

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**COMPARACION DE METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE
LEPTOSPIROSIS EN PACIENTES QUE ASISTEN A LA EMERGENCIA
DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS**

Informe de Tesis

Presentado por

Jorge Antonio Orantes Peñate

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala marzo del 2003

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIBLIOTECA CENTRAL

DL
06
T(2122)

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Magali Sandoval de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Jorge José García Polo	Vocal IV
Br. Liza Leonor Carranza Juí	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

Por enseñarme a amar la vida.

A mis Padres

Nidia y Jorge

Por amarme y darme el apoyo y la confianza para salir adelante en mis estudios.

A mis hermanos y sobrinos

Karla, Alex, Juan Pablo, Mauricio, Mauricio, Diego, Marié André y María José.

Por ese amor que nos une.

A mi asesora de Tesis

Denny Guarán

Por creer y confiar en mi.

A mis padrinos

Patty, Sergio y Christian

Por el ejemplo que me han dado como profesionales.

A mis amigos

Patty, Luis, Roberto, Sergio Christian, Marino, Maco, Dalia, Débora, María José, Guisela, Willy, Lucy, Claudia, Anabella, Ana Cristina, Omar, Gerbert, Adolfo, Leonel, Jorge.

Al personal de la tarde del laboratorio del HGSJD

Por ese apoyo técnico y moral que me brindaron durante el estudio.

AGRADECIMIENTOS

A Licda. Denny Guarán por su apoyo y paciencia en la realización de este estudio.

Al Dr. Mario René Contreras por permitirme realizar este estudio en la emergencia de adultos del Hospital General San Juan de Dios.

Al personal médico de la emergencia de adultos del Hospital General San Juan de Dios. Por ser parte importante en la selección de los pacientes.

A los licenciados: Blanca Samayoa, Isabel Juárez, Kenia Caballeros, Flor de María de Díaz, Martín Gil, Lorena Pérez, Amanda Gálvez, María del Carmen Bran, Mirian Alcázar, Karla Escobar, Isabel Massanet, Anabella Ayala, Ana Cristina del Cid, Arturo Morales, Carlos Mancilla. Por el apoyo técnico y aporte de sus conocimientos.

Al personal técnico del laboratorio del Hospital General San Juan de Dios y Ultralab: Rosa María, Paty, Josué, Marlón, Laura, Gladis, Brenda, Telma, Hortensia, Marisol, Ligia, Miguel, Ileana y Jorge. Parte importante del equipo de investigación.

Al Hospital General San Juan de Dios, Sanatorio Nuestra Señora del Pilar, Laboratorio Ultralab, Hospital de Enfermedad Común (IGSS), ABBOTT y ROCHE, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este estudio.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
A. Generalidades	5
B. Agente Etiológico	6
C. Distribución	7
D. Reservorio	10
E. Mecanismos de Transmisión	10
F. Hallazgos Patológicos y Patogénicos	11
G. Manifestaciones Clínicas	12
H. Diagnóstico	18
I. Tratamiento	24
J. Inmunización	26
IV. Justificación	27
V. Objetivos	28
VI. Materiales y Métodos	29
VII. Resultados	34
VIII. Discusión de resultados	43
IX. Conclusiones	50
X. Recomendaciones	52
XI. Referencias	54
XII. Anexos	58

I. RESUMEN

La característica social y económica de Guatemala es un factor determinante en la presencia de leptospirosis en la población. En la mayoría de los hospitales nacionales no se conoce sobre ésta patología y es confundida con, hepatitis, citomegalovirus y mononucleosis infecciosa entre otras, por lo tanto es importante conocer los factores que se asocian a ésta enfermedad y dar un diagnóstico certero de la misma escogiendo el método más adecuado de detección y así, poder establecer un patrón del número de casos detectados y confirmados. El presente estudio se realizó con el objetivo de comparar 3 métodos para el diagnóstico de leptospirosis por campo oscuro, aglutinación en látex y ELISA, en la emergencia del Hospital General San Juan de Dios, así también establecer los factores asociados y la incidencia de ésta. Para ello se realizó un estudio descriptivo transversal de 90 pacientes que presentaron el cuadro clínico de leptospirosis. Los datos para establecer estos factores fueron recolectados en un cuestionario que contenía características demográficas del paciente y factores predisponentes. Todas las variables observadas se estudiaron por un análisis multivariado (Chi cuadrado) para determinar la relación entre las variables y la presencia de la enfermedad, así como la sensibilidad y la especificidad de cada método.

De los 90 pacientes estudiados 17 presentaron más de una enfermedad asociada a leptospirosis. Las enfermedades que se presentaron con mayor frecuencia en los pacientes fue la leptospirosis (73 %), seguida de citomegalovirus (14.44 %) y mononucleosis infecciosa, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y dengue corresponden al 6.66 % restante. En cuanto a las pruebas hematológicas realizadas en el laboratorio, el 77.27 % de los pacientes presentaron neutrofilia y el 42.42 % trombocitopenia, la cual puede estar asociada a coagulación intravascular diseminada (CID). Es importante evaluar la función hepática y renal de los pacientes por la relación que pueda existir entre el agente causal y los órganos involucrados, el 59.09 % tuvieron valores altos de bilirubina directa, el 34.85 % de alaninaaminotransferasa (ALAT) y el 45.45 % de aspartatoaminotransferasa (ASAT). En cuanto a la función renal, el 3.33 % tenían niveles de nitrógeno de urea (BUN) arriba de los 100 mg/dl y el 2.22 % la creatinina arriba de 8 mg/dl. Los criterios para definir el diagnóstico dependen del aislamiento del organismo o de los niveles elevados de títulos de anticuerpos,

por eso es tan importante hacer una buena elección de los métodos. Los métodos comparados con el ELISA presentaron sensibilidades de 38 % para campo oscuro y 33% el de aglutinación en látex y especificidades de 45 y 44 % respectivamente.

La principal característica clínica asociada a leptospirosis fue la ictericia del paciente, la incidencia de leptospirosis de la población estudiada fue del 73.33 %, ninguno de los factores predisponentes se relacionan con el padecimiento de leptospirosis, los métodos de campo oscuro y aglutinación en látex no son adecuados para el diagnóstico de leptospirosis. Lo anterior es representativo únicamente en la población estudiada (N = 90).

Se recomienda educar al personal médico y de laboratorio sobre la importancia que tiene el tratar esta enfermedad, ya que podría causar fallo renal y hepático, y así provocar la muerte. A todo paciente que presente el cuadro clínico de las enfermedades anteriormente mencionadas asociadas a leptospirosis se le debe realizar alguna prueba específica para el diagnóstico de la misma.

II. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de diversa distribución, causada por una bacteria de especie patógena, *Leptospira*. El espectro de la enfermedad es extremadamente amplio, desde una infección subclínica a un síndrome severo de infección multiorgánica con alta mortalidad. Este síndrome, leptospirosis icterica con fallo renal, fue reportado en 1886 por Adolf Weil en Heidelberg. La leptospirosis fue ciertamente reconocida como una enfermedad de riesgo o exposición ocupacional de campesinos arroceros en China y Japón (1).

La primera *Leptospira* patógena fue observada por Stimson en New Orleans, en el año de 1907, en cortes de riñón humano con una tinción a base de plata, que se creía había muerto de fiebre amarilla; al organismo descubierto le llamó *Spirochaeta interrogans*, ya que su terminación es en forma de gancho parecido a un signo de interrogación (1).

La importancia de la ocupación como un factor de riesgo fue reconocida tempranamente. El papel de las ratas como una fuente de infección humana fue descubierta en 1917, así también se reconoció el potencial de la enfermedad por *leptospira* en perros, aunque la clara distinción de la infección canina con *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* y *canicola* tomó varios años (1).

La infección en el hombre y de los animales se produce por vía directa o indirecta. A través de la piel y de las mucosas bucal, nasal y conjuntival. La vía más común es la indirecta, a través de aguas, suelo y alimentos contaminados por orina de animales infectados (1).

El primer caso humano, confirmado microbiológicamente en Guatemala, fue efectuado por el Dr. QB. Miguel Torres en 1980 y el serogrupo fue confirmado por la Dra. C. Suizel en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), correspondiendo al serogrupo *copehaghani* (2). A partir de 1998 el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala ha detectado serológicamente 22 casos.

Se realizó un estudio prospectivo, en el cual se muestrearon sueros de 90 pacientes que ingresaron a la emergencia de adultos del Hospital Nacional San Juan de Dios. Se empleó el método de campo oscuro para observar espiroquetas en las muestras y se realizaron pruebas de aglutinación en látex y ELISA para la detección de anticuerpos de inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG). Se efectuaron dos muestreos; el

primero se llevó al ingreso del paciente al servicio de emergencia con la sintomatología característica y el segundo, una o dos semanas después de que presentaron síntomas. Se realizaron las pruebas de: alaninaaminotransferasa (ALAT), aspartatoaminotransferasa (ASAT), fosfatasa alcalina, bilirrubinas, nitrógeno de urea, creatinina, hematología completa. El muestreo se llevó acabo en los meses de mayo a octubre del 2002. El propósito del estudio fue determinar la eficiencia de los métodos de campo oscuro y aglutinación en látex comparado con el método ELISA.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa del hombre, los perros, el ganado bovino, los cerdos, los caballos, los roedores y algunos otros mamíferos. Esta enfermedad es producida por organismos vivos llamados leptospiras. El nombre descriptivo proviene de las palabras griegas que significan "espiral fina" (3).

La leptospirosis se conoce también con los nombres de enfermedad de Weil, fiebre canícola, ictericia espiroquética (hemorrágica), fiebre del cieno, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, leptospirosis porcina y enfermedad de los porqueros. Se considera como la zoonosis de mayor diseminación a nivel mundial y frecuencia en los países tropicales, constituyendo un grupo de enfermedades bacterianas que determinan una infección aguda generalizada, caracterizada por vasculitis extensa (4). De manera primaria es una enfermedad de animales salvajes y domésticos; en el hombre es una enfermedad ocupacional o accidental (2).

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis en humanos y animales son variables y van desde un aparente resfriado hasta una enfermedad icterica que afecta el riñón y el hígado (4). El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, cefalea, escalofríos, hiperestesia cutánea, mialgias intensas (pantorrillas, región lumbar y muslos) y sufusión conjuntival. A ésto se agregan náuseas, vómitos o dolor abdominal, tos o faringitis, linfadenopatías, hepatomegalia, exantema, ictericia y hemorragia gastrointestinal. En casi la mitad de los pacientes, el inicio es "brutal", con inicio de síntomas floridos en una o dos horas. A veces se le diagnostica erróneamente como meningitis o encefalitis (3,5).

La tasa de letalidad es baja pero aumenta conforme avanza la edad y puede llegar a 20% o más en los pacientes con ictericia y lesión renal que no han sido tratados con diálisis renal, la muerte se debe principalmente a la insuficiencia hepatorrenal, al síndrome de difusión respiratoria del adulto o a arritmias por afección del miocardio (3,5).

La enfermedad clínica dura de unos pocos días a tres semanas o más (3,5). En términos generales muestra dos fases: la leptospirémica o febril, seguida de la convalecencia o fase inmune (2,5). El restablecimiento en casos no tratados puede durar varios meses (3,5). Las infecciones pueden cursar asintomáticas (3-5).

B. Agente etiológico

Las leptospiras son bacterias filiformes de 5 a 20 μm de largo y muy delgadas, de 0.5 μm de ancho; presentan espirales apretadas y regulares y uno o ambos extremos se curvan en forma de gancho. Tienen movimientos de rotación rápida sobre su eje longitudinal y traslación en dirección axial (2); son miembros del orden Spirochetales. Las patógenas pertenecen a la especie *Leptospira interrogans*, que se ha subdividido en serovariedades de las cuales se han identificado más de 180, denominadas serovares (2-5), que pertenecen a unos 23 serogrupos (ver anexo # 1), con base en la afinidad de ADN (4,5). Las serovariedades más frecuentes en infecciones humanas incluyen *L. interrogans* serovar *canicola*, como lo indica su nombre, es la especie asociada en forma principal con los perros. Se mantiene en ellos y se propaga fundamentalmente a través de la orina de los perros infectados a otros perros y al hombre, al ganado bovino y los gatos. La fiebre que produce en los humanos se puede llamar "fiebre canícola". Tiende a causar más nefritis tanto en los perros como en el hombre y más meningitis en éste que las otras especies mencionadas. De costumbre, es más grave en los niños que en los adultos; *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, así llamada por los síntomas que produce, durante la primera guerra mundial causó millares de muertes en soldados, pero en condiciones normales solo se encuentra en ocasiones en el hombre o en los perros. Se mantienen en los roedores, los cuales revelan una incidencia elevada. Su orina contaminada propaga la enfermedad a otros roedores, a los perros, a otros animales y, algunas veces, al hombre. Desde el punto de vista clínico, causa más ictericia y más perturbaciones en los ojos de los perros y en el hombre; de costumbre es funesta para los conejos de indias y causa infección no visible en las ratas que la albergan, aunque las autopsias de estos roedores revelan riñones dañados: *L. interrogans* serovar *pomona*, denominada así por el sector de Australia donde fue reconocida por primera vez como una enfermedad febril de los granjeros lecheros, se ha hallado ahora en las vacas, terneros, cerdos, siervos y en leche cruda de ganado vacuno

hallado ahora en las vacas, terneros, cerdos, siervos y en leche cruda de ganado vacuno infectado. Los seres humanos se han infectado después de nadar en agua contaminada, en especial charcas utilizadas por los animales antes mencionados, entre otras serovariedades también podemos mencionar: *L. interrogans* serovar *autoumnalis*, *L. interrogans* serovar *australis*, *L. interrogans* serovar *bataviae* (3).

La membrana externa de la leptospira contiene lipoproteínas (LPS), llamada OMPs (outer membrane proteins), la cual es altamente inmunogénica y es la responsable del serovar específico (6).

C. Distribución

Se encuentra en zonas urbanas y rurales a nivel mundial (3). Sólo la antártida está libre de Leptospirosis (2). Las personas más expuestas al riesgo son aquellas que trabajan en arrozales, plantaciones de caña de azúcar, mataderos, así como granjeros, veterinarios, criadores de animales, los que se exponen a masas de agua dulce de ríos, canales o lagos contaminados por orina de animales domésticos o salvajes (3), también trabajadores de alcantarillados, mineros, bañistas, deportistas, y personas que acampan al aire libre en zonas afectadas (5).

En Maracaibo, Venezuela se determinó una prevalencia de 33.3% y no se encontraron diferencias significativas en la misma según sexo, pero se evidencia un incremento de ella con la edad. La positividad fue mayor en el medio rural, seguida del área marginal y urbana. En pacientes ictericos con manifestaciones de tipo respiratorio y hemorrágicas, la letalidad fue del 14.2% (7).

En niños de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba, en el período de 1982 a 1995 se diagnosticaron 253 casos, fue más frecuente el sexo masculino que el femenino, con un incremento de enfermos a partir del mes de julio, siendo agosto, octubre y noviembre los meses de mayor incidencia (8).

En la península de Yucatán, se presentó una epidemia de dengue en 1994, se guardaron los sueros obtenidos durante la fase aguda y de convalecencia de la

enfermedad; de estos se estudiaron posteriormente 100 sueros, pertenecientes a 50 pacientes que resultaron negativos a dengue; 7 (14%) resultaron positivos a *Leptospira interrogans* serovares *canícola* (3 pacientes) y *pomona* (4 pacientes) (9).

En Costa Rica el primer caso registrado fue a inicios de la década de los ochenta, que presentó un cuadro icterohemorrágico; el cuadro clínico inicialmente fue calificado como fiebre amarilla. El CDC de Atlanta determinó la presencia de la serovariedad *pomona*. En 1988 se presentó un brote epidémico de 81 casos y 4 defunciones en pacientes que estuvieron en contacto con agua contaminada en zonas de inundaciones producto de los huracanes Gilbert y Juana. De 1984 a 1994 el ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica efectuó 918 exámenes en humanos, resultando positivos 279. De enero a octubre de 1995 se registraron 173 casos en humanos (3).

En el verano de 1987, se dio un brote leptospirosis por una fuente común transmitida por el agua la cual ocurrió en la isla de Kauai en el estado de Hawaii. Se descubrió que todos los pacientes tuvieron repetidas exposiciones al río Waimea. Una serie de reservorios (animales) y agua en supuestas condiciones pudieron ser los factores de este brote (10).

Brasil reportó en 1988 en un solo mes 1062 casos en el estado de río de Janeiro, que supero la sumatoria anual de los países vecinos. Cuba 410 casos en 1987 contra 165 de todos los países del caribe. Esta disparidad debe atribuirse en gran medida a los sistemas de control y diagnóstico (11,12).

A mediados de octubre de 1995 se presentó una epidemia de leptospirosis en el área de Achuapa (León, Nicaragua), que había sufrido inundaciones de gran magnitud. En la segunda semana de noviembre se habían registrado más de 2,000 casos con 15 defunciones. Las personas que fallecieron presentaron dificultad respiratoria y hemorragias pulmonares. Estudios realizados en el CDC mediante pruebas inmunohistoquímicas determinaron la presencia de leptospirosis en tejidos hepático y renal, de tres pacientes que fallecieron. Un elemento que destaca en el estudio de la epidemia es la presencia de síntomas respiratorios severos y hemorragias pulmonares que no se habían observado en el

hemisferio occidental, aunque si habían estado asociadas a grandes brotes en Corea y China (3).

En noviembre de 1998 el Ministerio de Salud de Nicaragua tenía comprobados 14 casos positivos de leptospirosis en Chinandega, en el Hospital España, donde se recibieron en menos de 48 horas al menos a 95 pacientes con síntomas muy parecidos a leptospirosis. Se contabilizaron 4 personas fallecidas (13).

