orina: De 10 a 28 días de inicio de sintomas. * Tejidos: Se realizara en caso de necropsia. * Cepa sospechosa: No aplica.	* Sangre total: Sin coágulos sanguíneos,sin contaminantes. * LCR: Sin preservantes, sin contaminantes. * Orina: Sin preservantes, sin contaminantes. * Tejido: Sin preservantes, sin contaminantes. * Cepa sospechosa: Sin contaminantes.	* Sangre total: Tubo para extracción de sangre al vacío con EDTA. * LCR: Tubo con medio de cultivo EMJH. * Orina: Frasco boca ancha. * Tejidos: Frasco de boca ancha ó tubo con medio de cultivo EMJH. * Cepa sospechosa: Tubo con medio de cultivo EMJH	* Sangre total: Temperatura de ambiente, máximo por 5 días. * LCR: Temperatura ambiente, máximo por 5 días. *Orina: Temperatura de ambiente, maximo 1 dia. *Tejido: Tempertura de ambiente, de manera inmediata. * Cepa sospechosa: Tempertura de ambiente, de manera inmediata.	En contenedores que cumplan las medidas de bioseguridad (sistema triple embalaje) a temperatura de ambiente.

MÉTODO DE ENSAYO	DEL MÉTODO DE ENSAYO	TIPO DE MUESTRA	REQUERIDO DE LA MUESTRA O CANTIDAD	CCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL PACIENTE	CONDICIONES DE LA MUESTRA	ENVASE PARA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA PRIMARIA	CONSERVACIÓN Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO LUEGO DE LA TOMA DE MUESTRA	INSTRUCCIONES PARA EL TRANSPORTE DE LA MUESTRA
Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para el diagnóstico de leptospirosis	Se basa en la amplificación y detección simultánea del ADN de *Leptospira spp* en muestras clínicas	* Sangre total. * Líquido céfalo raquídeo (LCR). *Orina. *Tejido (Riñón, Hígado, Pulmón, cerebro). *Cepa sospechosa.	* Sangre total: ≥ 2 ml ó alícuota 1 mL. * LCR: 0.5 a 2 ml. * Orina: 50 ml ó 0.5 ml de sedimento(pellet, previa centrifugación). * Tejido: 6-8 mm3 * Cepa sospechosa: colonias bacterianas en 5mL de medio de cultivo.	* Sangre total: Debe obtenerse en fase aguda de 1 a 5 días de inicio de síntomas, de preferencia sin tratamiento antimicrobiano previo. * LCR: Fase aguda de 4 a 7 días de inicio de síntomas, de preferencia sin tratamiento antimicrobiano previo. * Orina: De 10 a 28 días de inicio de síntomas. * Tejidos: Se realizara en caso de necropsia. * Cepa sospechosa: No aplica.	* Sangre total: sin coágulos sanguíneos, sin contaminantes. * LCR: Sin preservantes, sin contaminantes. * Orina: Sin preservantes, sin contaminantes. * Tejido: Sin preservantes, sin contaminantes. * Cepa sospechosa: Sin contaminantes.	* Sangre total: Tubo para extracción de sangre al vacío con EDTA ó vial (alícuota). * LCR: Vial. * Orina: Frasco ó vial (pellet). * Tejidos: Frasco. * Cepa sospechosa: Tubo con medio de cultivo EMJH	* Sangre total: Temperatura de ambiente ó en cadena de frio de 2 a 8°C, máximo por 5 días. * LCR: Temperatura ambiente ó en cadena de frio de 2 a 8oC, máximo por 5 días. * Orina: Temperatura de ambiente máximo 1 día ó pellet en cadena de frio de 2 a 8oC máximo por 5 días. * Tejido: Temperatura de ambiente ó en cadena de frio de 2 a 8oC, de manera inmediata. * Cepa sospechosa: Temperatura de ambiente ó en cadena de frio de 2 a 8oC, de manera inmediata.	En contenedores que cumplan las medidas de bioseguridad (sistema triple embalaje) a temperatura de ambiente ó en cadena de frio de 2 a 8°C .
Prueba de Microaglutinación (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis	Se basa en la reacción antígeno vivo (Leptospira) y anticuerpos totales mediante diluciones seriadas hasta observar en el microscopio de campo oscuro el 50 % de aglutinaciones como punto final de la reacción.	Suero	≥ 1ml	Debe obtenerse a partir de 3 a 30 días de iniciado los síntomas.	Sin preservantes, no hemolizado.	Tubo para extracción de sangre al vacío, sin anticoagulante.	En cadena de frio de 2 a 8oC, máximo por 7 días.	En contenedores que cumplan las medidas de bioseguridad (sistema triple embalaje) en cadena de frío de 2 a 8 °C