La literatura de Leptospirosis en Guatemala es reducida y la mayoría de estudios se han hecho en animales, tal es el caso del Dr. Acha y colaboradores, quién en 1963 estudió suero de animales en la costa sur, encontrando que las reacciones eran positivas en ganado bovino 41.2% y porcino 27.5% como las predominantes y correspondientes a los serotipos *pomona* y *autumnalis*, principalmente. En 1965 se hizo otro estudio en ganado bovino y 30% fueron positivos en tierras bajas y 16.31% en tierras del altiplano. En 1967 y 1970 Loukote encontró que la leptospirosis era la tercera causa de enfermedad en clínicas veterinarias de especies menores en la ciudad capital de Guatemala, más comúnmente en perros. En 1979 el informe de DIGESEPE revela los serotipos que se encontraron más comúnmente en esa dependencia en sueros de animales, siendo éstos: *autumnalis*, *icterohaemorrhagiae*, *bataviae* y *canicola* (2).

La experiencia en humanos en Guatemala, se reduce a la observación de organismos espirilados en un caso clínico compatible con la infección y 7 pacientes con sospecha, pero no confirmados, que fueron citados por los doctores F. Sosa Galicia en 1948 y M. Behar en 1949 en Tesis de graduación de la Escuela de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala (2).

El primer caso humano, confirmado microbiológicamente, fue efectuado por el Dr. QB. Miguel Torres en 1980 y el serogrupo fue confirmado por la doctora C. R. Suizel en el CDC de Atlanta, correspondiendo al serogrupo *copehaghensi* (2).

A partir de los estragos que causó el huracán Mitch en Guatemala en 1998, el Laboratorio Nacional de Salud ha estado realizando pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti *Leptospira interrogans* tipo IgM. En el año de 1998, 4 pacientes fueron positivos (3 de Izabal y 1 de la Ciudad Capital) de 25 procesados, en 1999 se analizaron 84

casos de los cuales 10 eran positivos (6 de Izabal, 2 de la ciudad capital, 1 de Sacatepequez y 1 de San Marcos). Para el año 2000 se analizaron 88 casos de los cuales 2 eran positivos (1 de Ciudad Capital y 1 de Zacapa). En el año 2001 disminuyó la cantidad de casos a 68 y no se reportó ni un caso positivo. En el año 2002 aumentó la cantidad a 6 casos positivos de 79 muestras analizadas (14).

D. Reservorio

Animales salvajes y domésticos (2,4,5), en los cuales la enfermedad puede ser sintomática y asintomática y la leptospiruria persiste por largo tiempo (4). Los casos notables son las ratas (*L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*), los cerdos (*L. interrogans* serovar *pomona*), los bovinos (*L. interrogans* serovar *hardjo*), los perros (*L. interrogans* serovar *canicola*) y los mapaches (*L. interrogans* serovar *autumnalis*). En los Estados Unidos, los cerdos parecen ser el reservorio de *L. interrogans* serovar *Bratislava* (3,5).

Otros animales incluyen a roedores ferales, venados, ardillas, zorros, mapaches, zarigüeyas, mofetas y mamíferos marinos (leones de mar) (3,5).

Las variedades que infectan a los reptiles y anfibios (ranas) al parecer no infectan al ser humano, pero se han observado casos sospechosos en barbados y Trinidad (3).

E. Mecanismos de transmisión

La infección humana puede ser adquirida por exposiciones ocupacionales o de recreación. La ocupación es un factor de riesgo humano muy importante ya que el contacto directo con animales infectados como lo tienen los granjeros, veterinarios, inspectores de carne, controladores de plagas de roedores, etc., pueden causarle la enfermedad ya que estos actúan como reservorios. Otra manera de infectarse es indirectamente, como les pasa a los mineros, soldados, limpiadores de tanques de agua, trabajadores en campos de arroz, banano y caña, ya que estos tienen contacto con agua contaminada (6).

Puede transmitirse a través de la piel y mucosas, sobre todo si hay escoriaciones, al ponerse en contacto con agua, tierra húmeda o vegetación contaminada con la orina de

animales infectados. A veces se ha descrito la transmisión por alimentos contaminados con la orina de roedores infectados, y en otras ocasiones por inhalación de gotas en aerosol de líquidos contaminados (2-5).

La transmisión de persona a persona es rara. Los enfermos suelen eliminar leptospiras por orina durante un mes en algunos casos este período se prolonga hasta 11 meses (2-5).

F. Hallazgos patológicos y patogénicos

Después de la penetración en membranas de mucosa intacta o piel dañada la leptospira entra a la corriente sanguínea y es rápidamente llevada a todas las partes del cuerpo, incluyendo los fluidos cerebroespinales y al ojo. La hialuronidasa y la motilidad de la leptospira, junto con la realización de túneles pueden ser mecanismos por los cuales la leptospira puede llegar a sitios normales protegidos. La infección fatal animal muestra muchos cambios sugestivos de endotoxemia, pero la endotoxina clásica puede que nunca sea demostrada en ese organismo (15,16).

Se ha asociado la virulencia a la presencia de lipasas; y si bien se han estudiado hemolisinas, en la enfermedad humana el fenómeno hemolítico es excepcional (11,12).

La ictericia, la cual ocurre en casos graves, es causada por disfunción hepatocelular, generalmente sin necrosis. El daño hepático es aparentemente subcelular, y la leptospira raramente es vista en el hígado. La anormal función renal puede ser grave, y en desproporción de los cambios histológicos encontrados (16).

El fallo renal es un resultado primario del daño tubular, y las leptospiras son comúnmente vistas en el lumen tubular (16). La principal causa de lesión tubular parece ser por hipoxemia o por una toxina efecto de la leptospirosis. Los cambios inflamatorios en el riñón pueden ser vistos en los posteriores estados de desarrollo de la lesión renal; estos pueden relacionarse por complejos inmunes circulantes y depósitos de componentes del complemento y cuerpos con densidad electrónica en el glomérulo, similares a los complejos inmunes de la glomerulonefritis (15). Resultados obtenidos en un estudio control en Brasil

mencionan la importante hipocalcemia que se presenta causada por pérdida de potasio y debe tomarse en cuenta para que en el tratamiento se reemplace tanto potasio como volumen necesario durante el tratamiento. El daño renal y hepático se ha relacionado especialmente con daño subcelular, y con la presencia de una endotoxina similar (endotoxin-like) la cual se encuentra en la pared celular de la leptospira que aún no ha sido caracterizada molecularmente; con los altos niveles presentes del factor de necrosis tumoral alfa los cuales fueron asociados con la severidad del daño renal, hepático y compromiso pulmonar, aunque el rol que juega el factor de necrosis tumoral en la patogénesis no está bien dilucidado (16). La hipovolemia y la hipotensión son causadas por pérdida de volumen intravascular como resultado de daño endotelial lo cual puede contribuir al desarrollo de fallo renal (15).

Durante la primera semana de infección, la leptospira puede ser encontrada en el líquido cefalorraquídeo, pero pueden estar ausentes los signos meníngeos. Después, cuando los anticuerpos séricos aparecen, la meningitis puede desarrollarse, pero pueden no encontrarse leptospiras en LCR (15, 17).

La leptospirosis puede persistir por meses en el humor acuoso, causando ocasionalmente uveítis crónica recurrente (15, 17).

Aunque la mialgias pueden ser excesivas, la histología efectuada tempranamente muestra cambios en el músculo que son a menudo triviales. Los cambios tempranos también incluyen vacuolas citoplásmicas en las miofibrillas. La infiltración del músculo por leucocitos polimorfonucleares es un hallazgo tardío en algunos casos (15, 17).

La diátesis hemorrágica es debido a vasculitis con daño capilar, hemólisis (los cuales es posiblemente debido a hemólisis elaborada por algunos, pero no por todos los serotipos), y miocarditis hemorrágica focal son raramente encontradas (15,17).

G. Manifestaciones clínicas

La leptospirosis subclínica ocurre comúnmente entre personas que están expuestas a animales infectados. La evidencia serológica de infección es encontrada aproximadamente

en 15% de personas que trabajaban en mataderos, casas empacadoras y veterinarias. Entre pacientes enfermos con leptospirosis, 90% pueden tener la forma anictérica de la enfermedad, y el 5-10% puede tener leptospirosis con ictericia (Síndrome de Weil) (15).

La leptospirosis puede seguir un curso bifásico (ver anexo # 2)(6). Después de un período de incubación de 7-12 días (rango extremo entre 2-20 días) (15). Aunque también se considera un tiempo de incubación más amplio el cual es entre 2 a 26 días, pero en promedio de 1 a 2 semanas, con una media de 10 días (16). La septicemia que es la fase inicial que usualmente tarda entre 4 a 7 días. Durante la fase no específica de la enfermedad, la leptospira puede ser aislada de la sangre, del líquido cefalorraquídeo, y otros tejidos. En la segunda fase de la enfermedad, conocida como la fase inmune, la cual dura entre 4-30 días. Tempranamente en este estado la leptospirosis desaparece de la sangre y líquido cefalorraquídeo pero puede encontrarse en el riñón, en la orina y el humor acuoso. Esta fase es caracterizada por la presencia de anticuerpos circulantes y desarrollo de meningitis, uveítis, rash y en casos severos con daño renal y hepático. En casos con leptospirosis ictericia, pueden algunas veces ser aisladas de la sangre por 24-48 horas después de aparecer la ictericia (15).

1. Leptospirosis anictérica

Esta común forma de leptospirosis es caracterizada por abruptos episodios de fiebre, dolor de cabeza, severos dolores musculares, malestar, decaimiento, y en raros casos, colapso circulatorio (18).

La fiebre es remitente y alta, con escalofríos, y dolor de cabeza persistente, severas mialgias, dolor abdominal, con náusea y vómitos persistentes por 4 – 7 días. La mortalidad es muy rara. En la segunda fase, o estado inmune de la leptospirosis anictérica, la fiebre usualmente no está presente o es baja, con duración de 1 a 3 días. El dolor de cabeza es característicamente intenso, persistente, frecuentemente palpitante, muy activo, y pobremente controlado con analgésicos. Este es usualmente frontal o bitemporal y puede ser asociado con dolor retrobulbar. Episodios de dolor de cabeza en la segunda fase de la

enfermedad son usualmente anuncios del inicio de una meningitis. El delirio es común, pero los cambios severos mentales como alucinaciones son raros (18).

La mialgia mas comúnmente involucra músculos de la pantorrilla, muslo, región paraespinal, abdomen y cuello, los cuales pueden ser muy severos (18).

La náusea, vómitos, y dolor abdominal ocurren en combinación en 95% de los pacientes. La hepatomegalia es poco común en leptospirosis anictérica, pero la esplenomegalia se encuentra entre 15-25% de los casos (18).

Los hallazgos físicos mas comúnmente encontrados en la segunda fase son problemas musculares, daño a nivel de conjuntivitis, adenopatía, hepatoesplenomegalia y rash. Algunos pacientes presentan taquicardia, aunque la bradicardia ocurre ocasionalmente. Las manifestaciones oculares incluyen sufusiones de la conjuntiva bulbar, fotofobia, dolor ocular y hemorragia conjuntival que son relativamente comunes y son sugestivos del diagnóstico. En un estudio realizado en enero de 1994 efectuado en Estados Unidos mencionan panuveítis (Inflamación difusa del tracto uveal del globo ocular) como una de las principales complicaciones oculares por leptospiras en humanos (18).

Pulmonarmente se pueden encontrar infiltrados, con presencia de tos, y esputo que contiene sangre, y dolor en tórax. La enfermedad pulmonar es reportada en 20 a 70% de los casos de pacientes en segunda fase (15,17).

Las manifestaciones pulmonares más severas incluyen: hemoptisis franca, hipoxemia, fallo agudo respiratorio y síndrome de dificultad respiratoria del adulto, los cuales son raros y pueden ser vistos más frecuentemente en la manifestación icterica de la leptospirosis. Otra característica es el hallazgo de lesiones pretibiales eritematosas de 1-5 cm los cuales son comunes en infecciones otoñales y son parte del síndrome llamado Fiebre Fort Bragg. El conteo de glóbulos blancos es normal o levemente elevado, pero la mayoría de los casos presentan neutrofilia. La velocidad de sedimentación raramente está elevada (15, 17).

La mayor importancia clínica observada en el estado inmune de leptospirosis anictérica es una meningitis aséptica. Aunque las leptospiras pueden ser encontradas en LCR durante el primer estado de la enfermedad, éstas desaparecen durante la segunda semana con la aparición de anticuerpos séricos. El 80 de 90% de los pacientes anictéricos pueden tener pleocitosis en LCR durante la segunda semana de enfermedad, y 50% de éstos pueden presentar signos clínicos de meningitis. La meningitis aséptica es una manifestación no específica, y al menos que el paciente presente una enfermedad bifásica distinta o refiera una exposición a animales, ésta puede ser mal diagnosticada como una meningitis viral (15, 17).

Estudios del CDC de Atlanta demostraron evidencia serológica de infección por *Leptospira* en aproximadamente 10% de casos previamente diagnosticados equivocadamente como meningitis o encefalitis. La meningitis usualmente dura únicamente unos pocos días (raramente 2 a 3 semanas) y nunca es fatal en casos anictéricos (15, 17).

El 75% de los pacientes tienen menos de 500 células por mm^3 en LCR, siendo las mononucleares predominantes, aunque estas pueden ser no encontradas al inicio de la meningitis. Las proteínas en LCR pueden ser normal, o elevada arriba de 300 mg/100 ml. La concentración de glucosa es normal. Los signos focales neurológicos y la evidencia de encefalitis no son comunes (15,17).

En un bajo porcentaje puede hallarse en LCR la concentración de glucosa baja, en general coincidiendo con una celularidad de tipo polimorfonuclear, a la que puede atribuirse la misma ya que la leptospira metaboliza los carbohidratos (11,12).

La uveítis ocurre en aproximadamente 2% de los pacientes, de inicio temprano, severo y que se presenta meses después de la enfermedad aguda, que puedan prolongarse a un proceso crónico o con curso recurrente (15).

2. Leptospirosis ictérica (Síndrome de Weil)

Esta forma severa fue originalmente descrita en infecciones que fueron por serovares icterohemorrágicos (15-17). Aunque en otro estudio se refiere que la ictericia no debe

asociarse a un serovar en particular como icterohemorrágico, ya que también se han involucrado otros serovares como *canicola*, *gripotyphosa*, *pomona*, en casos especialmente estudiados en Argentina (11,12). Este se caracteriza por afectación de riñones y de la función hepática, como hemorragias, colapso vascular, alteraciones severas de la conciencia, y una alta mortalidad. La ictericia usualmente no se asocia a necrosis hepatocelular y después de la recuperación, no hay hallazgos de disfunción hepática. La muerte es muy rara en la enfermedad de Weil cuando se presenta únicamente disfunción hepática (15,17,19). La tos y el dolor torácico figuran en reportes de pacientes de China y Corea (16). Mas de un cuarto de pacientes se presentan con neumonía. La hemorragia pulmonar merece una especial atención: en un largo reconocimiento en el lejano este en el que 40 pacientes murieron con hemorragia pulmonar insuficiencia respiratoria durante un brote de leptospirosis en Nicaragua en 1995. La hemoptisis fue común y las radiografías de tórax mostraron infiltrados pequeños difusos bilaterales desiguales. La necropsias mostró hemorragias intraalveolares masivas con o sin daño difuso alveolar. Se observó la presencia de *Leptospira* en los tejidos pulmonares (20-22).

El compromiso pulmonar en leptospirosis frecuentemente se manifiesta por síntomas respiratorios, pero la neumonía comúnmente no es una manifestación clínica frecuente, ni fulminante; se reporta un caso de neumonía fulminante por leptospirosis en el cual las manifestaciones pulmonares fueron las características clínicas primarias de la enfermedad (23,24).

Los niveles de bilirrubina sérica (directa) es usualmente debajo de 20 mg/100 ml. Los niveles de fosfatasa alcalina son moderadamente elevados la transaminasa glutámica oxaloacética (TGO) sérica y la transaminasa glutámica pirúvica sérica (TGP) raramente exceden a 100-200 unidades (15,17). Se refiere que la colestásis hepática explica los hallazgos de laboratorio: escaso o nulo aumento de transaminasas y fosfatasa alcalina y aumento de la bilirrubina total a expensas de la directa (11,12). La combinación de la elevación de marcadores séricos de CK con leve elevación de las transaminasas en pacientes con ictericia pueden ser de ayuda en la diferenciación de la leptospirosis de otras formas de hepatitis aguda. La hepatomegalia ocurre en aproximadamente 25% de los casos.

Una rara complicación de la infección otoñal severa es la colecistitis aguda, la cual requiere cirugía (15,17).

Los pacientes con ictericia severa, son los que mayormente se relacionan con presentaciones de fallo renal, hemorragias y colapso cardiovascular (15), aunque en estudios realizados en Argentina mencionan que la intensidad de la ictericia no guarda relación directa con la gravedad del caso (11,12). La severidad de los componentes del Síndrome de Weil probablemente refleja la severidad de la vasculitis. El análisis de orina es frecuentemente anormal durante la fase leptospirémica, con proteinuria y hematuria. La azotemia usualmente aparece durante la segunda semana. El nitrógeno de urea (BUN), sus niveles raramente exceden a 100 mg/ 100 ml, y la creatinina sérica a 8 mg/ 100 ml. El descenso abrupto del flujo sanguíneo renal resulta en necrosis tubular franca, pero en algunos casos la función renal es eventualmente restaurada a lo normal. La trombocitopenia es acompañada por otras manifestaciones de CID (Coagulación intravascular diseminada), que ocurre en un 50% de pacientes con leptospirosis con presencia de fallo renal (11,12,15).

En leptospirosis graves la miocarditis y/o pericarditis son causadas por la vasculitis o bien responden a los trastornos metabólicos propios de estas formas clínicas. La arteritis coronaria aguda es un hallazgo relativamente frecuente en las necropsias de formas graves. Leptospirosis puede ser causa de interrupción del embarazo, hecho frecuente en animales, no así en el hombre (11,12).

Las anomalías electrocardiográficas son comunes durante la fase leptospirémica, y en casos severos donde se presenta insuficiencia cardíaca en el que puede presentarse shock cardiogénico. En un estudio de 26 casos fatales en la autopsia fue encontrada miocarditis hemorrágica en 50% de estos (15).

En un estudio realizado en 1994 en Grecia mencionan que hubo un caso de hombres que presentaron hipogonadismo después de padecer síndrome de Weil. El hipogonadismo fue el resultado de una deficiencia pituitario-hipotalámica, donde mencionan que existen

mecanismos por los que la leptospira puede causar daños a la pituitaria y/o el hipotálamo (25).

H. Diagnóstico

Los casos atípicos y leves son frecuentemente confundidos con otras patologías, como con meningitis, fiebre de origen desconocido, influenza, apendicitis y gastroenteritis (16).

La leptospirosis se incluye en los diagnósticos diferenciales en el diagnóstico de pacientes con ictericia en el trópico. La hepatitis viral es un común diagnóstico que se hace frecuentemente en pacientes con la enfermedad de Weil. La malaria, la fiebre tifoidea, tifus y la infección por virus de Hantaan son diagnósticos diferenciales importantes para considerar en el trópico. La leptospirosis con manifestaciones hemorrágicas es fácilmente mal diagnosticada en confusión con dengue que fue el primer diagnóstico considerado en el brote de Nicaragua (20,21).

El diagnóstico definitivo de leptospirosis depende de los hallazgos de laboratorio. Los criterios para definir el diagnóstico dependen del aislamiento del organismo o seroconversión al encontrarse títulos elevados de anticuerpos en presencia de enfermedad clínica compatible. El diagnóstico presuntivo de leptospirosis puede ser basado en hallazgos que muestren aglutinación microscópica en títulos de 1:100 o un test específico de aglutinación positiva en presencia de una enfermedad clínica compatible (15).

El aislamiento de leptospiras de los fluidos corporales o en órganos requieren técnicas de laboratorio especiales, las cuales no son dificultosas. El organismo puede ser aislado de los fluidos del cuerpo o LCR únicamente durante los primeros diez días de la enfermedad. Estos usualmente aparecen en orina durante la segunda semana, con biopsia de varios tejidos, el organismo también puede ser aislado (15).

Los medios comúnmente usados para el aislamiento de *Leptospira* son, medio Fletcher (semisólido), Khorthof (líquido) y albúmina bovina-Tween 80 (líquido o sólido). Se

agrega de una a tres gotas del espécimen a 5 ml de medio de cultivo. Los cultivos son incubados por 5 a 6 semanas entre 28 y 30 grados centígrados en la obscuridad. En un medio semisólido la *Leptospira* crece en un anillo concentrado de 0.5 a 1 cm debajo de la superficie del medio, usualmente aparece entre 6 a 14 días después de la inoculación. El tipo del material de cultivo depende de la fase de la enfermedad. Las leptospiras permanecen viables en sangre anticoagulada por mas de 11 días, y la utilidad radica por si necesita ser enviado a otros laboratorios de referencia para efectuar cultivos. No se debe de utilizar citrato como anticoagulante ya que es tóxico para la *Leptospira*. La adición de un agente antibacterial como neomicina, vancomicina, bacitracina, sulfonamidas, cicloheximida para el medio de cultivo, o para inoculación intraperitoneal dentro de hamsters, algunas veces facilita el aislamiento de leptospiras de la orina o de otro espécimen contaminado (15,16).

Las leptospiras pueden observarse por realización de campo oscuro, pero requiere de expertos para diferenciación de filamentos de fibrina, y de otros materiales extraños. Otra prueba utilizada es usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como también técnicas a base de impregnación con plata y pruebas serológicas (15).

La mayoría de los casos de leptospirosis son diagnosticados por serología. Los anticuerpos son detectables en sangre aproximadamente de 5 a 7 días después de la aparición de los síntomas. Los métodos serológicos se dividen en dos grupos: los que son género específicos y los serogrupo específico. El uso del test de aglutinación fue descrito prontamente después del primer aislamiento del organismo (6).

1. Microaglutinación (MAT)

El método de referencia para el diagnóstico de leptospirosis es el MAT (microaglutinación) en el cual el suero del paciente reacciona con una suspensión de antígenos vivos de serovares leptospíricos. El MAT es un test muy complejo de controlar, ejecutar e interpretar. Se deben mantener cultivos vivos de todos los serovares que se requieren para la realización del test. Los subcultivos repetitivos semanalmente de un gran

número de cepas presentan riesgo para los trabajadores del laboratorio. Otra desventaja que presenta éste método es el riesgo de contaminación cruzada de los cultivos de los antígenos, necesitando verificaciones periódicas de cada serovar (6).

El rango de antígenos usados deberían incluir serovares que representen todos los serogrupos y todos los serovares más comunes del lugar. Los títulos de anticuerpos de aislamientos locales son más altos que los títulos de cepas stock del laboratorio de serovares dentro del mismo serogrupo. Es usual incluir uno de los serovares de la especie no patógena *L. biflexa*. Se usa un rango grande de antígenos para detectar infecciones con serovares poco comunes o previamente no detectados (6).

El MAT es leído en microscopio de campo oscuro. El punto final es la dilución más alta del suero donde el 50% de la aglutinación ocurre. Debido a la dificultad de detectar que el 50% de la leptospiras están aglutinados, el punto final es determinado por la presencia de aproximadamente el 50% libre de leptospiras no aglutinados comparados con una suspensión control (6).

La interpretación del MAT es complicado por la alta relación de reacciones cruzadas que ocurren entre los diferentes serogrupos, especialmente en muestras recolectadas durante la fase aguda. Se presenta una reacción "paradójica" en la cual los altos títulos son detectados a un serogrupo que no está relacionado al que está infectando (ver anexo # 3). Las reacciones cruzadas en la fase aguda, seguido por un serogrupo específico en las muestras durante la fase convaleciente, resulta de la detección por MAT de anticuerpos IgM e IgG y la presencia de diferentes antígenos comunes de leptospiras. Se requieren de sueros pareados para confirmar el diagnóstico con certeza (6).

Según el CDC, un título mayor o igual a 200 se define como un probable caso con enfermedad clínicamente compatible. Aunque esto podría ser apropiado en una población donde la exposición a la leptospirosis no es común, un punto de corte más alto de los títulos es necesario para definir casos probables de leptospirosis en la mayoría de países tropicales. En áreas donde la leptospirosis es endémica, un simple título de mayor o igual a

800 en pacientes sintomáticos es generalmente indicativo de leptospirosis, pero títulos tan altos como mayor o igual a 1600 han sido recomendados para confirmar (6).

Debido a la complejidad del MAT, métodos rápidos de tamizaje para anticuerpos leptospirales en infecciones agudas han sido desarrollados (ver anexo # 4). El método de Fijación del Complemento (FC) se ha usado ampliamente, pero es un métodos que no está estandarizado. Este método es utilizado en diagnóstico veterinario. El FC ha sido reemplazado por métodos de ELISA. Anticuerpos IgM son detectados durante la primera semana de enfermedad, esto permite que la confirmación del diagnóstico y el tratamiento sea más efectivo. La detección de IgM ha presentado más sensibilidad que el MAT cuando el primer espécimen es tomado tempranamente en la fase aguda de la enfermedad (6).

2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

El método de ELISA se basa en que un antígeno de *Leptospira interrogans* variedad *grippotyphosa* en un pozo se incuba con el suero del paciente o con el suero control, cualquier anticuerpo se une al antígeno. El material que no esta unido es removido por medio de lavados. Después se le agrega el conjugado que es una enzima (fosfatasa alcalina), ligada a anticuerpos anti IgG, IgM o IgA. Esto permite que la enzima conjugada se una a cualquier anticuerpo de IgM o IgG que se halla unido previamente al antígeno leptospiral (26). Esta enzima actúa sobre un sustrato dando una reacción de color que se mide espectrofotométricamente (6).

Anticuerpos IgM han sido detectados por ELISA en líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva de pacientes con leptospirosis icterica. En pacientes con meningitis sin probable etiología, se ha detectado IgM en el 15% de los casos (6).

Se han aplicado un número de modificaciones en métodos de ELISA. Fue desarrollado dot-ELISA específico para IgM en el cual antígenos polivalentes leptospirales fueron impregnados en filtros de disco de nitrocelulosa en microtítulos, permitiendo el uso de volúmenes más pequeños de reactivos. Otras modificaciones han sido utilizadas para

detectar IgG e IgA en adición a IgM y han sido empleado un antígeno inmunodominante y una resina de poliéster como soporte en lugar de nitrocelulosa (6).

Un test de dot-ELISA IgM en tira comercial a mostrado ser tan sensible como el IgM-ELISA de microtítulos en placas (6).

Otro método utilizado ha sido la aglutinación macroscópica en placa en la cual 12 serovares fueron combinados dentro de 4 pools para un tamizaje rápido en sueros de humanos y animales. A pesar del uso de un antígeno de un rango amplio, resultados falsos negativos han sido reportados para sueros de población de áreas endémicas de leptospirosis. Diversas modificaciones de este método han usado un simple antígeno serovar, usualmente *patoc*. Algunos estudios han reportado que el uso de éste es muy insensible, pero un reciente ensayo comercial de aglutinación macroscópica ha demostrado ser más sensible y específico como un IgM-ELISA o MAT incluso con un tiempo de reacción más corto (6).

Se han descrito una serie de métodos que utilizan glóbulos rojos sensibilizados. La extracción de eritrocitos sensibilizados ha permitido el desarrollo de métodos como de ensayos hemolíticos requiriendo complemento y ensayos de hemaglutinación. Estos ensayos detectan anticuerpos IgM e IgG. Estudios desarrollados en el CDC han indicado que la hemaglutinación indirecta (IHA) tiene una sensibilidad de 92% y una especificidad del 95% comparado con el MAT (6).

Estimados de estudios recientes sobre la sensibilidad del IHA en poblaciones endémicas de leptospirosis ha variado. En un estudio, donde se utiliza IHA en pacientes con leptospirosis fue positivo en un 44% en muestras tomadas durante la fase aguda de la enfermedad durante los cinco días de la aparición de los síntomas. Otros estudios han reportado una sensibilidad más baja (6).

Otras técnicas aplicadas para la detección de anticuerpos incluyen inmunofluorescencia (IFA), RIA, inmunoelectroforesis (6).

Se realizó un estudio en Japón en agosto 1995 efectuado en 67 pacientes de los que 57 se encontraban en fase aguda de la enfermedad, y los 10 restantes durante la convalecencia, en el que utilizando el método de ELISA se estudio el comportamiento de IgM, IgG e IgA. Se menciona que la detección de IgM ocurrió tempranamente (entre el segundo y tercer día de los síntomas). La IgG no fue desarrollada por todos los pacientes, llama la atención que los casos negativos para IgG fueron positivos para el serogrupo *icterohaemorrhagiae* por MAT, sugiriendo que la IgG debe jugar un papel importante en las repercusiones de la enfermedad y que debe ser estudiado a fondo el rol de esta. La IgA juega un papel desconocido, pero es la que permite junto con IgM realizar el diagnóstico durante la fase aguda y sola o con IgG para un diagnóstico en la convalecencia (27,28).

El método de aglutinación en látex (aglutinación indirecta) se basa en que un antígeno leptospírico esta unido a las partículas de látex y los anticuerpos del suero del paciente se unen a los antígenos y causan una aglutinación visible (29).

Se realizó un estudio por Smits y colaboradores en el Royal Tropical Institute en Holanda (aceptado por la ASM en 1999), en el cual se evaluó la eficiencia del método de aglutinación en látex comparándolo con el método estándar MAT, tira de inmersión para IgM y ELISA. Los sueros fueron tomados de 800 pacientes confirmados por el laboratorio de control de leptospirosis de Holanda así como muestras seriadas de pacientes con sospecha de leptospirosis, por sus características clínicas colectadas en cuatro diferentes países. La sensibilidad total fue de 82.3% y una especificidad de 94.6% para el método de aglutinación en látex. El 17.7% de los pacientes con leptospirosis de estos 4 grupos de pacientes fue negativo para el método de aglutinación en látex. El 95.8% de las muestras de los pacientes que fueron positivas para el método de aglutinación en látex fueron positivas para IgM ELISA. La sensibilidad para el método de ELISA fue 85.5%, una especificidad del 97.9%, un valor predictivo positivo del 87.6% y un valor predictivo negativo de 97.4%. Los resultados de este estudio demuestra la alta sensibilidad del método de aglutinación en látex para la detección de infecciones de cepas de los serogrupos *australis*, *autumnalis*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *sejroe*. Este método es fácil de realizar y no requiere de

habilidad especial o equipo. La vida media de los reactivos es prolongada a temperaturas tropicales. Estos factores hacen que el ensayo sea cómodo para su uso como una prueba de tamizaje (30).

Otro estudio se llevó a cabo por Levett y colaboradores, en el cual se evaluó y comparó la sensibilidad y especificidad de los métodos de tira de inmersión para IgM y hemaglutinación indirecta (IHA) con los métodos estándares, MAT y ELISA. Se examinaron 104 sueros de pacientes admitidos en el hospital Queen Elizabeth, Bridgetown, Barbados quienes tenían historia de manifestaciones clínicas de leptospirosis. Las muestras fueron tomadas del 1 al 4 día después del ingreso de los pacientes al hospital. Anticuerpos IgM e IgG fueron detectados utilizando los métodos de ELISA, MAT, tira de inmersión. A 51 pacientes se les encontró que tenían leptospirosis. La sensibilidad de la tira de inmersión para IgM fue del 98%, con una especificidad del 90.6%. El valor predictivo positivo fue de 90.9% y el valor predictivo negativo fue de 98%. La sensibilidad de la IHA fue del 92.2%, la especificidad del 94.4%, el valor predictivo positivo fue de 95.9% y el valor predictivo negativo de 92.7%. Para los métodos ELISA y MAT fueron positivos en las primeras muestras analizadas de 67 y 55% de los casos, respectivamente, y para la prueba rápida de tira y IHA fueron positivos en 71 y 49%, respectivamente, en las primeras muestras analizadas. Ambos métodos son altamente sensibles y específicos. Tampoco se requiere de equipo especializado, y ambos son adecuados para el uso de diagnóstico en el laboratorio (31).

La presencia de leptospirosis ha sido demostrada por PCR en pacientes con la enfermedad en estadio temprano, es decir, antes del desarrollo de anticuerpos, así como de pacientes que fueron seronegativos y de autopsias (6).

I. Tratamiento

El tratamiento de la leptospirosis difiere ya que depende de la severidad y duración de síntomas en el tiempo en que se presentan. Pacientes con síntomas leves requieren solamente tratamiento sintomático pero debería tenerse cuidado para solicitar posteriormente ayuda médica si ellos desarrollan ictericia. Para pacientes que se presentan

con más de una leptospirosis anictérica requiere que se ingresen a un hospital bajo observación. Si el dolor de cabeza es particularmente severo, una punción lumbar produce un mejoramiento significativo (6).

El manejo de una leptospirosis icterica requiere la admisión del paciente a cuidados intensivos. Pacientes con azotemia prerenal pueden ser rehidratados inicialmente mientras su función renal es observada, pero pacientes con fallo renal agudo requiere diálisis con motivo de urgencia. Esta es aliviada satisfactoriamente con diálisis peritoneal. Un monitoreo cardíaco también es deseable durante los primeros días después de su admisión (6).

El tratamiento antibiótico específico utilizado es la penicilina, oxitetraciclina. Existe una mayor dificultad del tratamiento con antibiótico cuando los pacientes se presentan muy tarde, con una enfermedad severa, y cuando las leptospiras se encuentran en los tejidos (6).

La doxiciclina (100 mg dos veces al día por 7 días) ha mostrado reducir la duración y severidad del malestar en pacientes con leptospirosis anictérica severa en un par de días (6).

Un estudio que se realizó en barbados incluyó 42 pacientes con leptospirosis severa, de los cuales 19 estaban ictericos; ningún paciente requirió diálisis y no hubo muertos. La dosis de penicilina intravenosa que se les dio fue de 6 MU/ al día por 7 días y se encontró que la fiebre les duró la mitad del tiempo que esta duraba (32).

Otro estudio en Barbados incluyó 79 pacientes con leptospirosis icterica, de los cuales 4 murieron. El grupo de pacientes tratados recibieron una dosis de 8 MU/ al día por 5 días de penicilina. No se observó ninguna diferencia entre el grupo tratado como el control en el resultado o duración de la enfermedad (32).

Un descubrimiento consistente de los dos estudios anteriores ha sido la prevención de leptospiruria o una reducción significativa en su duración. Estos descubrimientos justifican

el uso de antibióticos, pero cualquier tratamiento con antibiótico debería iniciado lo más tempranamente posible y no debería de remplazarse otras medidas terapéuticas (32).

La doxiciclina (200 mg oralmente, una vez semanalmente) ha mostrado ser efectiva como profiláctica en poblaciones de alto riesgo. Se reduce la incidencia de la enfermedad clínica pero no la evidencia serológica de la infección (33).

J. Inmunización

La inmunidad hacia la leptospirosis es mayormente humoral y esta relacionado a un serovar específico. De este modo, la inmunización ataca la causa de la enfermedad por un serovar homólogo o serovares antigénicamente similares. Las vacunas deberían contener serovares representativos presentes en la población que va a ser inmunizada. Anteriormente las vacunas estaban compuestas de una suspensión de leptospiras muertas cultivadas en sueros en un medio que contenía suero, y los efectos adversos eran comunes. Las vacunas modernas son preparadas por medios de proteínas libres y generalmente no produce efectos adversos (6).