Transferencia Tecnológica a los Laboratorios de Referencia Regional, Laboratorios Referenciales, DIRIS, DIRESA y Hospitales en técnicas serológicas, microbiológicas y moleculares:

a. **ELISA para detectar anticuerpos de tipo IgM y CULTIVO.**

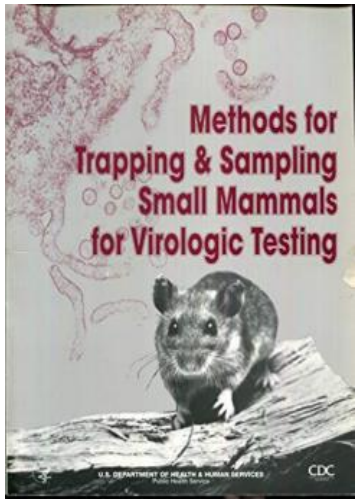
b. **PCR EN TIEMPO REAL** para el diagnóstico de Leptospirosis (Piura, La Libertad, San Martín).

Con proyección de Transferencia Tecnológica RT-PCR a Ucayali, Lambayeque, Madre de Dios e Ica.

VIGILANCIA BASADA EN LABORATORIO

"Vigilancia de leptospirosis en regiones endémicas del Perú"

Documentos Internacionales de Referencia



MEMORANDO Nº 154-2016-DEET-CNSP/INS

A : Blgo.
MANUEL CESPEDES ZAMBRANO
Responsable del Laboratorio de Zoonosis Bacteriana
Centro Nacional de Salud Pública

ASUNTO : Protocolo de Vigilancia APROBADO

REFERENCIA : Nota Informativa Nº 167-2016-LAB.
ZOON.BACTERIANAS-DEET-CNSP/INS
Registro Nº 14550-16

FECHA : Lima, 15 agosto del 2016

Tengo a bien de saludarle cordialmente y en atención al documento de referencia, estamos adjuntando al presente, el Protocolo de Vigilancia **"Vigilancia de Leptospira en Regiones Endémicas de Perú"**, debidamente **APROBADO**, para que realice la ejecución del proceso, en los tiempos establecidos, según el cronograma indicado en su protocolo.

Sin otro particular, se despide de usted.

Atentamente,

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
MSc. George Obregón Bolton

15 AGO. 2016
RECIBIDO

Leptospirosis (2016)

Establecen :

- **La Importancia** de la **vigilancia basada en laboratorio** para complementar la vigilancia en humanos **es identificar fuentes de infección que permitan establecer medidas de prevención y control.**

VIGILANCIA BASADA EN LABORATORIO

ÁREAS ENDÉMICAS DE LEPTOSPIROSIS:

- **LORETO** (Provincia Maynas, Alto Amazonas; Mariscal Ramón Castilla)
- **UCAYALI** (Ámbito de la Provincia Callería y Yarinacocha)
- **SAN MARTIN** (Ámbito de la Provincia San Martin)
- **MADRE DE DIOS** (Provincia Tambopata, Manu)
- **LA LIBERTAD** (Provincia Trujillo y Ascope)
- **LAMBAYEQUE** (Provincia Lambayeque)

ACTIVIDAD:

Vigilancia Pasiva, se da a través de captación de casos en Establecimientos de Salud. ⇒

Vigilancia Activa, se da a través de toma de muestras:

- Fuentes de Aguas.
- Canes centinela.
- Roedores.

⇒

Diagnóstico de Laboratorio

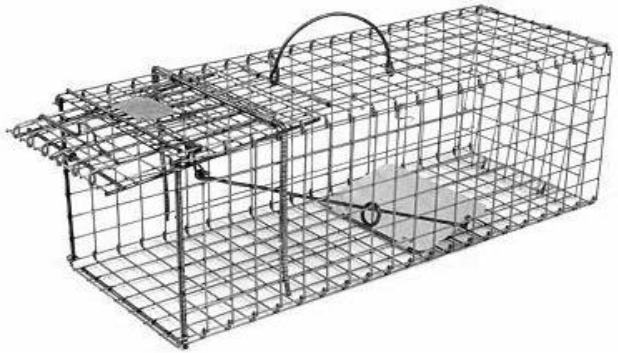
Vigilancia de *Leptospira spp*. basada en Laboratorio