Las vacunas humanas no han sido aplicadas en los países occidentales. La inmunización con vacunas polivalentes ha sido practicada en el lejano oriente, donde un gran número de casos ocurren en trabajadores de campos de arroz, tal como China y Japón. En Francia, una vacuna monovalente con serovar *icterohaemorrhagiae* tiene la licencia para el uso en humanos. Otra vacuna con serovar *canicola*, *icterohaemorrhagiae* y *pomona* han sido desarrolladas recientemente en Cuba (6).

La prevención en humanos es muy difícil, ya que implicaría la eliminación de animales que sirven como reservorios entre ellos las mascotas. Aunque exista vacunación de animales domésticos como los perros, éstos pueden padecer de infección renal y transmitir la enfermedad. El control específico de ratas, la desinfección de áreas contaminadas de trabajo, y la prohibición del uso de agua contaminada en lugares para nadar han reducido considerablemente la incidencia de la enfermedad (15).

IV. JUSTIFICACIÓN

La característica social y económica de Guatemala es un factor determinante en la presencia de leptospirosis en la población. En la mayoría de los hospitales nacionales no se conoce sobre ésta patología y es confundida con, hepatitis, citomegalovirus y mononucleosis infecciosa entre otras, por lo tanto es importante conocer y dar un diagnóstico certero de la misma.

A partir de 1998 a raíz de los daños causados por el huracán Mitch, el Laboratorio Nacional de Salud en Guatemala ha confirmado serológicamente 22 casos hasta el año 2002 de 344 analizados. La trayectoria del análisis de casos de leptospirosis básicamente es reciente y se necesita hacer estudios en los cuales se tomen en cuenta las poblaciones de riesgo.

Algunos laboratorios recurren a la técnica de campo obscuro, debido a que ésta técnica es poco específica, es muy difícil dar un diagnóstico certero. Se sabe que los métodos serológicos como la aglutinación en látex y ELISA son métodos sensibles y específicos, y el hecho de hacer un estudio de comparación de estos métodos con el campo obscuro permiten tener un patrón del número de casos detectados y confirmados.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar 3 diferentes métodos para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes que asisten a la emergencia del Hospital San Juan de Dios.

Objetivos específicos

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos de campo oscuro y aglutinación en látex comparados con el método de ELISA.
2. Establecer los diferentes factores asociados que podrían contribuir a la aparición de leptospirosis.
3. Determinar la frecuencia de leptospirosis que existe en la emergencia del Hospital General San Juan de Dios.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Universo

Pacientes que asisten a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios.

1. Muestra

Se estudiaron 90 pacientes que se presentaron a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios con manifestaciones clínicas de leptospirosis los cuales fueron detectados por los médicos del servicio.

B. Recursos

1. Humanos

Investigador: Br. Jorge Antonio Orantes Peñate

Asesora: Licda. Denny Guarán

Coasesora: Licda. Blanca Samayoa

Personal técnico del Hospital General San Juan de Dios

Personal médico de la emergencia del Hospital General San Juan de Dios.

2. Institucionales

Hospital General San Juan de Dios, Sanatorio Nuestra Señora del Pilar, Hospital de enfermedades (IGSS), Laboratorio Nacional de Salud, Ultralab, ROCHE, ABBOTT.

3. Equipo

Microscopio de campo obscuro

Microscopio de luz

Centrífuga

Pipetas semiautomáticas

Equipo Sistema AXSYM (ABBOTT)®

Equipo Cobas-core II (Roche)®

Lector ELISA Sigma® (Labtronic)

Equipo automático para bioquímica, Hitachi 717 (Roche)®

Cell-dyn 3500 (ABBOTT)®

Refrigeradora (2 a 8 C)

Freezer (-20 C)

4. Reactivos

Colorante de Wright

Aglutinación en látex :

Kit comercial Lepto Tek Dri-Dot , IgG e IgM. BIOMERIEUX. The Netherlands

ELISA:

Kit comercial AMIZYME LEPTOSPIRA, IgG. AMICO LABORATORIES, INC.

U.S.A

Kit comercial AMIZYME LEPTOSPIRA, IgM. AMICO LABORATORIES, INC.

U.S.A

Reactivos para Química Sanguínea (ROCHE)® : ALAT, ASAT, BBSS, FTA.
BUN, Creatinina, Acido Urico, Glucosa, GGT.

Reactivos para detección anticuerpos IgM: Hepatitis A (ROCHE)®, Hepatitis B (ABBOTT)®, Hepatitis C (ROCHE)®, Mononucleosis Infecciosa (HUMAN)®, Dengue (MACELISA) y citomegalovirus (ABBOTT)®.

Hipoclorito de sodio al 5%

Alcohol al 70%

5. Materiales

Puntas plásticas para pipetas semiautomáticas
Tubos de ensayo con y sin anticoagulante
Guantes descartables
Láminas portaobjetos
Láminas cubreobjetos
Jeringas
Cubetas para sueros
Hielera
Baterías para hielera
Guantes
Papel absorbente
Recipientes para el descarte de coágulos, suero y sangre.
Recipientes para el descarte de agujas y jeringas.
Algodón

C. Métodos

Detección de anticuerpos IgG e IgM por los métodos de aglutinación en látex y ELISA.

Observación de espiroquetas en microscopio de campo oscuro.

1. Campo Oscuro (ver anexo 5):

- a. Se centrifugó la muestra 3 minutos a 2500 rpm (sangre con heparina o EDTA).
- b. Se tomó de la capa de blancos una gota de plasma, evitando tomar glóbulos rojos.
- c. Se colocó la gota de plasma sobre un portaobjetos.
- d. Se colocó el cubre objeto.
- e. Se observó al microscopio de campo oscuro.

2. Método de Aglutinación en Látex (ver anexo 6) :

- a. Se colocó la tarjeta Dri-Dot con la cara hacia arriba donde se observe el círculo de aplicación.
- b. Se agregó 10 ul de la muestra (suero) dentro del círculo.
- c. Se esparció de forma circular con espátula la muestra durante unos segundos, evitando salir del círculo.
- d. Se rotó lentamente la tarjeta, tratando de mantenerla horizontalmente.
- e. Se leyeron los resultados dentro de 30 segundos después de haber mezclado la muestra.

3. Método de ELISA para IgG e IgM (ver anexo 7):

- a. Se reconstituyó el buffer con 600 ml de agua destilada.
- b. Se mantuvo todos los reactivos a temperatura ambiente.
- c. Se preparó una dilución de 1:50 para las muestras y los controles, mezclando 5 ul de estos con 245 ul de PBS.
- d. Se agregó 100 ul de las muestras y los controles a los pozos correspondientes de la placa.
- e. Se incubó la placa a temperatura ambiente (20-30 C) por 25 minutos.
- f. Se removió el contenido de los pozos y realizar tres lavados con PBS, invirtiendo la placa en papel absorbente y golpeándolo 3 veces .
- g. Se agregó 100 ul del conjugado anti-human IgM o IgG a cada pozo.
- h. Se Incubó a temperatura ambiente por 25 minutos.
- i. Se removió el contenido de los pozos y realizar tres lavados con PBS, invirtiendo la placa en papel absorbente y golpeándolo 3 veces.
- j. Se agregó 100 ul de TMB a cada pozo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- k. Se agregó 50 ul (una gota) de solución de parada a cada pozo.
- l. Se leyó la placa a 450 nm con blanco de aire antes de una hora con lector de ELISA.

Nota: * Para la determinación de IgG no se realizó el inciso " c ".



* En dos de los tres procedimientos de ELISA que se realizaron el inciso " i " se hizo con lavador automático, por lo tanto no fue necesario golpear la placa sobre papel absorbente.

D. Diseño de la investigación

1. Tipo de muestreo

No probabilístico

Se seleccionó la muestra según los criterios del estudio.

Por conveniencia

Se seleccionaron 90 pacientes con manifestaciones clínicas característica de leptospirosis.

2. Tipo de estudio

Descriptivo, transversal.

E. Diseño estadístico

Se compararon dos métodos (aglutinación en látex y campo oscuro) con un método estándar (ELISA). Se midió la eficacia de cada método por medio de su sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo por medio de tablas de Ji^2 , además se establecieron los diferentes factores de riesgo, para lo cual se les pasó una ficha epidemiológica a los pacientes en estudio (ver anexo 8) y una hoja de consentimiento (ver anexo # 9), posteriormente éstos se analizaron por medio de un programa estadístico EPI-Info. A cada paciente se le realizó un diagnóstico diferencial, utilizando pruebas de laboratorio, hematología, bioquímicas y serológicas (ver anexo # 10). Se determinó la incidencia de leptospirosis en los 90 pacientes.

	METODO ESTANDAR	
METODO EN ESTUDIO	A	B
	C	D

Fórmulas: Sensibilidad: $a / a+c$ Valor predictivo positivo: $a / a+b$
 Especificidad: $d / b+d$ Prevalencia: $a+c / a+b+c+d$
 Valor predictivo negativo: $d / c+d$

VII. RESULTADOS

De la población estudiada, 72 pacientes (80%) eran mayores de 50 años y 55 (61.11%) de éstos padecieron de leptospirosis. La mayor proporción de pacientes con leptospirosis fueron hombres 53.3%. La tabla No. 1 muestra que las características demográficas de los pacientes no tienen ninguna relación con el padecimiento de leptospirosis ya que los valores de P son mayores a 0.05.

Tabla No.1. Características demográficas de la población estudiada (N = 90)

Característica	Total (%)	Leptospira +	Leptospira -	OR	IC	Valor P
Género						
Masculino	48 (53.3%)	34 (37.75 %)	14 (15.54%)	0.66	(0.23 - 1.92)	0.4
Femenino	42 (56.7%)	33 (44.55 %)	9 (12.15 %)			
Edad						
Menor de 50	18 (20%)	11 (12.22 %)	7 (7.78%)	0.49	(0.14 - 1.66)	0.19
Mayor de 50	72 (80 %)	55 (61.11 %)	17 (18.89 %)			
Procedencia						
Capital	66 (73.3%)	47 (52.20 %)	19 (21.10 %)	0.65	(0.18 - 2.22)	0.45
Otros	24 (26.7%)	19 (21.14 %)	5 (5.56 %)			
Ocupación						
Ama de casa-Estudiante	34 (37.8 %)	29 (32.24 %)	5 (5.56 %)	3.87	(0.62 -25.07)	0.08
Agricultor	10 (11.1 %)	6 (6.66 %)	4 (4.44 %)			

OR = Odds Ratio IC = Intervalo de Confianza Valor P = Probabilidad ($\alpha = 0.05$)

En la tabla No. 2 se indican los diferentes factores que predisponen a padecer de leptospirosis. De 51 pacientes (56.70%) que tenían la mayoría de servicios básicos, 36 padecían de leptospirosis. Fue importante conocer si los pacientes vivían cerca de algún basurero público, 51 de ellos (56.70%) afirmaron que sí y 37 de éstos padecían de leptospirosis.

La evaluación del padecimiento de enfermedades como dengue, malaria, y hepatitis es necesario por el compromiso hepático y renal que pudo haber existido en el paciente, esto predispone al paciente a padecer de leptospirosis icterica independientemente del serovar

que infecte. El 16.70% de los 90 pacientes padecieron de dengue, de los cuales 12 padecieron de leptospirosis. Mientras que 13 pacientes de 19 que tuvieron paludismo también padecieron de esta enfermedad.

Tabla No. 2. Factores Predisponentes para el padecimiento de Leptospirosis de la población estudiada (N = 90)

Característica	Total (%)	Leptospira +	Leptospira -	OR	IC	Valor P
Siembra						
Sí	10 (11.10 %)	6 (6.66 %)	4 (4.44 %)	0.50	(0.11 - 2.38)	0.31
No	80 (88.90 %)	60 (66.68 %)	20 (22.22 %)			
Productos de siembra						
Maíz/ Frijol	4 (4.40 %)	3 (3.30 %)	1 (1.10 %)	3.00	(0.11 - 139.06)	0.45
Otros	6 (6.60 %)	3 (3.30 %)	3 (3.30 %)			
Servicios Básicos						
Agua potable /Luz eléctrica /Drenajes /Inodoro /Recolección/ Basura	51 (56.70 %)	36 (40.02 %)	15 (16.68 %)	0.72	(0.25 - 2.07)	0.50
Otros	39 (43.30 %)	30 (33.31 %)	9 (9.99 %)			
Agua para beber						
Chorro	48 (53.30 %)	34(37.75 %)	14 (15.55 %)	0.86	(0.31 - 2.40)	0.75
Otros	42 (46.70 %)	31(34.47 %)	11(12.23 %)			
Basurero público						
Sí	51 (56.70 %)	37 (41.14 %)	14 (15.56 %)	1.04	(0.37 - 2.90)	0.94
No	39 (43.30 %)	28 (31.09 %)	11 (12.21 %)			
Distancia basurero público						
1 a 500 mts	38 (42.30 %)	26 (28.94 %)	12 (13.36 %)	0.39	(0.05 - 2.39)	0.26
Arriba de 500 mts	13 (14.40 %)	11 (12.18 %)	2 (2.22 %)			
Poza cerca del cultivo						
Sí	6 (6.70 %)	4 (4.47)	2 (2.23 %)	0.71	(0.10 - 6.05)	0.70
No	84 (93.30 %)	62 (68.86 %)	22 (24.44 %)			
Inundaciones donde trabaja						
Sí	1 (1.10 %)	1(1.10 %)	0 (0.00 %)	indefinido	indefinido	0.55
No	89 (98.90 %)	65 (72.23 %)	24 (26.67 %)			
Inundaciones donde vive						
Sí	8 (8.90 %)	4 (4.45 %)	4 (4.45 %)	0.32	(0.06 - 1.73)	0.12
No	82 (91.10 %)	62 (68.88 %)	20 (22.22 %)			

OR = Odds Ratio

IC = Intervalo de Confianza

Valor P = Probabilidad ($\alpha = 0.05$)

No existe ninguna relación entre los factores predisponentes y el padecimiento de la enfermedad ya que el valor de P es mayor a 0.05.

Tabla No. 2. Factores Predisponentes para el padecimiento de Leptospirosis de la población estudiada (N = 90) (continuación)

Característica	Total %	Leptospira +	Leptospira -	OR	IC	Valor P
Trabaja con animales						
Sí	24 (26.70 %)	19 (21.14 %)	5 (5.56 %)	1.54	(0.45 - 5.50)	0.45
No	66 (73.30 %)	47 (52.20 %)	19 (21.10 %)			
Tipo de animales						
Aves	13 (14.40 %)	9 (9.97 %)	4(4.43 %)	0.22	(0.01 - 3.01)	0.20
Otros	11 (12.10 %)	10 (11.00 %)	1(1.10 %)			
Posee Mascotas						
Sí	68 (75.60 %)	50 (55.59 %)	18 (20.25 %)	1.04	(0.31 - 3.44)	0.94
No	22 (24.40 %)	16 (17.74 %)	6 (6.65 %)			
Tipo de Mascotas						
Perro	32 (35.60 %)	23 (25.58 %)	9 (10.01 %)	0.85	(0.25 - 2.85)	0.77
Otros	36 (40.00 %)	27 (30.00 %)	9 (10.00 %)			
Enfermedad del hígado pasada						
Sí	11 (12.20 %)	9 (9.98 %)	2 (2.22 %)	1.74	(0.31 - 12.69)	0.50
No	79 (87.80 %)	57 (63.35 %)	22 (24.45 %)			
Tipo de enfermedad						
Hepatitis A	8 (8.90 %)	7 (7.79 %)	1 (1.11 %)	3.50	(0.00 - 261.59)	0.45
Otros	3 (3.30 %)	2 (2.22 %)	1 (1.11 %)			
Ictericia pasada						
Sí	11 (12.20 %)	8 (8.87 %)	3 (3.33 %)	0.97	(0.20 - 5.11)	0.96
No	79 (87.80 %)	58 (64.46 %)	21 (23.34 %)			
Medicamento que cause ictericia						
Sí	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	no aplica	no aplica	no aplica
No	90 (100.00 %)	66 (73.33 %)	24 (26.67 %)			
Ha padecido de dengue						
Sí	15 (16.70 %)	12 (13.36 %)	3 (3.34 %)	1.56	(0.35 - 7.76)	0.52
No	75 (83.30 %)	54 (59.98 %)	21 (23.32 %)			
Ha padecido de paludismo						
Sí	19 (21.10 %)	13 (14.44 %)	6 (6.66 %)	0.74	(0.22 - 2.56)	0.59
No	71 (78.90 %)	53 (58.90 %)	18 (20.00 %)			

OR = Odds Ratio IC = Intervalo de Confianza Valor P = Probabilidad ($\alpha = 0.05$)

Debido a la diversidad de síntomas del paciente en el padecimiento de leptospirosis, es importante evaluar que relación tienen estos con la misma, ya que esto puede ser un punto de diferenciación entre un síndrome de Weil (Leptospirosis Ictérica) y una leptospirosis anictérica. La tabla No. 3 muestra que la única característica clínica que tuvo relación con el padecimiento de la enfermedad fue la ictericia presente (OR = 0.29 IC = 0.08 – 1.08 P = 0.03) ya que el valor de P fue menor a 0.05.

Tabla No. 3. Cuadro clínico asociado a Leptospirosis de la población estudiada (N = 90)

Característica	Total (%)	Leptospira + Lepstospira -	OR	IC	Valor P	
Ha tenido fiebre						
Sí	87 (96.7 %)	64 (71.13 %)	23 (25.56 %)	1.39	(0.00 - 21.09)	0.79
No	3 (3.3%)	2 (2.20 %)	1(1.10 %)			
Ictericia presente						
Sí	14 (15.6 %)	7 (7.80 %)	7 (7.80 %)	0.29	(0.08 - 1.08)	0.03
No	76 (84.4 %)	59 (65.52 %)	17 (18.88 %)			
Epistaxis						
Sí	8 (8.9 %)	5 (5.56 %)	3 (3.34 %)	0.57	(0.11 - 3.36)	0.47
No	82 (91.1 %)	61 (67.77 %)	21 (23.33 %)			
Dolor en articulaciones						
Sí	46 (51.1 %)	34 (37.77 %)	12 (13.33 %)	1.06	(0.38 - 2.99)	0.90
No	44 (48.9 %)	32 (35.56 %)	12 (13.34 %)			
Dolor de cabeza						
Sí	77 (85.6 %)	58 (64.48 %)	19 (21.12 %)	1.91	(0.47 - 7.55)	0.30
No	13 (14.4 %)	8 (8.86 %)	5 (5.54 %)			
Petequias						
Sí	4 (4.4 %)	3 (3.30 %)	1(1.10 %)	1.10	(0.09 - 28.79)	0.94
No	86 (95.6 %)	63 (70.03 %)	23 (25.57 %)			
Diarrea						
Sí	61 (67.8 %)	45 (50.02 %)	16 (17.78 %)	1.07	(0.35 - 3.21)	0.89
No	29 (32.3 %)	21(23.39 %)	8 (8.91 %)			
Rash						
Sí	13 (14.4 %)	7 (7.75 %)	6 (6.65 %)	0.36	(0.09 - 1.39)	0.09
No	77 (85.6 %)	59 (65.59 %)	18 (20.01 %)			
Conjuntivitis						
Sí	4 (4.4 %)	4 (4.40 %)	0 (0.00 %)	Indefinido	Indefinido	0.22
No	86 (95.6 %)	62 (68.92 %)	24 (26.68 %)			
Vomitos						
Sí	64 (71.1 %)	47 (52.21 %)	17 (18.89 %)	1.02	(0.32 - 3.17)	0.97
No	26 (28.9 %)	19 (21.12 %)	7 (7.78 %)			

OR = Odds Ratio IC = Intervalo de Confianza Valor P = Probabilidad ($\alpha = 0.05$)

El tratamiento de la leptospirosis es muy importante, ya que al no tratarse puede causar daño hepático y renal por eso es necesario evaluar la relación que existe entre el tiempo de

tener síntomas y la enfermedad. Según los datos que muestra la tabla No. 4, no existe ninguna relación entre el tiempo y leptospirosis.

Tabla No. 4. Relación entre el tiempo de tener los síntomas y leptospirosis de la población estudiada (N = 90)

Característica	Total (%)	N	Leptospira +	Leptospira -	OR	IC	Valor P
Malestar General							
1 a 6 días	46 (51.10 %)	90	35 (38.88 %)	11 (12.22 %)	1.33	(0.47 - 3.78)	0.55
Más de 6 días	44 (48.9 %)		31 (34.45 %)	13 (14.45 %)			
Ha tenido fiebre							
1 a 6 días	52 (57.80 %)	87	39 (43.35 %)	13 (14.45 %)	1.20	(0.41 - 3.50)	0.71
Más de 6 días	35 (38.9 %)		25 (27.79 %)	10 (11.11 %)			
Dolor en articulaciones							
1 a 6 días	22 (24.40 %)	46	17 (18.85 %)	5 (5.54 %)	1.40	(0.31 - 6.47)	0.62
Más de 6 días	24 (26.70 %)		17 (18.91 %)	7 (7.79 %)			
Dolor de cabeza							
1 a 6 días	46 (51.10 %)	78	35 (38.88 %)	11 (12.22 %)	1.06	(0.33 - 3.41)	0.91
Más de 6 días	32 (35.50 %)		24 (26.62 %)	8 (8.88 %)			
Petequias							
1 a 6 días	1 (1.10 %)	4	1 (1.10 %)	0 (0.00 %)	Indefinido	Indefinido	0.56
Más de 6 días	3 (3.30 %)		2 (2.20 %)	1 (1.10 %)			
Diarrea							
1 a 6 días	38 (42.20 %)	61	29 (32.21 %)	9 (9.99 %)	1.41	(0.38 - 5.22)	0.56
Más de 6 días	23 (25.60 %)		16 (17.81 %)	7 (7.79 %)			
Rash							
1 a 6 días	4 (4.40 %)	14	3 (3.30 %)	1 (1.10 %)	3.00	(0.15 - 107.74)	0.41
Más de 6 días	10 (11.00 %)		5 (5.50 %)	5 (5.50 %)			
Conjuntivitis							
1 a 6 días	3 (3.30 %)	4	3 (3.30 %)	0 (0.00 %)	No aplica	No aplica	No aplica
Más de 6 días	1 (1.10 %)		1 (1.10 %)	0 (0.00 %)			
Vomitos							
1 a 6 días	41 (45.60 %)	64	30 (33.37 %)	11 (12.23 %)	0.96	(0.26 - 3.52)	0.95
Más de 6 días	23 (25.50 %)		17 (18.85 %)	6 (6.65 %)			

OR = Odds Ratio IC = Intervalo de Confianza Valor P = Probabilidad ($\alpha = 0.05$)

La tabla No. 5 muestra la frecuencia de patrones de enfermedades combinadas con leptospirosis. El 10.00% de los 90 pacientes estudiados presentaron citomegalovirus y leptospirosis, mientras que el 3.33% mononucleosis infecciosa y leptospirosis, el otro 5.55% se distribuye en diferentes combinaciones con hepatitis A, hepatitis B, y mononucleosis infecciosa.

Tabla No. 5. Frecuencias de patrones enfermedades combinadas con Leptospirosis de la población estudiada (N = 90)

	CMV + LP	MI + LP	HAV + CMV + LP	HCV + LP	MI + CMV + LP	HAV + LP	HbsAg + LP
No. de pacientes	9 (10.00%)	3 (3.33 %)	1 (1.11 %)	1 (1.11 %)	1 (1.11 %)	1 (1.11 %)	1 (1.11 %)
CMV + LP = Citomegalovirus y leptospirosis				MI + LP = Mononucleosis infecciosa y leptospirosis			
HAV + CMV + LP = Hepatitis A, Citomegalovirus y Leptospirosis				HCV + LP = Hepatitis C y Leptospirosis			
MI + CMV + LP = Mononucleosis infecciosa, citomegalovirus y leptospirosis				HAV + LP = Hepatitis A y Leptospirosis			
HbsAg + LP = Hepatitis B y Leptospirosis.							

Por la similitud clínica que puede existir entre leptospirosis y enfermedades como dengue, malaria, hepatitis, mononucleosis infecciosa y citomegalovirus, fue importante realizar un diagnóstico diferencial entre ellas. En la tabla No. 6 aparecen las diferentes frecuencias de éstas en los 90 pacientes estudiados. El 14.44% de los pacientes presentaron citomegalovirus.

Tabla No. 6. Frecuencia de enfermedades con sintomatología común a Leptospirosis de la población estudiada (N = 90)

N	HAV	HbsAg	HCV	MI	CMV	LP	Dengue	Malaria
No. De muestras procesadas	22	90	90	90	90	90	55	90
Pacientes positivos	2 (9.09 %)	2 (2.22 %)	2 (2.22 %)	4 (4.44 %)	13 (14.44 %)	66 (73.33 %)	2 (3.64 %)	0 (0.00 %)
Pacientes Negativos	20 (90.91 %)	88 (97.78 %)	88 (97.78 %)	86 (95.56 %)	87 (85.56 %)	34 (26.67 %)	53 (96.36 %)	90 (100.00 %)

HAV = Hepatitis A HbsAg = Hepatitis B HCV = Hepatitis C MI = Mononucleosis infecciosa LP = Leptospirosis

A todos los pacientes se les realizó pruebas de hematología y bioquímica, y sabiendo el valor que estas tienen en el diagnóstico de leptospirosis fue necesario describir los valores de las pruebas en 3 niveles normal, alto y bajo. En la tabla No. 7 se manifiestan las frecuencias de los parámetros que se analizan en una prueba de hematología en sus 3 diferentes niveles. El 37.88% de 66 pacientes con leptospirosis presentaron el recuento de glóbulos blancos normal y solamente el 30.30% lo tenía alto. El 42.42% de los pacientes mostraron el recuento de plaquetas bajo y el 77.27% presentaban neutrofilia.

Tabla No.7. Frecuencia de los parámetros hematológicos en sus tres diferentes niveles de la población estudiada asociada a Leptospirosis (N = 66)

Parámetros	Niveles		
	Bajo	Normal	Alto
RGB	21 (31.82 %)	25 (37.88 %)	20 (30.30 %)
RGR	16 (24.24 %)	48 (72.73 %)	2 (3.03 %)
HB	32 (48.48 %)	32 (48.48 %)	2 (3.03 %)
HT	32 (48.48 %)	33 (50.00 %)	1 (1.52 %)
VCM	11 (16.67 %)	53 (80.30 %)	2 (3.03 %)
HCM	12 (18.18 %)	54 (81.82 %)	0 (0.00 %)
CHCM	10 (15.15 %)	56 (84.85 %)	0 (0.00 %)
PLT	28 (42.42 %)	38 (57.58 %)	0 (0.00 %)
N	4 (6.06 %)	11 (16.67 %)	51 (77.27 %)
L	49 (74.24 %)	13 (19.70 %)	4 (6.06 %)
M	0 (0.00 %)	46 (69.70 %)	20 (30.30 %)
E	0 (0.00 %)	63 (95.45 %)	3 (4.54 %)
B	0 (0.00 %)	63 (95.45 %)	3 (4.54 %)

RGB = Recuento de glóbulos blancos

HT = Hematocrito

media CHCM = Concentración de hemoglobina corpuscular media

L = Linfocitos

B = Basófilos

RGR = Recuento de glóbulos rojos

VCM = Volumen corpuscular medio

PLT = Plaquetas

M = monocitos

HB = Hemoglobina

HCM = Hemoglobina corpuscular

N = Neutrófilos

E = Eosinófilos

En la tabla No. 8 se muestran las frecuencias de las pruebas bioquímicas en sus 3 diferentes niveles en pacientes con leptospirosis. El 45.45% de los 66 pacientes con leptospirosis presentaban la aspartatoaminotransferasa (ASAT) elevada y el 34.85% la alaninaaminotransferasa (ALAT). En cuanto a la bilirrubina directa (BD) el 59.09 % de los pacientes la tenían elevada. Con relación a las pruebas renales el 78.79% de los pacientes tenían el nitrógeno de urea normal.

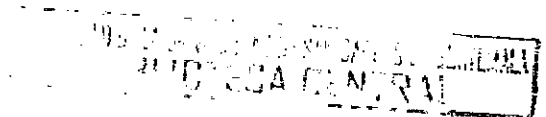


Tabla No. 8. Frecuencia de pruebas bioquímicas en sus tres diferentes niveles de la población estudiada asociada a Leptospirosis (N = 66)

Parámetros	Niveles			
	Bajo	Normal	Alto	No se realizó
ALAT	0 (0.00 %)	39 (59.09 %)	23 (34.85 %)	4 (6.06 %)
ASAT	0 (0.00 %)	27 (40.91 %)	30 (45.45 %)	9 (13.64 %)
BT	5 (7.56 %)	31 (46.97 %)	30 (45.45 %)	4 (6.06 %)
BD	0 (0.00 %)	22 (33.33 %)	39 (59.09 %)	5 (7.56 %)
BI	0 (0.00 %)	41 (62.12 %)	20 (30.30 %)	5 (7.56 %)
BUN	0 (0.00 %)	52 (78.79 %)	14 (21.21 %)	0 (0.00 %)
CREATININA	7 (10.61 %)	49 (74.24 %)	9 (13.64 %)	1 (1.52 %)
ACIDO URICO	0 (0.00 %)	50 (75.76 %)	15 (22.73 %)	1 (1.52 %)
GGT	0 (0.00 %)	10 (15.15 %)	19 (28.79 %)	37 (56.06 %)
LDH	1 (1.52 %)	22 (33.33 %)	19 (28.29 %)	24 (36.36 %)
GLUCOSA	11 (16.67 %)	34 (51.52 %)	21 (31.82 %)	0 (0.00 %)
FAL	0 (0.00 %)	29 (43.94 %)	33 (50.00 %)	4 (6.06 %)

ALAT = Alaninaaminotransferasa ASAT = Aspartatoaminotransferasa BT = Bilirrubina total BD = Bilirrubina directa
 BI = Bilirrubina indirecta BUN = Nitrógeno de urea GGT = Gamaglutamiltransferasa
 LDH = Lactato deshidrogenasa FAL = Fosfatasa alcalina

En la tabla No. 9 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad así como los valores predictivos de los diferentes métodos (campo oscuro y aglutinación en látex) que se compararon con el método estándar, inmunoensayo enzimático (ELISA), para el diagnóstico de leptospirosis.

Tabla No.9. Comparación de métodos empleados para diagnosticar leptospirosis

Método	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Campo Oscuro	0.38 (38.00 %)	0.43 (43.00 %)	0.45 (45.00 %)	0.36 (36.00 %)
Agglutinación en Látex	0.33 (33.00 %)	0.49 (49.00 %)	0.44 (44.00 %)	0.37 (37.00 %)

VPP = Valor Predictivo Positivo

VPN = Valor Predictivo Negativo

En la tabla No. 10 se indican las frecuencias de los patrones de pacientes con pruebas positivas para leptospirosis, el patrón mas frecuente fue el de campo oscuro y aglutinación en látex negativo con ELISA IgM en la primera y segunda muestra positivo.

Tabla No. 10. Frecuencia de patrones de pacientes con pruebas positivas para el Diagnóstico de Leptospiriosis (N = 79)

No. Patrón	Métodos para el Diagnóstico de Leptospiriosis					Total (%)
	CO	AL	ELISA IgM 1	ELISA IgM 2	ELISA IgG 2	
1	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	2 (2.53 %)
2	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Zona Gris	3 (3.80 %)
3	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	13 (16.46 %)
4	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	11 (13.92 %)
5	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	1 (1.26 %)
6	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	2 (2.53 %)
7	Positivo	Positivo	Positivo	No se realizó	No se realizó	2 (2.53 %)
8	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4 (5.06 %)
9	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	9 (11.39 %)
10	Negativo	Positivo	Positivo	No se realizó	No se realizó	1 (1.26 %)
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1 (1.26 %)
12	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	1 (1.26 %)
13	Positivo	Negativo	Negativo	No se realizó	No se realizó	2 (2.53 %)
14	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	4 (5.06 %)
15	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	2 (2.53 %)
16	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	1 (1.26 %)
17	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	1 (1.26 %)
18	Positivo	Negativo	Positivo	No se realizó	No se realizó	1 (1.26 %)
19	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	1 (1.26 %)
20	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Zona Gris	2 (2.53 %)
21	Negativo	Negativo	Positivo	No se realizó	No se realizó	4 (5.06 %)
22	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Gris	1 (1.26 %)
23	Positivo	Negativo	Zona Gris	Negativo	Positivo	1 (1.26 %)
24	Positivo	Negativo	Zona Gris	Negativo	Negativo	1 (1.26 %)
25	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Gris	Negativo	2 (2.53 %)
26	Negativo	Negativo	Zona Gris	No se realizó	No se realizó	3 (3.80 %)
27	Positivo	Negativo	Zona Gris	No se realizó	No se realizó	1 (1.26 %)
28	Positivo	Negativo	Negativo	Zona Gris	Negativo	1 (1.26 %)
29	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Zona Gris	1 (1.26 %)

CO = Campo Oscuro

AL = Aglutinación en Látex

ELISA IgM 2 = ELISA IgM de la Segunda Muestra

ELISA IgM 1 = ELISA IgM de la Primera Muestra

ELISA IgG 2 = ELISA IgG de la Segunda Muestra

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La tabla No. 1 muestra que de los 90 pacientes muestrados el 53.30% fueron hombres, a pesar de esto el porcentaje de mujeres con leptospirosis fue mas alto, 44.55%.

En cuanto a la edad el 80% de los pacientes eran mayores de 50 años y de estos 55 (61.11%) padecían de leptospirosis.

Se conoce que la leptospirosis se adquiere con mayor facilidad en el campo donde la condición social y económica es baja, sin embargo del 73.30% de los pacientes que eran procedentes de la capital 47 (52.20%) padecían de leptospirosis.

Lo anterior es algo inesperado ya que la leptospirosis es una enfermedad ocupacional, asociada a agricultores, se esperaba que el porcentaje de agricultores fuese mayor, al igual que el género predominante con leptospirosis fuera el masculino, que la edad esperada fuese menor de los 50 años por ser un rango de edad productiva y que la mayoría de pacientes proviniesen del interior de la república.

Con referencia a los factores predisponentes, el tipo de producto de siembra no tuvo ninguna relación con padecer leptospirosis. Se esperaba que los servicios básicos influyeran en padecer o no la enfermedad, ya que el agua es el principal vehículo del agente causal. El 56.10% de los pacientes tenían los 5 servicios básicos (agua potable, luz eléctrica, drenajes, inodoro y recolección de basura) de los cuales el 40.02% padecían de leptospirosis y el otro 43.30% que carecían de alguno de los 5 servicios básicos 30 padecían de esta enfermedad, esto significa que no existe ninguna relación entre los servicios básicos y la enfermedad.

Siendo los basureros un factor muy importante para la proliferación de ratas y perros callejeros, y sabiendo que la orina de éstos es uno de los vehículos mas importantes de contaminación, de ahí radica la importancia de urbanizar, construir lejos de éstos o eliminarlos. El 42.30% de los 51 pacientes vivían cerca de un basurero público a una distancia menor de 500 metros y de esos 26 padecían de leptospirosis. No existió ninguna diferencia entre éstos y los que vivían a mas de 500 metros de un basurero ya que de los 13 restantes que correspondía a un 14.40%, 2 no padecían la enfermedad.