VIGILANCIA ACTIVA

CAPTURA VIVA DE ROEDORES

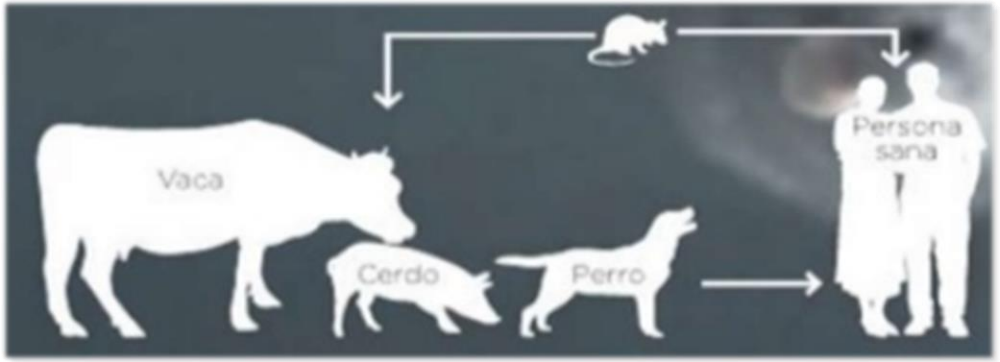
Involucra un conjunto de actividades

Reservorios
de
Leptospira/Peste



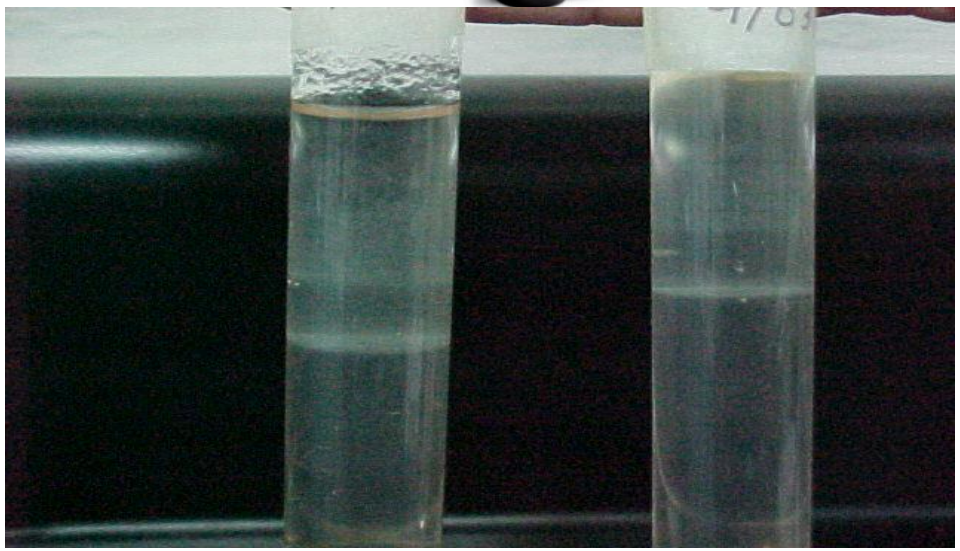
TOMA DE MUESTRA DE SANGRE EN CANES Y ANIMALES MAYORES

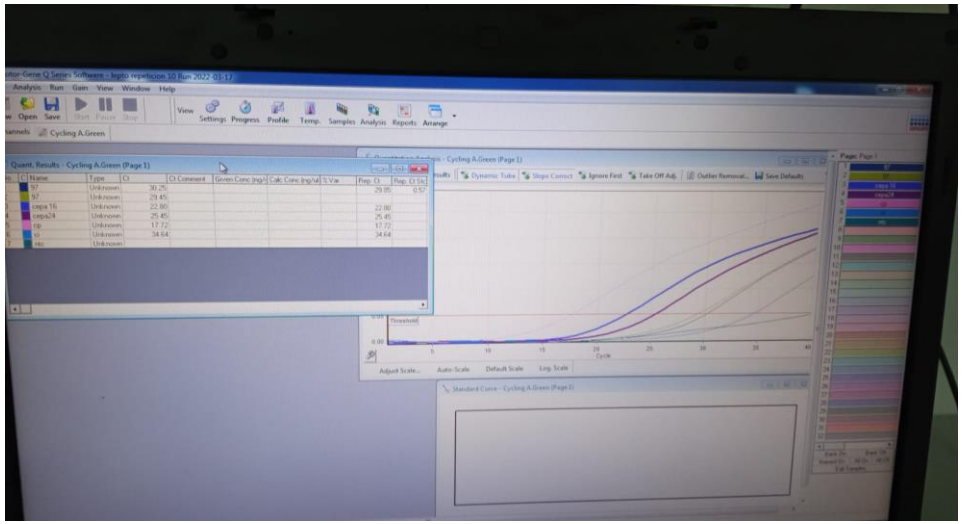
venas cefálica y safena



vena yugular

TOMA DE MUESTRAS AMBIENTALES: AGUAS





MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

GRACIAS

Correo de contacto:
Blgo. John E. Calderón Escalante
jcalderon@ins.gob.pe
Co-Responsable del LRN Metaxénicas y Zoonosis Bacterianas