El contacto o la cercanía de alguna poza de agua con los productos de cultivo es un factor importante para contraer leptospirosis. El 6.70% de los pacientes eran agricultores que tenían una poza cerca del lugar del cultivo y 4 (4.47%) de ellos padecían de la enfermedad,

mientras que los otros cuatro agricultores que no tenían poza cerca del lugar de cultivo padecían de leptospirosis. El 93.30% de los pacientes restantes correspondían a 4 agricultores que no tenían poza cerca del lugar de cultivo y 80 que tenían otra ocupación de los cuales el 68.86% padecían de leptospirosis, es decir que no existió ninguna relación entre tener una poza cerca del lugar de cultivo y la enfermedad.

Las inundaciones son un factor importante ya que las personas están más expuestas a masas de agua dulce de ríos, o lagos contaminados y por lo tanto tienen mayor riesgo de infectarse con *Leptospira interrogans*, de ahí la importancia de tener buenos drenajes en los lugares de trabajo y vivienda, el 50% de los pacientes cuyas viviendas estaban expuestas a inundaciones padecen de la enfermedad, uno de los 90 pacientes evaluados que trabajaba en lugares afectados por éstas tuvo leptospirosis.

Los animales salvajes y domésticos son los principales reservorios de la bacteria por lo tanto fue importante evaluar si los pacientes trabajaban con animales o poseían mascotas, 19 de las personas que trabajaban con cerdos, aves o vacas y 23 de 32 personas que tenían perros como mascotas padecían de la enfermedad.

Padecer alguna enfermedad hepática previo a la leptospirosis y el tipo de serovar infectivo pueden ser factores importantes para causar en el paciente síndrome de Weil (Forma grave de leptospirosis), 7 de 8 pacientes padecieron de hepatitis A en la infancia y 11 presentaron ictericia.

El dengue y el paludismo son enfermedades en las cuales su cuadro clínico es similar a la leptospirosis por lo tanto se considera que puede existir alguna relación de éstas con padecer la enfermedad. El 13.36% de 15 pacientes con leptospirosis padecieron de dengue y 13 de 19 pacientes de paludismo.

Como bien se sabe el cuadro clínico de la leptospirosis es muy parecido a otras enfermedades como hepatitis virales, mononucleosis infecciosa, dengue, malaria mencionadas anteriormente, por eso fue muy importante evaluar la relación que existe entre éste y el padecimiento de la enfermedad, como se muestra en la tabla No. 3. La leptospirosis se puede presentar de forma severa (Síndrome de Weil), en la cual la ictericia es una de las características más importantes como consecuencia del fallo hepático y renal. Esta fue la única característica clínica que tuvo relación, presentó un valor $P = 0.03$ ($\alpha = 0.05$), el 50% de los pacientes con ictericia presentaron esta enfermedad. La fiebre es un síntoma muy

importante en cualquier infección, el 96.7% de los 90 pacientes evaluados presentaron fiebre y 64 de éstos presentaron la enfermedad y 3 que no presentaron fiebre 2 la padecieron, el 57.80% de los pacientes la presentaron en los primeros 6 días y el resto arriba del sexto día. El cuadro clínico que se presenta en la tabla No. 3 corresponde a los criterios de inclusión que se tomaron para aceptar a los pacientes en el estudio, un dato curioso es que de los 66 pacientes que padecieron de leptospirosis 4 de ellos tuvieron conjuntivitis previa, y 7 presentaban rash posiblemente se encontraban en la segunda fase de la enfermedad.

Se sabe que la bacteria *Leptospira interrogans* tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y por lo tanto puede provocar una meningitis la cual puede ser confundida con una meningitis viral, el dolor de cabeza es un signo clínico muy importante en la determinación de esta patología, ya que puede ser característico del inicio de la misma, el 64.48% de los pacientes que padecieron de la enfermedad tuvieron dolor de cabeza.

El intervalo de tiempo de presentación de los síntomas es muy importante, ya que se puede deducir la fase de la enfermedad en que se encuentra el paciente, 35 de los pacientes con dolor de cabeza estaban en fase aguda (1-6 días) y 24 en una fase crónica (arriba de 6 días), como se muestra en la tabla No 4.

El dolor abdominal, la náusea y los vómitos son característicos en la fase aguda, el 52.21% de los pacientes de 64 pacientes que presentaron vómitos presentaron leptospirosis.

Más del 50% de los pacientes que presentaron dolor articular, petequias y diarrea padecieron de la enfermedad. El dolor articular pudo haber estado asociado a otras patologías como la artritis reumatoide, ya que la mayor parte de los pacientes eran mayores de 50 años (la mayor parte de los pacientes presentan artritis reumatoide arriba de los 50 años) y 17 de ellos lo presentaron arriba del sexto día (proceso crónico).

En la tabla No. 4 se muestra la relación que existe entre el tiempo de tener los síntomas y la leptospirosis, 35 de los pacientes que presentaron malestar general durante los primeros 6 días desarrollaron ésta. La cantidad de pacientes que tuvieron rash después de los 6 días fue mayor que la de los primeros días, esto demuestra que los pacientes estaban pasando por la segunda fase de la enfermedad, mientras que de las 4 personas que tuvieron conjuntivitis 3 la presentaron durante los primeros 6 días y una después del sexto día, posiblemente la conjuntivitis de las primeras 3 no tenía ninguna relación con leptospirosis.

Debido a la similitud que existe entre la sintomatología de la leptospirosis y otras enfermedades como hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, mononucleosis infecciosa, citomegalovirus dengue y malaria fue necesario hacer un diagnóstico diferencial entre estas. Hubo 17 pacientes que presentaron más de una enfermedad, el 10% presentaron citomegalovirus y leptospirosis, el 3.33% mononucleosis infecciosa y leptospirosis, mientras que el 1.11% corresponde a cada combinación restante que se muestra en la tabla No. 5 de los 90 pacientes del estudio.

En la tabla No.6 se muestran la frecuencia de cada enfermedad, la mas alta fue la de leptospirosis (73.33%) seguida por citomegalovirus (14.44%) y mononucleosis infecciosa (4.44%), mientras que hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y dengue corresponden al 2.22% cada una. Para diagnosticar cada una de ellas se evaluó en algunas inmunoglobulina M (IgM), ya que el estado de los pacientes era de fase aguda. La determinación de estas se realizaron en aparatos automatizados, AXSYM (ROCHE)[®] y COBAS (ABBOTT)[®]. A Excepción de la determinación de mononucleosis infecciosa y de leptospirosis que se realizaron manualmente, la primera por medio de una aglutinación en látex y la segunda por ELISA. Vale la pena mencionar que sólo a 22 de los 90 pacientes se les realizó HAV IgM debido a la edad que éstos presentaban y que a 55 pacientes dengue IgM debido a que los demás estaban dentro de los primeros 6 días de presentar los síntomas es decir que no se encontraban en la fase inmune, por lo tanto la concentración de anticuerpos IgM resulta ser muy baja. A todas la muestras se les realizaron frotis para observar parásitos intracelulares de *Plasmodium* sp, y ninguna resultó positiva, se trató de que todas las muestras se tomaran en etapa febril.

Entre los hallazgos clínicos más comunes encontrados en la segunda fase de la leptospirosis son problemas musculares, conjuntivitis, adenopatía, esplenomegalia y rash. El conteo de glóbulos blancos es normal o levemente elevados, pero la mayoría de los casos presentan neutrofilia y la velocidad de eritrosedimentación raramente se eleva. En la tabla No. 7 se muestra la clasificación de los valores hematológicos, normal, alto y bajo. La mayor parte de los pacientes con leptospirosis presentaron valores normales a excepción del conteo de neutrófilos ya que el 77.27% de éstos presentaron neutrofilia y el 30.30% presentó un valor alto en el recuento de glóbulos blancos. El 42.42% de los pacientes presentaron trombocitopenia, es importante evaluarla ya que ésta puede acompañarse de

CID (coagulación intravascular diseminada) que es frecuente en el Síndrome de Weil (Leptospirosis icterica), forma severa de la leptospirosis.

La leptospirosis icterica se caracteriza por afectación de riñones y de la función hepática. La ictericia no se asocia a necrosis hepatocelular. En la tabla No. 8 se muestran los niveles de los valores de las pruebas bioquímicas de los pacientes, el 59.09% de los pacientes tuvieron alta la bilirrubina directa y 3 de éstos arriba de los 20 mg/dl, regularmente los niveles de ésta en la leptospirosis icterica están usualmente por debajo de este valor. Hay que tener en cuenta que 17 pacientes además de tener leptospirosis padecieron de otras enfermedades anteriormente mencionadas que pudieron haber contribuido en los 3 casos con valores de bilirrubinas arriba de los 20 mg/dl. Los niveles de la fosfatasa alcalina son moderadamente elevados, el 50.00% de los pacientes los tenían elevados, 16 de ellos tenían los niveles arriba de 500 U/L. Hay que tener en cuenta que los niveles de fosfatasa alcalina pueden elevarse moderadamente fisiológicamente en etapa de crecimiento por eso es muy importante saber la edad del paciente sin embargo la mayoría de los pacientes infectados eran mayores de 50 años. Los niveles de Alaninaaminotransferasa (ALAT) y aspartatoaminotransferasa (ASAT) raramente exceden arriba de 100 U/L, el 34.85% de los pacientes con leptospirosis tenían niveles altos de ALAT y el 45.45% de ASAT, 15 de estos pacientes tenían valores arriba de 100 U/L de ALAT y 24 de ASAT. El 21.21% de los pacientes tuvieron altos los niveles de nitrógeno de urea (BUN) y el 13.64% de creatinina. En la leptospirosis icterica los valores de BUN están por debajo de los 100 mg/dl y de la creatinina debajo de 8 mg/dl. Tres de los pacientes tenían los niveles de BUN arriba de los 100 mg/dl y dos la creatinina arriba de 8 mg/dl, posiblemente estos pacientes padecían de otras enfermedades en las cuales exista también un compromiso hepático y renal.

El diagnóstico de leptospirosis depende de los hallazgos del laboratorio. Los criterios para definir el diagnóstico dependen del aislamiento del organismo o seroconversión al encontrarse títulos elevados de anticuerpos en presencia de enfermedad clínica compatible, por esta razón es importante hacer una evaluación de los métodos para diagnosticar leptospirosis, se tomó como método estándar el ELISA el cual tiene características similares en cuanto a su sensibilidad y especificidad según estudios que han realizado Levett y colaboradores a la microaglutinación (MAT). Los valores de sensibilidad de los métodos fueron de 38% para el campo oscuro y el 33% para el de aglutinación en látex, tal como se

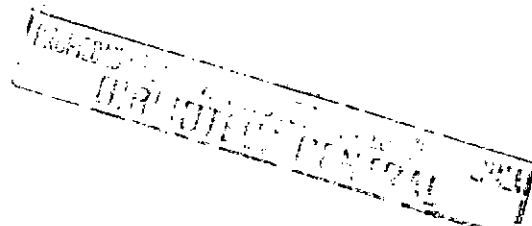
esperaba, y una especificidad del 43 y 49% respectivamente, como se muestra en la tabla No. 9. A pesar de que ambos métodos fueron poco sensibles, el campo oscuro resultó ser mejor ya que al observar las espiroquetas al microscopio no hay diferenciación específica del tipo de espiroqueta, mientras que el de aglutinación en látex fue más específico, debido a que éste detecta anticuerpos específicos anti *Leptospira interrogans* IgM e IgG. El valor predictivo positivo indica el grado de positividad de la prueba, mientras mas alto sea este menor es la probabilidad de detectar casos falsos negativos (45% campo oscuro y 44% aglutinación en látex) y el valor predictivo negativo indica el grado de negatividad de la prueba, mientras mas alto sea éste menor es la probabilidad de detectar casos falsos positivos (36% campo oscuro y 37% aglutinación en látex), en ambos métodos los valores fueron muy bajos, es decir que la probabilidad de detectar valores falsos es muy alta.

A los pacientes se les realizó 2 muestreos, el primero sirvió para observar la espiroqueta en campo oscuro y para detectar anticuerpos de tipo IgM para *Leptospira interrogans*. El segundo muestreo se realizó a los 7 días para confirmar y detectar anticuerpos tipo IgM en aquellos pacientes que tenían los niveles bajos en el primer muestreo, en este estudio se confirmaron 11 casos (13.92%) que presentaban las características anteriores (ver tabla No. 10), y para detectar anticuerpos tipo IgG con el objetivo de evaluar si el paciente había tenido contacto con el agente causal o padecido de leptospirosis previo a la infección reciente o si realmente la presencia de este tipo de anticuerpos se debe a esta. En la tabla No.10 se muestra la cantidad de pacientes por patrón de las pruebas que fueron positivas para leptospirosis, el 16.46% de 79 pacientes presentaron anticuerpos tipo IgM en la primera y segunda muestra, ésto confirma el diagnóstico de la enfermedad, no presentaron anticuerpos IgG y se debe a que los pacientes no habían formado una concentración detectable por el método. El 13.92% de los pacientes presentaron un patrón similar al anterior con la diferencia de que ya habían formado anticuerpos de tipo IgG. El 11.39% de los pacientes fueron positivo para campo oscuro y positivos para detección de anticuerpos tipo IgM para los dos muestreos, no presentaron detección de anticuerpos IgG. Hubo algunos pacientes que no regresaron para la segunda toma de muestra, por razones propias, por lo tanto no se pudo confirmar el resultado del primer muestreo, ya que algunos (5.06%) presentaron valores en zona gris. A dos de los pacientes de los que se le realizaron ambos muestreos presentaron valores de anticuerpos

toma de muestra, por razones propias, por lo tanto no se pudo confirmar el resultado del primer muestreo, ya que algunos (5.06 %) presentaron valores en zona gris. A dos de los pacientes de los que se le realizaron ambos muestreos presentaron valores de anticuerpos IgM en zona gris en lo que se refiere al primer muestreo y en el segundo fueron negativos, posiblemente este fenómeno fue causa de alguna reacción cruzada o estaba en la parte final de la fase aguda donde los niveles de IgM son bajos; además uno de ellos presentó anticuerpos IgG debido probablemente a una exposición o infección previa a la actual. Lo ideal hubiera sido que los 3 métodos utilizados para el análisis de las muestras hubieran dado resultados positivos de detección, solamente una persona a quien se le realizó los dos muestreos presentó este patrón. Los demás patrones que se muestran en la tabla No.10 son combinaciones de detección entre todos los métodos utilizados para el diagnóstico de leptospirosis.

IX. CONCLUSIONES

1. La sensibilidad y la especificidad de los métodos de aglutinación en látex y campo oscuro fueron muy bajas, (38% y 33% sensibilidad; 45 y 44% especificidad), por lo tanto ambos métodos no son adecuados para el diagnóstico de leptospirosis.
2. Ninguno de los factores predisponentes se relacionan con el padecimiento de leptospirosis.
3. La única característica clínica que tuvo relación con el padecimiento de la enfermedad fue la ictericia presente en el paciente.
4. La frecuencia de leptospirosis que existe en la emergencia de adultos del Hospital San Juan de Dios es del 73.33% en 90 pacientes que presentaron el cuadro clínico, muestreados durante el período de mayo a octubre del año 2002.
5. El patrón mas común que presentaron los pacientes fue campo oscuro, aglutinación en látex negativos con detección de anticuerpos tipo IgM con ELISA positivos para la primera y segunda muestra, y la determinación de anticuerpos tipo IgG negativa para la segunda muestra. El 16.46% de los 79 pacientes con pruebas positivas para el diagnóstico de leptospirosis presentó este patrón.



6. Con el segundo muestreo que se realizó a los 7 días, se confirmaron 11 casos (13.92%) con la determinación de anticuerpos tipo IgM por el método de ELISA en pacientes que presentaron niveles bajos en el primer muestreo.

X. RECOMENDACIONES

1. Realizar una prueba específica (ELISA IgM) para leptospirosis a aquellos pacientes que se les sospeche de Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Citomegalovirus, Mononucleosis infecciosa, Dengue y Malaria con leptospirosis.
2. Realizar estudios de comparación de métodos para el diagnóstico de leptospirosis con una población grande tomando en cuenta otros métodos como inmunofluorescencia, hemaglutinación, cultivos bacterianos y microaglutinación y que la información obtenida sea representativa para el país.
3. Realizar estudios para encontrar la incidencia de leptospirosis en el país utilizando una población representativa.
4. Implementar charlas y conferencias a los médicos del Hospital San Juan de Dios para que conozcan sobre la enfermedad y que piensen en ella como una patología de alto riesgo de morbilidad en la población que acude a la emergencia de adultos.
5. Conocer que no sólo es una enfermedad ocupacional, sino que cualquiera puede contraerla y que si no es tratada puede causar severos daños hepáticos y renales.
6. Evaluar la calidad de agua que la gente toma en la ciudad capital mediante un análisis microbiológico.
7. Eliminar los basureros municipales que estén cerca de zonas residenciales y de trabajo.
8. Tener un control sobre la cantidad de perros callejeros que hay en la ciudad capital.

9. Tener un control de plagas de ratas en alcantarillados, en el campo de siembras y en lugares cercanos a basureros.

XI. REFERENCIAS

1. Pedro N. Acha, Boris Sz y Fres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS Publicación Científica. Segunda Edición. 1963. No. 503.
2. Unidad de vigilancia Epidemiológica, Departamento de Epidemiología, Dirección General del Sistema Integral de Atención en Salud. MSPAS. Leptospirosis (documento). Guatemala, 1999.
3. Villegas de Olazábal, Hugo. Leptospirosis. Web Oficial del Sector Salud en Costa Rica. Net-Salud Costa Rica, 1995-1997.
4. Bañuelos Romero Armando. Leptospirosis. OPS-OMS. InterWEB Services C.A. 1998.
5. Benenson, Abram S. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Decimosexta edición. OPS-OMS, 1997. Pag 294-297.
6. Paul N. Levett. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. Abril 2001. Pag. 296-326.
7. García G. Arelis. Leptospirosis humana en pacientes febriles en un hospital de la ciudad de Maracaibo. Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. InterWEB Services C.A. 1998.
8. Suárez Hernández, Miguel. Et al. Leptospirosis en niños de la provincia de Ciego de Avila, Cuba. Revista du Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Marzo-abril 1999. 32(2):145-150.
9. Zavala-Velásquez, Jorge. Et al. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la península de Yucatán. Rev. Biomed 1998. 9:78-83.

10. Katz Ar. Et al. Leptospirosis on Kauai: Investigation of a common source waterborne outbreak. American Journal Public Health. Octubre 1991. 81(10): 1310-1312.
11. Serjo A.C. Et al. Neumopatía por leptospirosis. La prensa libre médica Argentina. 1994. 81(8): 834-839.
12. Serjo A.C. Et al. Distress respiratorio del adulto en Oram Salta. Comunicación realizada en el primer Congreso Interamericano de Infectología. Córdoba, Argentina. Mayo 1994.
13. Cruz, Sergio. Avalancha en Chinandega 11 casos positivos de leptospirosis. El Nuevo diario, Nicaragua, 16 de Noviembre de 1998.
14. Laboratorio Nacional de Salud. Area de diagnóstico de Leptospirosis. Guatemala, 1998-2002.
15. Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infection disease. Fourth edition. Churchill Livinstone. USA. 1995. 2: 2,137-2,141.
16. George Watt. Leptospirosis. Current Opinion in Infection Disease. 1997. 10: 149-152.
17. Gallop Th. Rat Bite Leptospirosis Wet Journal Medicine. 1993. 159:76.
18. Levin N. Et al. Panuveitis with papillitis in leptospirosis. American Journal Ophthalmology. January 1994. 117 (1):118-119.
19. Garrido R. Castillo. Et al. Systemic leptospirosis as a cause of multiple organ failure. Revista médica Chile. Marzo 1996. 124(3): 359-362.
20. Zakki Sr., W. Janol. Epidemic working leptospirosis associated group with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage. Nicaragua. 1995. 47: 535-536.
21. Zakki Sr., Shieh Wi. Outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage. Morby-mortality report 1995. 44:839-843. Nicaragua 1995. 44:839-843.

22. Zakki Sr., Shieh Wj. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary, Nicaragua. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua. Febrero 1996. 49: 535-536.
23. Teglia Of. Et al. Epidemiology and Radiology Departament, Sanatorio Parque, Rosario, Argentina. Septiembre 1995. 108 (3):874-875.
24. Stoianova Na. Et al. Immunological Monitoring and The Epidemiological Characteristics of Leptospirosis in Saint Petersburg. American Journal Tropical Medicine Hygiene. Febrero 1997. 56 (2): 181-187.
25. Panidis D. Et al. Hipotalamic Pituitary Deficiency after Weil's Syndrome. Fertil Steril. Noviembre 1994. 62 (5): 1077-1079.
26. Bios Labordiagnostik GmbH. ELISA Screening Test for the Detection of IgM and IgG antibodies to *Leptospira* in Human Serum. 1999. Pág. 1-11.
27. Adolfo Lutz., Emilio Ribes. Behavior of Specific IgM, IgG and IgA. Class Antibodies in Human *Leptospiras* During The Acute Phase of The Disease and During Convalescence. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1993. 98:1268-1272.
28. Katz Ar. Et al. Leptospirosis on OAHU: An Outbreak Among Military Personnel Associated with Recreational Exposure. Military Medicine. Febrero 1997. 162(2):101-104.
29. Bios Labordiagnostik GmbH. Detection of antibodies to *Leptospira interrogans* by Latex Agglutination. 1999. Pág. 1-6.
30. Henk L. Smits. Et al. Simple Latex Agglutination Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology. Marzo 2,000. Pág. 1272-1275.

31. Paul Levett. Et al. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis os Acute Leptospirosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Marzo 2001. Pág. 349-351.
32. Edwards, C. Et al. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. American Journal Tropical Medicine. 1988. 39:388-390.
33. Elton J. Controlled of Intravenous Penicillin for severe and Late Leptospirosis. Lancet 1990. 3:220-224.

XII. ANEXOS

TABLE 1. Serogroups and some serovars of
L. interrogans sensu lato

Serogroup	Serovar(s)
icterohaemorrhagiae,	Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe
Hebdomadis	hebdomadis, jules, kremastos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	pyrogenes
Bataviae	bataviae
Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Canicola	canicola
Australis	australis, bratislava, lora
Pomona	pomona
Javanica	javanica
Sejroe	sejroe, saxkoebing, hardjo
Panama	panama, mangus
Cynopteri	cynopteri
Djasiman	djasiman
Sarmin	sarmin
Mini	mini, georgia
Tarassovi	tarassovi
Ballum	ballum, aroborea
Celledoni	celledoni
Louisiana	louisiana, lanka
Ranarum	ranarum
Manhao	manhao
Shermani	shermani
Hurstbridge	hurstbridge

Tabla 1. Serogrupos y algunos serovares de *L. interrogans*.

Anexo 2

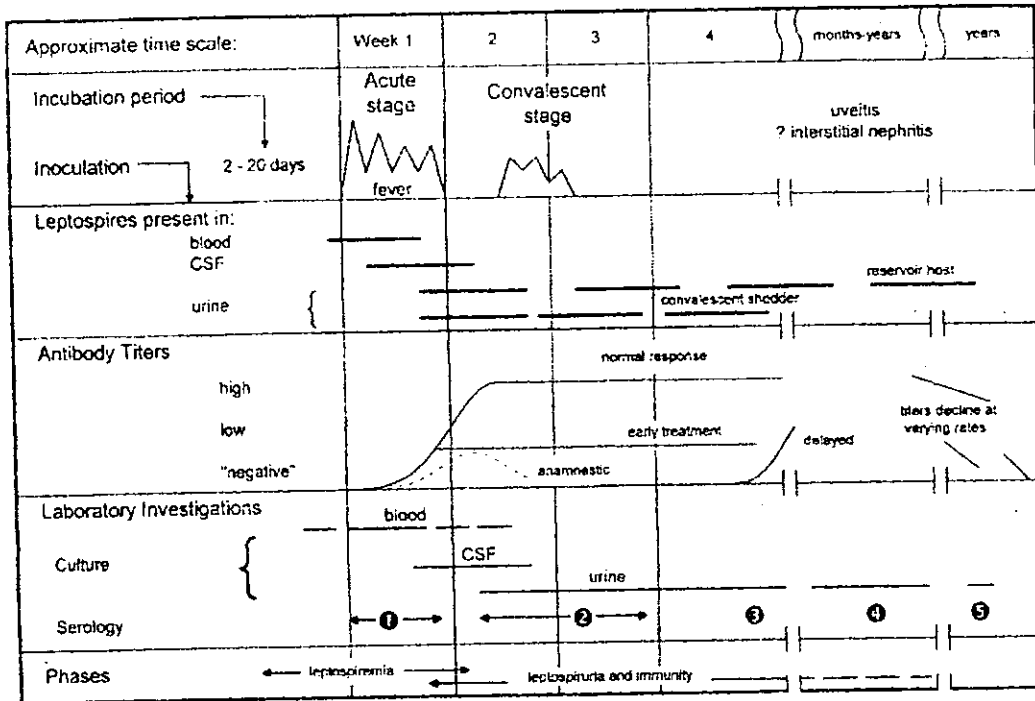


FIG 1. Naturaleza bifásica de la leptospirosis e investigaciones relevantes de los diferentes estadios de la enfermedad. Las muestras 1 y 2 para serología son de fase aguda. La muestra 3 es de la fase convaleciente el cual podría facilitar la detección de una respuesta inmune tardía, las muestras 4 y 5 podrían proporcionar información epidemiológica, tal como el serogrupo presuntamente infectivo.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
CENTRO DE INVESTIGACIONES CENTRAL

Anexo 3

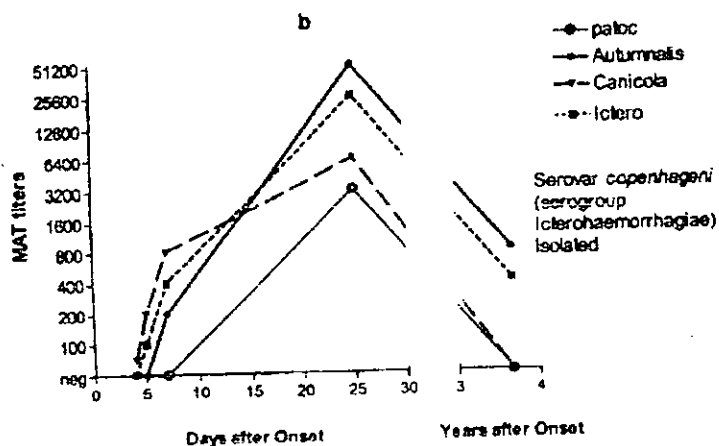
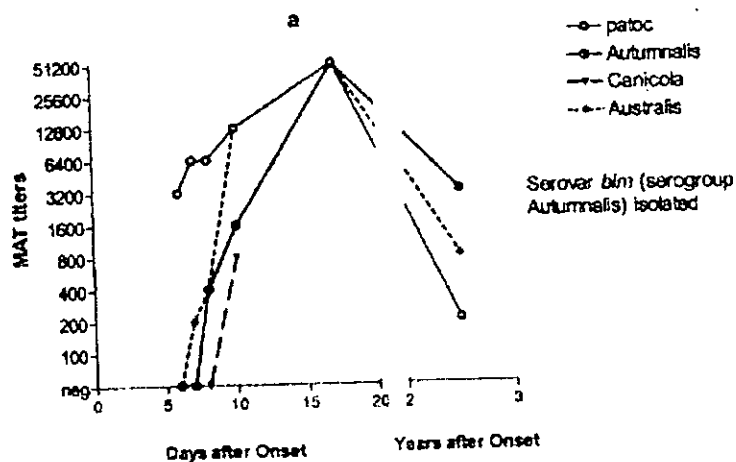


FIG 2. Respuesta inmune Paradójica de infección aguda con el serovar *bim*, en el cual el presuntivo serogrupo (*Autumnalis*) fue identificado en la gráfica de arriba (a), y *copenhageni*, en el cual el serogrupo *Icterohaemorrhagiae* nunca fue identificado como grupo predominante (b) (6).

MÉTODOS SEROLÓGICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS
FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO
LISIS DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS
AGLUTINACIÓN MACROSCOPICA EN LAMINA
INMUNOFLUORESCENCIA
TEST DE AGLUTINACIÓN PATOC EN LAMINA
HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA
INMUNOELECTROFORESIS CUANTITATIVA
ELISA
AGLUTINACIÓN MICROCAPSULA
DOT-ELISA
IgM DIPSTICK
AGLUTINACIÓN EN LATEX-

Tabla 2. Métodos género-específico para el diagnóstico de leptospirosis.

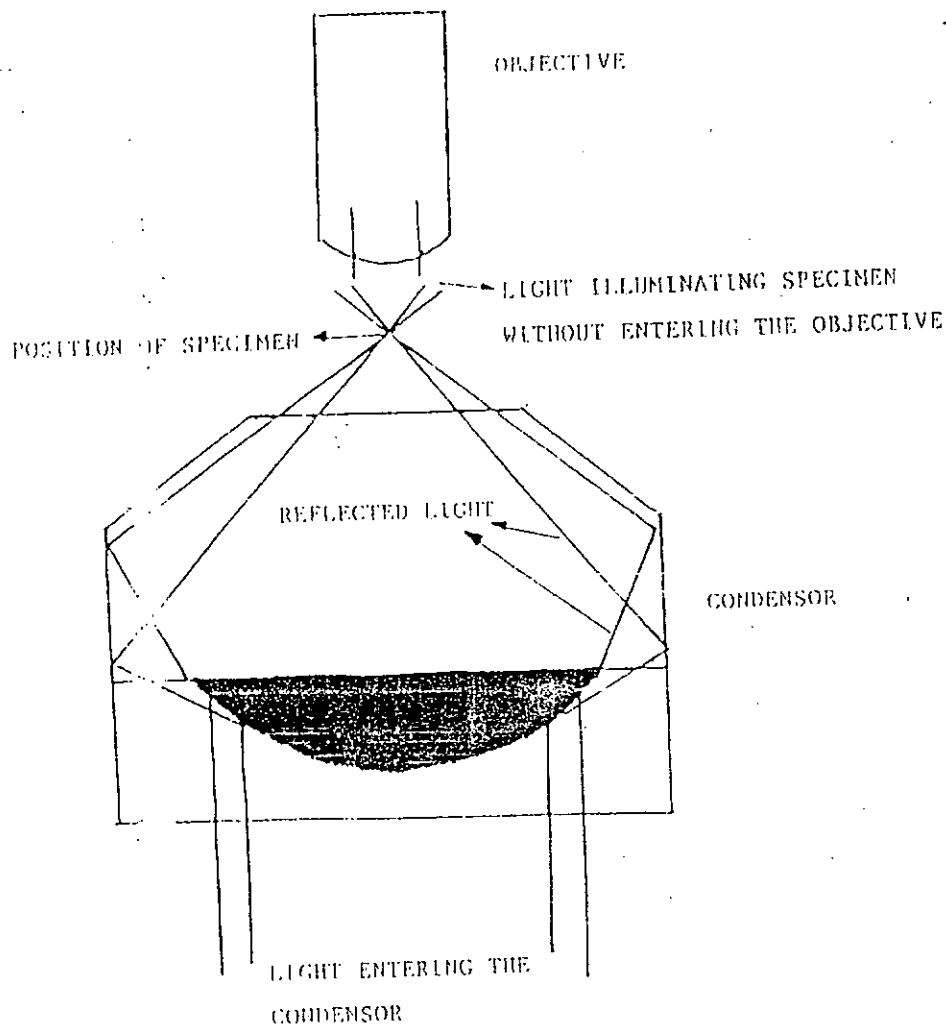
10.3 DARK FIELD MICROSCOPY

Direct dark-field microscopy as a diagnostic tool ?


This technique is described in textbooks as a useful method of demonstrating leptospire in fluids but this technique has sometimes proved to be doubtful even in the hands of very experienced staff.

There are too many serum protein and cell debris artifacts which may resemble intact leptospire, while in the urine of man and animals the concentration of organisms is frequently too low to be detectable by this method.

One needs to have a lot of experience to conclude if what is seen under the microscope are really leptospire. Therefore, care and great experience are necessary to avoid e.g. mistaking proteinaceous strands in blood for leptospire. Leptospire may be concentrated by differential centrifugation but the percentage of positive observations remains low. Direct microscopy of blood is not recommended as a routine procedure.



PRINCIPLE OF DARK-FIELD MICROSCOPY: Only reflected light "hitting" the microscope organism will enter the objective.



BIOMÉRIEUX

LeptoTek Dri-Dot

A *Leptospira*-specific immunoassay for use on human serum samples
Instructions for use.

1. Intended use

The LeptoTek Dri-Dot assay has been developed in collaboration with The Royal Tropical Institute in Amsterdam for rapid screening for leptospirosis. The assay is aimed at the detection of *Leptospira*-specific antibodies in human sera.

2. Introduction

Leptospirosis is a zoonosis caused by pathogenic species of *Leptospira*. Manifestations of leptospirosis range from relatively mild influenza-like symptoms to severe disease with renal failure, liver impairment and haemorrhages (Weil's syndrome). Meningismus and (aseptic) meningitis may be observed. Because signs and symptoms may resemble those of many other infectious diseases including viral haemorrhagic fevers e.g. Dengue fever, laboratory confirmation is required. The LeptoTek Dri-Dot is a simple assay for the detection of *Leptospira*-specific antibodies in human sera. The assay requires no special equipment and results are obtained within 30 seconds. The ingredients are highly stable and can be stored at room temperature. Compared with the microscopic agglutination test, which is considered to be the reference test for leptospirosis, the LeptoTek Dri-Dot assay has an overall sensitivity of 90% and an overall specificity of 92%.

3. Principle

The LeptoTek Dri-Dot consists of coloured latex particles activated with a broadly reactive *Leptospira* antigen that is dried onto an agglutination card. The assay is based on the binding of *Leptospira*-specific antibodies, present in the serum sample, to the *Leptospira* antigen causing a fine granular agglutination that tends to settle at the edge of the droplet (positive result). The broadly reactive antigen allows the detection of *Leptospira* infections caused by a wide range of strains of different serovars. When no specific antibodies are present the blue suspension will remain homogeneous (negative result).

4. Test kit

Each test kit contains 30 individual wrapped and sealed Dri-Dot cards containing a blue test dot, and 33 spatulas for the analysis of 30 serum samples.

5. Utensils (not provided)

1. 10µl micropipet.
2. Disposable pipet tips.

6. Storage

For optimal performance Dri-Dot cards should be stored at +2° C to +45° C, in a dry place and protected from direct exposure to sunlight.

7. Expiry date

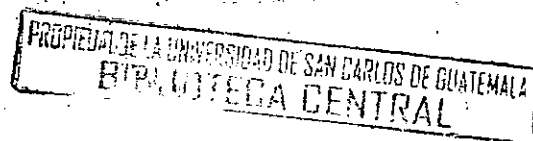
The ingredients expire on the date printed on the box.

8. Precautions

Blood and serum samples should be handled carefully as they are potentially infectious. Equipment and supplies for specimen handling should be treated accordingly. Serum samples which have been heat-inactivated (56° C, 30 minutes) may be used, as heat treatment does not affect the results of the assay. Used Dri-Dot cards, disposables and samples should be properly decontaminated and discarded.

9. Specimen collection

Serum should be prepared in the same way as routinely performed for any serological assay. Freshly collected samples should be used. Samples stored at -20° C may be used as well.



LeptoTek Dri-Dot

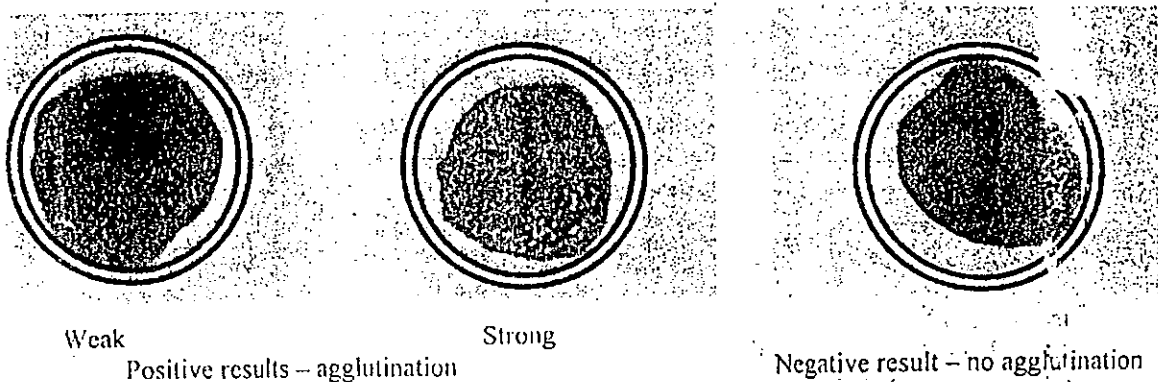
10. Standard assay procedure

1. Remove a Dri-Dot card from the packaging and place the card on a bench top with the blue dot facing upwards.
2. Spot 10µl serum next to the blue dot and within the area marked by the black circle.
3. Break off a spatula and hold with the flat surface facing downwards. Hold the spatula with thumb and forefinger close to the flat end of the spatula. Suspend the blue dot in the serum with a quick circular motion while pressing the flat end of the spatula onto the dot. Do not spread the suspension outside the area marked by the black circle. Proceed with the next step when the blue dot is fully suspended and a homogeneous suspension is obtained.

Notes:

1. Suspending of the blue dot with the spatula should only take a few seconds.
2. The suspension should not be spread outside the area marked by the black circle, as spreading over a large surface will hamper the mixing procedure.
4. Keeping the card near horizontal, slowly rotate the card swirling the liquid in a circular motion in order to further mix latex and serum sample and to induce agglutination.
5. Read result within 30 seconds after start of mixing.

Note: Always read the result within 30 seconds, otherwise false results may occur.



11. Interpretation of test results

Aggregation of the latex particles of the test dot reveals agglutination by *Leptospira*-specific antibodies present in the serum samples. The degree of agglutination depends on the amount of specific antibodies in the sample which is relative to the stage of the disease as well as on other factors. The sensitivity of the assay is highest for samples collected 10 to 30 days after the onset of the disease. Strong agglutination visible within 30 seconds is highly consistent with current or recent leptospirosis. As antibodies reach detectable levels about one week after the onset of the disease, a serum sample collected very early in the disease may fail to cause agglutination in this assay. If the assay performed on a serum sample collected in the early phase of the disease is negative, and suspicion of leptospirosis remains, it is advised to examine a second sample collected some days after the first sample. As with any diagnostic assay, results from the LeptoTek Dri-Dot should be interpreted with consideration of the clinical, epidemiological and other laboratory findings.

12. Limitations of use

1. It is advised that the microscopic agglutination test is used as a confirmatory test.

13. Further reading of suggested literature

1. W.J. Terajstra, G.S. Lighthart and G.J. Schoone. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J. Gen. Microbiol.* 131 (1985) 377-385.
2. Turner, L.H. Leptospirosis II: serology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62 (1968) 880-899.
3. Farr, R.W. Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 21 (1995) 1-8.

Further information is available on request from:

bioMérieux bv

Boscind 15

5281 RM Boxtel

The Netherlands

www.biomerieux.com or email to infoleptotek@na.biomerieux.com

May 2002

Rev 0

AMICO LABORATORIES INC.
 P. O. Box 90203
 Nashville, TN 37209
 Phone: (615) 385-7711, FAX: (615) 385-3114
 e mail: amicolabs1@aol.com
 Website: www.amicolabs.com

LEPTOSPIROSIS IGM ANTIBODY TEST

Catalog #: 9200MT

INTENDED USE

Leptospirosis is an acute, febrile disease attributable to any of the several serovars of *Leptospiras*. Humans acquire the organism by exposure to either direct contact with urine of infected animals or water or soil contaminated with the urine of infected animals. The Leptospiral IgM test is intended for the detection and semi-quantitation of Leptospiral IgM antibodies in human serum by an Enzyme Immunoassay.

SUMMARY

Leptospiras occur naturally in a wide variety of animals. In the natural host the spirochetes lodge in the kidneys and are shed in urine. Clinical manifestations of leptospirosis can include aseptic meningitis, icteric-hemorrhagic form with severe involvement of the kidney and liver.

PRINCIPLE OF THE TEST

Patient sample are diluted and added to antigen-coated microtiter wells. IgM antibodies, if present, they will bind to the antigen to form an antigen-antibody complex. After incubation and washing, a Horseradish Peroxidase (HRP) labeled goat anti-human IgM is added and the wells incubated further. At the end of the incubation, wells are washed and then an Enzyme substrate (TMB) is added to the wells. Appearance of a bluish color is indicative of the presence of IgM antibodies in the serum sample. The blue color is due to the hydrolysis of the substrate by the enzyme. The enzyme reaction is stopped by the addition of Stop Reagent, which will turn the color from blue to yellow.

MATERIALS PROVIDED

- One (12x8-well strip) plate coated with antigen
- One Vial (0.2 MI) Positive control
- One Vial (0.2 MI) Negative Control
- One Vial (11 MI) HRP anti-IgM Conjugate-Ready to Use
- One Vial (25 MI) IgM Serum Diluent-Ready to Use
- One Vial (11 MI) TMB Ready to Use
- One Vial (15 MI) Wash Buffer concentrate to be diluted to 600 MI with water giving 0.01 M Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4
- One Vial (7 MI) Stop Reagent-H₂SO₄
- One insert

For In Vitro Diagnostic Use Only

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Pipets, pipet tips Microplater Reader equipped with a 450 nm filter and other glassware.

Precautions

1. Human components and materials coming in contact with them must be handled as if capable of transmitting disease. They should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended by CDC/National Institutes of Health Manual

"Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984 as a potential source of infection.

2. Human components of the kit have been tested by FDA approved tests for HBsAg, HCV and HIV and found negative. This is no assurance that such infectious agents are absent. Dispose of properly by sterilization or disinfection.
 3. All components of the kit contain EXCEPT the Enzyme antibody conjugate, the enzyme substrate and the wash buffer Concentrate. Sodium azide is toxic if ingested and forms explosive metal azides if disposed of into the plumbing system. If such disposal occurs flush system with large amounts of water
 4. Do not use reagents beyond their expiration date
 5. Do not mix components of other kits or manufacturers
 6. NEVER pipet by mouth
 7. Avoid microbial contamination as erroneous results occur
- ### SPECIMEN COLLECTION
- Clear serum is essential in serological tests. Use of contaminated specimens should be avoided. specimens should be stored at 2-8C and tested within 5 days otherwise store at -20C or colder.
- ### STORAGE AND STABILITY
- Amico Amizyme test Kits are stable for 1 year if properly stored at 2-8C
- ### QUALITY CONTROL
- Positive and Negative Controls should be run in parallel with patient specimens. Proper washing and draining of wells is essential for proper Elisa results
- NOTE: SHOULD THE POSITIVE AND NEGATIVE CONTROLS GIVE A450 VALUES THAT ARE DIFFERENT FROM THOSE INDICATED IN INTERPRETATION OF TEST RESULTS, IT COULD BE DUE TO VARIATION IN ELISA READERS OR THE WATER USED TO RECONSTITUTE THE WASH BUFFER CONCENTRATE. SHOULD THIS BE THE CASE PLEASE USE THE A450 VALUES FOR POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS AS INDICATED IN INTERPRETATION OF TEST RESULTS.**
- ### TEST PROCEDURE
1. Reconstitute the ash buffer Concentrate by diluting contents of vial to 600 MI of water
 2. Bring all reagents to room temperature prior to use
 3. Prepare 1:50 Dilution of patient specimen, Positive and Negative Controls by mixing 5 ul of specimen and controls with 245 ul of PBS
 4. Add 100 ul of patient specimen to one well, to another well add 100 ul of Negative Control. To each of three separate wells add 100 ul of Positive control
 5. Incubate wells at room temperature (20-30C) for 25 minutes
 6. Shake out contents of wells, wash wells by filling with PBS.. Repeat 3X. Blot by inverting wells onto paper towels, tap 3X.
 7. Add 100 ul of HRP anti-human IgM conjugate to each well
 8. Incubate at room temperature for 25 minutes
 9. Repeat step 6 above
 10. Add 100 ul of TMB to each well and incubate at room temperature for 10 minutes
 11. Add 50 ul (one drop) of Stop Reagent to each well

12. Set Reader at 450 nm, blank on air, read results within one hour

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

Lower Absorbance (A450) Limit of Positive Results is equal to the Mean (X) of the A450 Value of the three Positive control wells. Specimens giving A450 values $\geq X$ are considered Positive

Upper Absorbance (A450) Limit of Negative Results Y is determined by multiplying (X) by 0.9. Specimens giving A450 values $\leq Y$ are considered Negative

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

A450 of Specimen

Result

$\geq X$

Positive

$> Y$ but $< X$

Equivocal Repeat test

$\leq Y$

Negative

A450 of Specimen

Result & Significance

≥ 1.000

Positive may suggest previous exposure

0.900-0.999

Equivocal, Repeat test

≤ 0.899

Negative may suggest susceptibility

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

Result Significance

Positive Indicates previous/current exposure to Leptospiras

Negative May indicate susceptibility to leptospirosis, or specimen taken too late to detect IgM antibodies. Another sample taken 2-3 weeks later and tested

simultaneously with the first one to demonstrate a 4-fold rise in antibody titer

Test Limitations

Test results should not be used as the only criteria for diagnosis. These results will serve only as an aid in the diagnosis. This test is not intended to replace isolation of the agent.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

One hundred thirty specimens were tested by the Amizyme Leptospiras IgM test and by IFA

Specimen Leptospira IgM/EIA Leptospira IgG/IFA

	(-)	(+)	(-)	(+)
150	145	5	146	4

Relative Sensitivity: 99%

Relative Specificity: 99%

EXPECTED VALUES

Leptospirosis is endemic in Southeast Asia, but essentially non-existent in the United States. Thus high background levels of IgG antibodies may be present in the serum of individuals living in endemic areas and low levels, if any, of IgM antibodies.

BIBLIOGRAPHY

1. Abdusalam, M. et al, Research Needs in Leptospirosis. Bull. W. H. O. 47:113, 1972

**FICHA EPIDEMIOLOGICA SOBRE LA INCIDENCIA DE LEPTOSPIROSIS EN
PACIENTES QUE ASISTEN A LA EMERGENCIA DEL HOSPITAL GENERAL
SAN JUAN DE DIOS**

Nombre del paciente: _____

Edad: _____

Género: 1. Masculino

2. Femenino

Donde Nació:

Departamento _____

Municipio _____

Comunidad _____

Donde Vive:

Departamento _____

Municipio _____

Comunidad _____

Dirección: _____ Número de teléfono _____

Motivo de consulta (ver ficha clínica) _____

Ocupación _____

(si su ocupación no es agricultor pasar a la # 4)

1. Qué es lo que cultiva? _____

2. Existe alguna poza de agua cerca del lugar donde cultiva? 1. Si 2.No

3. El agua de la poza tiene algún contacto directo con el producto que cosecha? 1. Si 2. No

4. Es frecuente que existan inundaciones en el lugar donde trabaja? 1. Si 2. No

5. Es frecuente que existan inundaciones en el lugar donde vive? 1. Si 2. No

Anexo 8

No. Estudio
No. Registro

6. Qué servicios básicos tiene en su casa?
1. Agua potable _____
 2. Luz eléctrica _____
 3. Drenajes _____
 4. Letrina _____
 5. Inodoro _____
 6. Recolección de basura _____
 7. Otros. Especifique _____
7. Existe un basurero público cerca del lugar
donde vive? 1. Si 2. No
- A que distancia _____
8. De dónde obtiene el agua para beber?
1. Chorro _____
 2. Pozo _____
 3. Río _____
 4. Lago _____
 5. Otros. Especifique _____
9. Trabaja con animales? 1. Si 2. No
1. Cerdos _____
 2. Vacas _____
 3. Perros _____
 4. Ratas _____
 5. Otros _____
10. Tiene mascotas en su casa? 1. Si 2. No
1. Perros _____
 2. Gatos _____
 3. Ratas _____
 4. Conejos _____
 5. Otros _____
11. Ha padecido de alguna enfermedad del hígado? 1. Si 2. No
12. Qué enfermedad? _____
13. Se ha puesto de color amarillo? (ictérico) 1. Si 2. No

FIB

Anexo 8

No. Estudio
No. Registro

14. Ha tomado algún medicamento que le halla puesto
la piel de color amarillo? 1. Si 2. No
15. Ha padecido de dengue? (fiebre quebranta huesos) 1. Si 2. No
16. Ha padecido de paludismo? (malaria) 1. Si 2. No
17. Desde hace cuántos días se siente mal? _____ días
18. Ha tenido temperatura? (fiebre) 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
19. Ha tenido dolor en sus articulaciones? 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
20. Ha tenido dolor de cabeza? 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
21. Ha tenido manchas rojas? (Petequias) 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
22. Ha tenido diarrea? 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
23. Ha tenido ronchas en la piel? (Erupciones, rash) 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
24. Ha padecido de conjuntivitis? 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____
25. Ha tenido vómitos? 1. Si 2. No
Desde hace cuantos días _____

Anexo No. 8

No. Estudio
No. Registro

26. Ha tomado alguna medicina desde que se empezó
a sentirse mal?

1. Si

2. No

Cuales: _____

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

Nombre del estudio: Comparación de 3 métodos (campo oscuro, aglutinación en látex y ELISA), para el diagnóstico de Leptospirosis en pacientes que asisten a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios.

La Leptospirosis o Enfermedad de Weil es una enfermedad que ataca animales (reservorios) y humanos. Es causada por la bacteria *Leptospira interrogans* por los hallazgos clínicos se puede confundir con una infección de tipo viral o parasitaria como malaria o paludismo, si no es tratada puede causar hepatomegalia y fallo renal. De ahí es la importancia de su diagnóstico.

Yo, _____ estoy de acuerdo en participar voluntariamente en este estudio cuyo objetivo es comparar tres métodos para el diagnóstico de Leptospirosis y se que toda la información obtenida será confidencial. Entiendo también que se me harán algunas preguntas para tratar de determinar la causa de mi enfermedad, las cuales responderé libremente. También se utilizará la información del laboratorio sobre las muestras de sangre. La sangre será extraída del brazo y sentiré un pequeño pinchón y es probable que se me forme un morete pequeño el cual no causará ningún tipo de dolor a menos que haga un esfuerzo grande, éste durará de uno a dos días.

Me comprometo a regresar al hospital a la semana siguiente para que me extraigan otro poco de sangre y es probable que vuelva a sentir las molestias anteriormente mencionadas. Se que me beneficiaré con mi participación ya que obtendré un mejor diagnóstico y por lo tanto un mejor tratamiento. Por participar en el estudio no recibiré remuneración económica alguna.

Se que si tuviera alguna duda con respecto al estudio y a ésta enfermedad, estoy en la libertad de discutirla con los responsables del estudio, la Lic. Denny Guarán y el Br, Jorge Orantes, en el hospital o al teléfono 204-9479, quienes estarán disponibles mientras dure el estudio.

Fecha: _____

Nombre Completo: _____

Identificación No. _____

Firma: _____

Lugar: _____

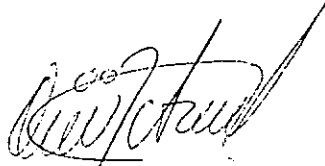
Investigador:

Nombre: _____

Firma: _____

SANGRE	SUERO
HEMATOLOGIA COMPLETA FROTES PARA EVALUAR PRESENCIA DE PLASMODIUM	PRUEBAS BIOQUÍMICAS: Perfil Hepático: ALAT, ASAT, FTA, BBSS Perfil Renal: BUN, Creatinina.
	PRUEBAS SEROLÓGICAS: Leptospirosis (aglutinación en latex, ELISA) Hepatitis A Hepatitis B Hepatitis C Mononucleosis Infecciosa Dengue Citomegalovirus

Tabla 3. Listado de pruebas que se le realizaron a los pacientes del estudio.



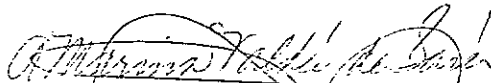
Jorge Antonio Orantes Peñate
Autor



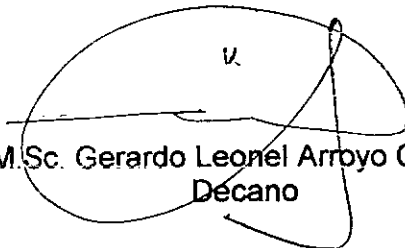
Licda. Denny Guarán Mijangos
Asesora



Lic. Martín Gil Carrera
Revisor



Licda. Alba Marina Valdés Ruiz de García
Directora



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano