


DL  
06  
+(2662)

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a king on horseback, holding a staff. Above the king is a crown with two keys. To the left and right of the king are two lions. The seal is surrounded by the Latin text "CAETERA ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER".

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LEPTOSPIRA EN DONADORES  
DE SANGRE DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS

Informe de Tesis

Presentado por

SARA VIRGINIA GALINDO BARRIENTOS

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, Abril de 2008

## JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

## ACTO QUE DEDICO A

**Dios y mis  
benditos  
padres internos**

Por la maravillosa vida que me han permitido tener y llegar el día de hoy a culminar esta meta

**Mis padres:  
Gladis y Jorge**

Por su amor, guía, apoyo en todo momento y ser el mejor ejemplo en mi vida

**Mis hermanos:**

Astrid, Andrés, Teresa, Mayevi, Laura. Por el amor que siempre tienen para mí

**Luis Ignacio  
Leal Hernández:**

Por compartir conmigo y brindarme su amor siempre a través del tiempo y la distancia

**Abuelita Coni<sup>†</sup>:**

Por dedicarme su amor, paciencia y enseñanzas durante 18 años de su vida.

**Abuelos  
Alicia y René<sup>†</sup>:**

Por su amor y cariño a lo largo de mi vida

**Familia:**

Tías, tíos, primas, primos, sobrinos.

**Amigos:**

*Por compartir conmigo este momento*

## AGRADECIMIENTOS A

### Asesoras

**Licda. María Luisa  
García de López, Licda.  
Leticia Castillo** Por confiar en mí para llevar a cabo este  
proyecto.

**Licda. Shirley Sikahall  
Prado:** Por su amistad, apoyo y dedicación puesta  
durante la realización de este trabajo.

**Depto. de Virología, LNS:** Por el apoyo brindado a lo largo de la  
ejecución de esta investigación

**Depto. de Microbiología,  
FCCQQ y Farmacia:** Por el apoyo brindado a lo largo de la  
ejecución de esta investigación

**Dra. Blanca Zelaya de  
Romillo,  
Depto. de Microbiología,  
FMVZ:** Por el apoyo brindado a lo largo de la  
ejecución de esta investigación

**Revisoras  
Licda. Alba Marina  
Valdés  
Licda. Amanda Galvez:** Por su colaboración en la revisión de este  
trabajo

**Catedráticos:** Por las enseñanzas brindadas durante mi  
formación educativa

## ÍNDICE

I. RESUMEN -----	1
II. INTRODUCCIÓN -----	2
II. ANTECEDENTES -----	3
A. Generalidades-----	3
B. Agente etiológico-----	4
C. Epidemiología y distribución -----	5
D. Reservorio -----	11
E. Mecanismos de infección -----	11
F. Hallazgos patológicos y patogénicos -----	12
G. Manifestaciones clínicas -----	16
H. Diagnóstico -----	21
I. Tratamiento -----	28
J. Medidas de Control y prevención -----	30
III. JUSTIFICACIÓN -----	32
IV. OBJETIVOS -----	33
V. HIPÓTESIS -----	34
VI. MATERIALES Y MÉTODOS -----	35
VII. RESULTADOS -----	43
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	44
IX. CONCLUSIONES -----	48
X. RECOMENDACIONES -----	49
XI. REFERENCIAS -----	50
XII. ANEXOS -----	54

## I. RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis de amplia distribución mundial causada por *Leptospira interrogans* en la cual el hombre se infecta de manera accidental. En Guatemala no existen estudios epidemiológicos que permitan conocer el comportamiento ni el impacto y magnitud de la enfermedad.

El presente estudio tuvo como objetivos determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en donadores de sangre del Hospital General San Juan de Dios, así como demostrar la circulación y frecuencia de los diferentes serogrupos de *Leptospira* sp. por medio de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT).

Se analizaron 140 muestras de suero, de las cuales 18 (12.86%) fueron reactivas frente a uno o más de los diez serogrupos de *Leptospira* utilizados como batería de antígenos vivos para llevar a cabo la prueba de MAT.

El grupo de edad más afectado fue el de personas de 20 a 40 años (88.89%). En el grupo de mayores de 40 años se encontraron dos casos del sexo femenino que corresponden al 11.11%. No se obtuvo casos en el grupo de menores de 20 años.

Los serogrupos de *L. interrogans* que se encuentran circulando dentro de la población en estudio son Icterohaemorrhagiae, (27.27%) Hebdomadis, (27.27%) Sejroe, (18.18%) Canicola, (13.64%) Bataviae (13.64%). Además, se obtuvieron muestras que reaccionaron frente a dos o más serogrupos.

Los resultados obtenidos demuestran que *L. interrogans* se encuentra circulando en el país y que esta enfermedad es más frecuente de lo que se sospecha.

## II. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis que se presenta en áreas urbanas y rurales, en todas partes del mundo tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados (1,2). Anteriormente era considerada una enfermedad ocupacional centrada en individuos que trabajan en campos de arroz, de caña de azúcar, productores de leche, mineros, etc. Estudios actuales demuestran que esta enfermedad puede ser adquirida por personas ajenas a estos grupos ya que se ha observado en amas de casa, profesionales y niños. Además, se sabe de un riesgo recreativo: se ha observado en personas dedicadas a la natación y en otras que han tenido contacto con aguas y suelos contaminados (3-6).

El hombre se infecta de manera accidental al entrar en contacto con superficies, aguas u orina o tejidos de animales infectados (7). Las leptospiras penetran por las mucosas o lesiones en la piel; producen manifestaciones clínicas muy variadas e inespecíficas que dificultan su diagnóstico; por ello, la leptospirosis resulta ser más frecuente de lo que se estima (1, 6, 7).

El presente es un estudio descriptivo en una población asintomática, que cumple con el criterio de ser clínicamente sana. Se analizaron sueros del banco de sangre del Hospital General San Juan de Dios; se utilizó la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT), método de referencia para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* tipo IgM e IgG. Cada muestra fue enfrentada a una batería de antígenos vivos constituida por diez serogrupos de *Leptospira*, para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*, con el objetivo de demostrar el contacto con este agente causal y determinar la frecuencia de los distintos serogrupos, información esencial para realizar estudios epidemiológicos en Guatemala.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, con presentación ocasionalmente epidémica, que depende de factores exógenos como el clima, la constitución del suelo y la exposición del hombre al contacto directo o indirecto con los reservorios naturales (7, 8). Es conocida como enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, entre otros (9).

La leptospirosis se considera la zoonosis de mayor diseminación a escala mundial, con mayor frecuencia en los países tropicales, que afecta más de 160 especies de animales salvajes y domésticos; los cuales constituyen el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Las especies más afectadas son los roedores y los animales domésticos, especialmente el perro, el ganado bovino y porcino. Como consecuencia de la infección, las leptospiras colonizan los túbulos renales de los reservorios y se eliminan por la orina. De esa manera caninos, bovinos y porcinos se convierten en portadores urinarios transitorios y los roedores en portadores urinarios permanentes (8, 10, 11).

En la reemergencia de enfermedades como la leptospirosis intervienen numerosos factores ambientales como los cambios climáticos (en particular las intensas lluvias), el crecimiento demográfico sin saneamiento, con urbanización descontrolada hacia zonas periféricas, los criaderos clandestinos de animales, la construcción de viviendas precarias en terrenos inundables que trasladan la presencia de las leptospiras a zonas suburbanas e incluso urbanas (8).

La leptospirosis se presenta con amplia variedad de manifestaciones clínicas; por lo que se considera que su frecuencia es mayor de lo que se registra (4, 6). Dichas manifestaciones van desde un aparente resfriado hasta



una enfermedad icterica que afecta hígado y riñón. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, cefalea, escalofríos, hiperestesia cutánea, mialgias intensas en pantorrillas, región lumbar y muslos. A esto se agregan trastornos gastrointestinales (náusea y vómito), tos o faringitis, linfadenopatías, hepatomegalia, exantemas, ictericia y hemorragia gastrointestinal; por ello se le conoce como la gran simuladora (1, 10, 12).

#### **A. Agente etiológico**

El agente etiológico de la leptospirosis pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira* que comprende básicamente dos especies: *L. interrogans*, patógena para los animales y el hombre y *L. biflexa*, que es de vida libre (2, 13, 14).

*Leptospira* es una bacteria muy delgada, de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y 0.1 a 0.2  $\mu\text{m}$  de ancho, de gran movilidad debido a un axostilo, es Gram negativo, aerobia estricta, de forma helicoidal con una o ambas extremidades curvas, en forma de gancho. Puede sobrevivir tiempo prolongado, en el agua o en ambiente húmedo o templado, con pH neutro o ligeramente alcalino. A diferencia de otras espiroquetas se cultiva bien en medios artificiales (Fletcher, Stuart, EMJH) (2, 7, 13, 14).

Debido a la semejanza de las propiedades morfológicas y de cultivo de las leptospiros, la clasificación de los aislamientos depende de las características serológicas. Este tipo de clasificación se basa en propiedades bioquímicas como la aglutinación con antisueros específicos para cada serovar producidos por animales infectados por esta bacteria. El taxón base es el serovar y debido a la similitud entre sus antígenos se han reunido en serogrupos (14, 15).

La membrana externa de *Leptospira* contiene lipoproteínas de membrana OMPs (outer membrane proteins), las cuales son altamente inmunogénicas y

responsables del serovar específico. Los serogrupos incluyen conjuntos de serovares relacionados por reactividad antigénica cruzada (3, 16).

Los estudios moleculares taxonómicos han demostrado un alto nivel de heterogeneidad genética dentro de las especies tradicionales *L. interrogans* y *L. biflexa* (7). Esto ha permitido desarrollar el sistema taxonómico filogenético mediante el cual se han logrado diferenciar 10 especies patógenas y 5 no patógenas (7, 16).

Dentro de las especies patógenas se encuentran *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. weilii* y en las especies saprófitas, *L. biflexa*, *L. genomospecies*, *L. wolbachii*, *L. parva* y *Leptonema illini* (7).

## **B. Epidemiología y distribución**

La leptospirosis es una zoonosis reemergente de amplia distribución mundial con comportamiento endémico (17, 18).

La infección ocurre en determinadas áreas geográficas; las de mayor incidencia se encuentran en países cálidos o templados durante las estaciones lluviosas (16). Anteriormente estaba vinculada con actividades ocupacionales: trabajadores de alcantarillados, arrozales y campos de caña de azúcar; granjeros, mineros, empleados de mataderos, criadores de animales y médicos veterinarios (3, 4).

Actualmente este concepto ha cambiado ya que la enfermedad se ha observado en personas ajenas a estos grupos: niños, amas de casa, estudiantes, profesionales y turistas (5, 6). Además, representa un peligro para bañistas, deportistas y personas que acampan en zonas infectadas al estar en contacto con

aguas contaminadas (3, 4). La incidencia de la enfermedad es mayor en adultos jóvenes del sexo masculino comprendidos entre los 20 y 40 años (16, 19).

Las condiciones epidemiológicas de la transmisión de *Leptospira* pueden ser modificadas por diversos desastres naturales como huracanes, al incrementar o cambiar la población de roedores; la importación de nuevas especies a un país o al modificar las actividades ocupacionales o recreativas (15).

El número de casos reportados en el mundo entero no es preciso pero se calcula que la incidencia se encuentra en un rango de 0.1 – 1 personas por 100,000 personas al año en climas templados y de 10 a 100 personas por 100,000 en países cuyo clima va desde húmedo hasta tropical (12).

Los serovares de *L. interrogans* más comúnmente encontrados en humanos alrededor del mundo han sido Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canícola, Sejroe, Tarassovi y Bataviae (13).

En 1917 se realizó en Japón el primer aislamiento en humanos; era un paciente con ictericia y manifestaciones hemorrágicas; razón por la cual se le llamó *icterohaemorrhagiae*. A partir de entonces, diferentes grupos de investigadores han reportado trabajos epidemiológicos sobre esta enfermedad (2, 6).

En Chile, por medio de una encuesta serológica realizada en 1990 en trabajadores de alto riesgo ocupacional (en cultivos de arroz, mataderos y agropecuarios), se encontró un 22% de infección por *Leptospira interrogans*. Esta encuesta que utilizó la técnica de aglutinación microscópica (MAT), indica que existe una amplia difusión en el ámbito ocupacional (4).

En 1994 en la península de Yucatán (México) se presentó una epidemia de dengue y con el fin de demostrar la presencia de la leptospirosis en esa región, se analizaron 100 sueros conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por medio de la prueba MAT. Los sueros se obtuvieron durante la fase aguda y de convalecencia de la enfermedad de 50 pacientes con pruebas negativas para dengue; de las muestras analizadas, 14% (7 muestras) resultaron positivas a *Leptospira interrogans* serovares Canícola (3 pacientes en Yucatán) y Pomona (4 pacientes en Campeche). Los resultados obtenidos demuestran la importancia del diagnóstico diferencial entre ambas patologías, sobre todo en zonas geográficas donde sean endémicos los dos padecimientos (18).

Entre 1997 y 1998 se realizó un estudio transversal con el objetivo de estimar la prevalencia de la infección por *L. interrogans* en 23 granjas del municipio Don Matías, Colombia. Se obtuvieron muestras de sangre de 67 operarios de lechería y porcicultura, 174 vacas en producción, 68 cerdos de ceba y 214 de cría. Se empleó la prueba de MAT para seis serotipos de *L. interrogans*. La prevalencia de individuos seropositivos fue de 22.4% en los operarios, 60.9% en las vacas en producción, 10.3% en los cerdos de ceba y de 25.7% en los cerdos de cría. Los serovares encontrados fueron Pomona, Bratislava y Hardjo (20).

Debido a que en el período de octubre de 1998 a enero de 1999 el Hospital Veterinario de Río Grande do Sul, Brasil reportó un brote de leptospirosis ocupacional, se analizaron 37 muestras de suero por medio de la prueba de MAT. De ellas 32 (86.5%) fueron muestras positivas; los seis serotipos encontrados en este brote fueron: Bratislava en 25 casos (43.1%), Australis 24 (41.4%), Patoc 5 (8.6%), Canícola 2 (3.4%), Icterohaemorrhagiae 1 (1.7%) y Pyrogenes 1 (1.7%) (19).

En Centroamérica la situación es similar: en Honduras se realizan acciones de prevención y control sólo al encontrar los brotes sospechosos. Únicamente en Costa Rica existe el Programa de Control Epidemiológico. En 1995 se reportó un brote en la región de Achuapa, Nicaragua, y por primera vez en ese lugar se estableció un programa de control epidemiológico. De este brote se reportaron 2500 casos, de los cuales 48 pacientes fallecieron. Se encontraron leptospiras en los tejidos de riñón e hígado de tres de los pacientes fallecidos. Este brote se asoció al contacto directo con agua y suelo contaminado con orina infectada después de intensos períodos de lluvia (2, 18).

En un estudio realizado en México en 1995 se demostró la presencia de *Leptospira* en una población clínicamente sana al analizar 206 sueros conservados de personas asintomáticas que asistieron al Banco de Sangre de la ciudad de México como donadores voluntarios. Estas personas cumplían con los criterios establecidos (sin antecedentes ni pruebas positivas para hepatitis, enfermedad de Chagas, mononucleosis infecciosa, SIDA ni datos de cuadros febriles cuatro semanas antes de la donación). Los resultados mostraron que 7 por ciento manifestó positividad para la prueba de MAT utilizando siete serovariedades de *Leptospira interrogans*. La distribución por serovariedad fue la siguiente: Shermani 53%, Canícola 33%, Pyrogenes 20%, Pomona 13%, Icterohaemorrhagiae 6%. La presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en esta población demuestra el contacto del ser humano con el agente infeccioso (6).

En 1980 Torres detectó y confirmó microbiológicamente el primer caso en Guatemala; el serogrupo fue confirmado en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC) y correspondía a *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (21).

A partir de 1998 el Laboratorio Nacional de Salud realiza pruebas para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* de tipo IgM. Durante ese año se

procesaron 25 muestras, 4 de las cuales fueron positivas (3 del departamento de Izabal y 1 de la ciudad capital). En 1999 se analizaron 84 casos, 10 de los cuales fueron positivos (6 de Izabal, 2 de la ciudad capital, 1 de Sacatepéquez y 1 de San Marcos).

En el año 2001 no se reportó ningún caso positivo. De 79 casos analizados en 2002, 6 resultaron positivos (3 de Guatemala, 1 de Izabal, 1 de San Marcos y 1 de Zacapa). De 150 casos analizados en 2003, 18 muestras resultaron positivas (6 en Guatemala, 5 en Zacapa, 4 en Escuintla, 2 en Izabal y 1 en Quiché).

En el 2004 fueron analizadas 138 muestras, 2 de las cuales resultaron positivas y eran procedentes de Guatemala. En el 2005 se analizaron 121 muestras, resultaron 3 positivas (1 en Escuintla, 1 en San Marcos y 1 en Guatemala). Hasta marzo del 2006 se ha reportado una muestra positiva (22).

En el 2003, Orantes realizó un estudio descriptivo transversal en 90 pacientes que ingresaron con sintomatología sugestiva de leptospirosis a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios. Su objetivo era comparar distintos métodos diagnósticos para esta enfermedad (campo oscuro y prueba de látex comparados con la prueba ELISA IgM). En el estudio se determinó una frecuencia de 73.3% de leptospirosis en los pacientes que asistieron a dicho hospital y se demostró que tanto la técnica de campo oscuro como la prueba de látex poseen baja sensibilidad y especificidad. Por lo tanto no son adecuadas para el diagnóstico de leptospirosis humana (10).

En ese mismo año, Estrada realizó un estudio descriptivo en el que se analizaron 84 muestras de sueros de pacientes con enfermedad febril que fueron referidos al Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del Área de Salud de Escuintla. Al utilizar la prueba de ELISA IgM, 8 de estas muestras 8 (9.52%) fueron positivas para leptospirosis. En el Departamento de Microbiología de la

Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala se analizaron nuevamente los sueros positivos procesados y resultaron 8 muestras positivas para *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. Con esto se confirmó el diagnóstico, y ahora dicha prueba se utiliza para tal fin (11).

En 2006 Sikahall realizó un estudio descriptivo para llevar a cabo la estandarización de la prueba MAT para el diagnóstico de leptospirosis humana. Para ello se analizaron 120 muestras de sueros distribuidas de la siguiente manera: 30 positivas para leptospirosis obtenidas en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), 30 con diagnóstico positivo de dengue proporcionadas por el Laboratorio Nacional de Salud (LNS), 30 positivas para hepatitis (B o C) obtenidas en el IGSS (estas 90 muestras de suero fueron analizadas por medio de la técnica de ELISA IgM) y 30 sueros de donadores del banco de sangre del IGSS, que actuaron como grupo control (23).

En el estudio, para el análisis de las muestras, se utilizó una batería de antígenos vivos de diez distintas serovariedades de *Leptospira interrogans*. El 25 por ciento de las muestras fue positivo con dicha metodología. Esto demuestra la importancia del diagnóstico diferencial de leptospirosis humana con enfermedades febriles como las estudiadas. Se encontró además, que 10% de los sueros positivos pertenecían al grupo control (donadores de sangre); lo que indica la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en una población clínicamente sana. La seropositividad encontrada se debe únicamente al contacto con el microorganismo (23).

La distribución de las serovariedades fue la siguiente: Icterohaemorrhagiae 63.64%, Canícola 24.24%, Pomona 6.06%, Bataviae 3.03% y Pyrogenes 3.03% (23).

### **C. Reservorio**

Los reservorios de las leptospirosis son una serie de animales salvajes y domésticos. Los animales domésticos y silvestres (bovinos, porcinos, equinos y roedores silvestres) infectados son los reservorios de mayor jerarquía en la leptospirosis rural, mientras que la rata y el perro lo son en la leptospirosis urbana (8, 9, 24, 25).

Los roedores desempeñan un papel fundamental en la transmisión de la leptospirosis, sobre todo la relacionada con las formas ictéricas y de mayor cuidado en el humano, pues no sufren la enfermedad. Albergan las leptospiras en los riñones, las eliminan vivas al medio ambiente durante tiempo prolongado y de esa manera contaminan el agua, el suelo y los alimentos; razón por la cual se consideran portadores permanentes (25).

El serotipo característico en las ratas es *Icterohaemorrhagiae*, en los cerdos *Pomona*, en el ganado bovino *Hardjo*, en los perros *Canicola* y en los mapaches *Autumnalis*. Sin embargo, los serotipos no son necesariamente específicos de la especie animal y en ellos pueden aparecer diferentes serotipos (8, 9, 25).

Otros reservorios han sido involucrados como portadores: venados, ciervos, ardillas, zorros, mapaches, marsupiales y leones de mar. Al parecer, las variedades que infectan a los reptiles y anfibios (ranas) no infectan al ser humano (9).

### **D. Mecanismos de infección**

La infección del hombre ocurre cuando de manera accidental se infecta directamente con orina, tejidos, semen y secreciones vaginales de animales infectados o indirectamente con suelo húmedo, vegetación, alimentos



contaminados, orina de los reservorios o con el agua de lagunas, ríos, charcos y otros (7-9).

Las leptospiras penetran en el hombre a través de la piel con abrasiones y de las membranas mucosas de ojos, nariz y boca. Entran a la sangre y rápidamente se distribuyen a todo el cuerpo, incluyendo líquido cefalorraquídeo y ojos. Se considera que las características morfológicas de las leptospiras que le permiten movilidad y la presencia de hialuronidasa son los mecanismos que facilitan el ingreso a sitios normalmente protegidos (26).

De igual modo se ha demostrado la transmisión trasplacentaria en animales, principalmente de criaderos (vacas, cerdos, etc.), que produce retardo del crecimiento o pérdida de los productos (abortos) con graves repercusiones económicas. La infección puede ser adquirida durante la lactancia ya que las leptospiras contaminan la leche cuando el animal padece mastitis. En los seres humanos hay algunos datos recientes sobre esta forma de transmisión (13, 27).

También se ha logrado aislar leptospiras en el semen de los animales, por lo tanto a esta enfermedad se le podría considerar de transmisión sexual (13).

### **E. Hallazgos patológicos y patogénesis**

La fisiopatología de la enfermedad es poco conocida y es probable que se deba a la acción directa del microorganismo, a las toxinas producidas o liberadas después de su lisis o que sea secundaria a la lesión capilar seguida de anoxia tisular (9). Otros factores conocidos son la síntesis de hialuronidasa, fosfolipasas, lipasas y hemolisinas (28).

Se comporta como un microorganismo puramente invasivo. Gracias a su movilidad en rotación y traslación penetra en el organismo humano a través de

pequeñas heridas o erosiones de la piel o por las mucosas (conjuntiva y nasofaringe); invade la corriente sanguínea y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el sistema nervioso central y humor acuoso (9, 28). Luego avanza a los tejidos en donde se multiplica en forma acelerada (27).

Las leptospiras causan vasculitis generalizada responsable de los signos y síntomas característicos del cuadro clínico y al parecer existe tropismo por algunos órganos como el hígado, riñones, corazón y músculo esquelético. Las autopsias demuestran la presencia de hemorragias difusas, compatibles con epistaxis, hemoptisis, hematemesis, melena, inyección conjuntival, rash cutáneo, y otras diátesis hemorrágicas frecuentemente observadas en la leptospirosis (28, 29).

Las hemorragias tienen lugar en el tejido músculo-esquelético, músculo-cardíaco, pulmones, espacio pleural, peritoneo, glándulas adrenales, riñones, hígado y espacio subaracnoideo. Entre los factores que explican la tendencia hemorrágica están la misma vasculitis, trombocitopenia e hipotrombinemia. No se ha descrito la existencia de coagulación intravascular diseminada (28, 29).

Algunas leptospiras tienen predilección por invadir determinados órganos o tejidos, como sucede con *L. icterohaemorrhagiae* que se instala en el hígado, *L. canicola* en cerebro y *L. pomona* en vasos sanguíneos periféricos. Sin embargo, estos microorganismos llegan al riñón y provocan glomerulonefritis y pielonefritis (13).

En el hígado puede haber coléctasis intrahepática, se evidencia hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer y se ha reportado eritrofagocitosis. En los riñones la nefritis intersticial es el mayor hallazgo acompañado por una intensa infiltración de neutrófilos y monocitos (29, 30).

Por medio de la microscopía electrónica se observa engrosamiento de la membrana basal y las células tubulares muestran depleción mitocondrial, hipoxemia, hipovolemia y los efectos tóxicos de las leptospiras son la principal causa del daño tubular (3, 29, 30).

Los hallazgos patológicos del corazón incluyen miocarditis con infiltración predominantemente de linfocitos y células plasmáticas, hemorragias petequiales (particularmente en el epicardio), infiltración mononuclear en el epicardio, derrame pericárdico y arteritis de las coronarias. En los pulmones es frecuente observar congestión y hemorragias, ocurre infiltración de los espacios alveolares por monocitos y neutrófilos. También suele encontrarse membrana hialina (3,29).

En el músculo esquelético, particularmente en miembros inferiores, ocurre necrosis focal de fibras musculares aisladas, con infiltrado de histiocitos, neutrófilos y células plasmáticas. La evidencia de esta miositis se correlaciona con las intensas mialgias reportadas por los pacientes.

Durante los primeros días de la enfermedad es posible encontrar la leptospira en el líquido cefalorraquídeo (LCR), por lo que puede causar meningitis aséptica. Los signos meníngeos están ausentes y se presentan en la segunda fase de la enfermedad cuando se han producido anticuerpos, lo cual significa irritación meníngea inmunológica. El LCR muestra una pleocitosis moderada, al principio puede haber predominio de segmentados, pero rápidamente pasa a células mononucleares. Probablemente todos los serotipos patogénicos para el humano son capaces de causar meningitis aséptica (3, 9, 26, 31).

## 1. Producción de toxinas

La producción de toxinas por cepas patógenas de *Leptospira in vivo* fue inferida por Arma y la actividad de la endotoxina fue estudiada en varios serovares. El serovar Pomona se caracteriza por producir enfermedad hemolítica en el ganado mientras que el serovar Ballum produce síntomas similares en hámster. Las hemolisinas de los serovares Ballum, Hardjo, Pomona y Tarassovi son esfingomielinasas.

Las especies virulentas exhiben quimiotaxis hacia la hemoglobina. Los serovares Pomona y Copenhageni elaboran una proteína citotóxica y se ha encontrado en el plasma de los animales infectados. En vivo esta toxina se detecta por su efecto histopatológico típico con infiltración de macrófagos y células polimorfonucleares (3, 29).

## 2. Mecanismos inmunes

La respuesta inmunológica es tanto humoral como mediada por células; luego de la entrada del organismo, se estimulan las áreas dependientes de células T y B (31). Se produce inmunidad homóloga al serovar infectante por lo que la enfermedad puede ser inducida por otro serovar (8).

Se ha sugerido que la fisiopatogenia de las principales complicaciones, como la afección renal o meníngea, sería de base inmunopatológica (28). Las leptospiras no inducen una respuesta inflamatoria en el huésped. Se ha demostrado que las cepas virulentas difieren de las saprófitas en su capacidad de evadir el sistema inmunitario a través de la invasión de las células epiteliales y de la inducción de la apoptosis en los macrófagos. Son capaces de penetrar en los macrófagos por endocitosis y permanecer en su interior protegidas del sistema inmunitario y de los antibióticos (28, 30, 32).

Las leptospiras virulentas se adhieren a las células del epitelio pero no causan injuria directa durante la penetración y son fagocitadas por los macrófagos en presencia de anticuerpos específicos, ya que estos microorganismos son resistentes a la actividad bactericida del suero normal. Los lípidos de la pared celular de la bacteria interactúan con los de la membrana celular y así la degradación de los ácidos grasos del huésped, gracias a la fosfolipasa leptospiral, genera alteraciones en la permeabilidad de membrana (3, 33).

La producción y circulación de complejos inmunes se correlaciona con la severidad de los síntomas. La patogénesis de uveítis equina recurrente parece estar relacionada con la producción de anticuerpos antileptospira que reaccionan con el tejido ocular. Asimismo, el daño retinal en caballos con uveítis se relaciona a la presencia de linfocitos B en la retina (3).

También se han demostrado anticuerpos antiplaquetas y niveles elevados de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en leptospirosis humana. En los estadios finales puede observarse glomerulonefritis de complejos inmunes (3, 31).

#### **F. Manifestaciones clínicas**

El período de incubación es de 7 a 15 días; 10 en promedio. Las manifestaciones clínicas no son claras ni definidas, con frecuencia dependen del serovar invasor y no es raro que se le confunda con otros procesos infecciosos de tipo viral o bacteriano, lo cual hace pensar que esta enfermedad es más frecuente de lo que se estima (1, 13).

La mayor parte de las personas cursan con una presentación benigna y moderada, como muchas otras enfermedades tropicales. Las manifestaciones clínicas son variables y con diferentes grados de severidad. En zonas

endémicas numerosos casos (aproximadamente 15 por ciento) transcurren en forma inaparente o subclínica, las cuales sólo se evidencian por una seroconversión. Noventa por ciento de las personas que desarrollan manifestaciones clínicas, padece una forma leve anictérica; el 5-10 por ciento padece una forma grave, conocida como enfermedad o síndrome de Weil (4, 28).

La leptospirosis es una típica enfermedad bifásica. Este comportamiento se desarrolla en las dos formas de manifestación (9). La primera fase (fase leptospirémica) tiene un comienzo abrupto y duración de 4 a 9 días. Los síntomas iniciales incluyen mialgias, anorexia, náusea, vómito, sufusión conjuntival, adinamia e hipotensión. En el hombre generalmente se presentan dolores testiculares intensos y se acompaña con fiebre arriba de 38 °C (13).

Posteriormente aparece una etapa intercalar en la que el paciente puede presentarse afebril por uno o dos días. La segunda fase (fase inmune) dura de 10 a 30 días; presenta las características de la fase inmune y se correlaciona con la aparición de anticuerpos circulantes de clase IgM. Las leptospiras invaden órganos vitales como hígado, riñón, bazo y pulmón y en los pacientes se detecta leptospiruria, ictericia, petequias, rectorragias y pérdida de peso; también pueden aparecer signos meníngeos, que dan lugar a delirios, convulsiones y psicosis transitorias (9, 13).

### **1. Leptospirosis anictérica**

Suele tener un comienzo brusco con escalofríos y fiebre de 39-40 °C, acompañado de mialgias y cefalea intensa, postración, dolor abdominal, además de malestar general y astenia. Las mialgias pueden ser localizadas o generalizadas, espontáneas o desencadenadas con la palpación, sobre todo en pantorrillas, músculos lumbosacros y abdominales, y constituyen uno de los datos clínicos más relevantes (9, 28, 31).

Durante la primera fase de la enfermedad se observa anorexia, náusea, vómito, síntomas que ocurren en la mitad o más de los pacientes. Estos signos y síntomas se mantienen de 4 a 7 días. Los pacientes en esta fase están agudamente enfermos, febriles y con bradicardia relativa, además de normotensos. La hepato y esplenomegalia son poco frecuentes en la forma anictérica. Lo más frecuente en la fase séptica es la sensibilidad muscular y las manifestaciones oculares como hemorragias conjuntivales, fotofobia y dolor ocular. Ocasionalmente los pacientes presentan diarrea. Con menor frecuencia aparece irritación faríngea, linfadenopatías, hemorragias cutáneas y rash maculopapular que se presenta en el tronco (28, 30).

Se aprecia elevación de la eritrosedimentación y leucocitos de rangos normales a moderadamente elevados. Las pruebas de función hepática muestran ligera elevación de transaminasas, bilirrubinas y fosfatasa alcalina en ausencia de ictericia. El examen general de orina muestra proteinuria, piuria y en ocasiones microhematuria y puede haber cilindros hialinos. El LCR puede mostrar la presión ligeramente elevada o normal y la glucosa también puede ser normal (29).

Después de un período relativamente asintomático de 1-3 días comienzan las manifestaciones clínicas de la segunda fase. Esta fase se correlaciona con la aparición de anticuerpos IgM circulantes mientras que la concentración de C3 se encuentra en el rango normal. La fiebre, en caso de estar presente, es baja y dura de uno a tres días.

El síndrome clínico más importante es el compromiso meníngeo, con una meningitis aséptica de carácter inespecífico que dura pocos días y nunca es fatal. En esta fase las leptospiras ya desaparecieron del LCR, sin embargo, aparecen las manifestaciones clínicas relacionadas con la aparición de anticuerpos. Las manifestaciones no son específicas y el

diagnóstico puede ser confundido con meningitis de etiología viral, debido a la presencia de pleocitosis mononuclear (9, 28, 30).

La leptospiruria se desarrolla y persiste durante 1 a 3 semanas. También se observan iridociclitis (inflamación del iris), neuritis óptica, encefalitis, mielitis y en raras ocasiones, cuadros de neuropatías periféricas similares al síndrome de Guillan-Barré. La afección pulmonar es frecuente y en general, benigna; los síntomas que aparecen más a menudo son tos, hemoptisis y dolor torácico. Puede haber pequeñas lesiones nodulares; la localización es periférica y en lóbulos inferiores. Raramente ocurre hemoptisis franca, síndrome de distress respiratorio del adulto y neumonía. También puede haber miocarditis, en general de poca trascendencia clínica, y la denominada fiebre pretibial, caracterizada por la presencia de lesiones eritematosas en la región pretibial (28, 30, 31).

## **2. Enfermedad de Weil**

La leptospirosis icterica o enfermedad de Weil inicialmente fue descrita como un proceso infeccioso en 1886 y entonces fue asociada a *L. Icterohaemorrhagiae*, pero puede ocurrir con otros serovares (30, 34).

En general, los signos y síntomas que se observan en la forma anictérica son más intensos y prolongados, esta forma se caracteriza por síntomas de disfunción hepática, renal, vascular y pulmonar (26).

Es la forma más grave de leptospirosis que se acompaña por ictericia marcada. La hepatomegalia ocurre sólo en 25 por ciento de los casos. Pueden presentarse hemorragias, anemia, fiebre alta y continua, con daño renal importante. Si no se brinda el tratamiento adecuado y rápido, entre el 10 y 15 por ciento de los enfermos pueden fallecer debido a que los daños causados por las leptospiras son irreversibles (13).



La función hepática generalmente muestra una significativa elevación de la bilirrubina con menor incremento de las transaminasas y fosfatasa alcalina. Los niveles de bilirrubinas son independientes de otras funciones hepáticas. También hay elevación de niveles de creatinfosfoquinasa (CPK). La amilasa se puede elevar principalmente en pacientes con insuficiencia renal aguda. La ictericia se inicia entre 3 a 7 días de iniciada la enfermedad. En pacientes con ictericia severa puede haber xantocromía. La colestasia y el daño hepatocelular son secundarios a daño capilar (29, 30, 33).

La falla renal se observa en un alto porcentaje de los casos y se puede agravar por alteraciones hemodinámicas como deshidratación e hipotensión arterial. Las principales alteraciones son la nefritis intersticial y la necrosis tubular aguda, ambas resultado de la migración de las espiroquetas a través de los riñones con el depósito de antígenos de *Leptospira interrogans* en túbulos y glomérulos.

La insuficiencia renal aguda aparece en la segunda semana, con frecuencia está asociada a poliuria e hipokalemia, como resultado de lesiones tubulares. En el noveno día de la enfermedad la elevación de urea y creatinina complican el cuadro clínico. En estas condiciones las hemorragias se incrementan, especialmente en el estómago, las suprarrenales y subaracnoideas; se observa trombocitopenia. El análisis de orina suele ser anormal durante la fase leptospirémica, con proteinuria, hematuria y cilindros (30,33).

En los casos graves, hasta el 10% de los pacientes pueden presentar alteraciones respiratorias. También se han descrito neumonías intersticiales y bronconeumonías aisladas. Los pacientes graves presentan tos, disnea y hemoptisis, incluso, síndrome de dificultad respiratoria del adulto. También están descritas manifestaciones oculares de las cuales la más común es la

iridociclitis que puede surgir en el periodo de diseminación hacia los tejidos. A menudo la muerte es resultado del fallo renal agudo o fallo miocárdico. Los pacientes que sobreviven estas complicaciones por lo general se recuperan totalmente en 6 a 12 semanas (9).

### **3. Respuesta inmune**

La respuesta inmune inducida en la leptospirosis humana es de tipo humoral, serovar-específica y es la misma que en otras patologías con aparición inicial de niveles de IgM y seguida de anticuerpos IgG (9, 12, 32) (anexo 1).

Los anticuerpos de tipo IgM son producidos tempranamente, a los 5-7 días de instalada la enfermedad, sin embargo, pueden aparecer a los 10 días o después; alcanzan títulos máximos aproximadamente en la cuarta semana. Estos se pueden encontrar en el suero durante 2 a 3 meses, por medio de pruebas como la aglutinación microscópica (MAT), inmunoaglutinación o ELISA IgM (9, 12, 32).

Los anticuerpos IgG aparecen a partir de la segunda semana de infección y son responsables de la lisis de las leptospiras circulantes. La presencia de estos anticuerpos implica el contacto del ser humano con el agente infeccioso en algún momento de la vida y es posible detectarlos por medio de la prueba MAT y/o ELISA IgG ya que pueden perdurar por varios años luego de exposición natural con el agente infeccioso. La inmunidad que se adquiere después de la infección es generalmente específica hacia la serovariedad que la produce (9, 12).

### **G. Diagnóstico**

El diagnóstico de leptospirosis humana requiere la combinación de una serie de parámetros entre los cuales se debe incluir: historia clínica y estudios

de laboratorio para la confirmación (serológicos, bacteriológicos y examen histopatológico) (30). Se debe considerar en cualquier enfermo con fiebre de origen desconocido y antecedentes de posible exposición a *L. interrogans* (1).

## 1. Clínico

El factor más importante que se debe tener en cuenta en el diagnóstico diferencial, es la existencia de factores epidemiológicos de riesgo. En general, se deben considerar los cuadros de hepatitis viral, meningitis aséptica, síndromes virales, fiebres de origen desconocido, malaria o dengue, meningitis, meningoencefalitis, gripe, colecistitis aguda, insuficiencia renal, pancreatitis, fiebre amarilla (12, 28, 33).

En el caso de meningitis, el diagnóstico diferencial debe plantearse frente a las meningitis víricas, de las que se puede diferenciar por la alteración analítica de la función renal, la tendencia a la hemorragia y los factores epidemiológicos. En las formas graves, en especial las que presentan ictericia, pueden confundirse con hepatitis víricas, fiebres hemorrágicas, paludismo o cuadros sépticos con ictericia. Las hepatitis víricas cursan con elevaciones muy superiores de transaminasas (28).

## 2. De laboratorio

Puesto que en la leptospirosis los síntomas no son patognomónicos, el diagnóstico definitivo se lleva a cabo mediante diversos estudios de laboratorio tanto directos como indirectos, que se basan en métodos bacteriológicos y serológicos, estos últimos, de mayor aplicación a escala internacional (13, 35, 36).

Con el fin de obtener la muestra adecuada para efectuar el diagnóstico de leptospirosis es preciso conocer la dinámica de la enfermedad. En la fase

febril o de leptospiremia las leptospiras pueden ser visualizadas en líquidos como sangre, orina, LCR y líquido de diálisis, también se pueden encontrar en el humor acuoso y en la mayoría de los tejidos (30).

En la fase inmune o de leptospiruria los anticuerpos aparecen entre el quinto y séptimo día y actúan facilitando la opsonización de las leptospiras circulantes, momento en que dejan de detectarse en sangre y se eliminan por la orina durante semanas o meses. Durante esta fase es posible la reacción serológica (30).

En general, existe leucocitosis con neutrofilia; cuando la evolución es prolongada hay anemia y trombocitopenia, elevación del tiempo de protrombina y de la velocidad de eritrosedimentación (> 35mm/h).

Las alteraciones hepáticas consisten en elevación de las enzimas hepáticas, leve elevación de aspartato aminotransferasa (ASAT), alanino aminotransferasa (ALAT), gamma glutamil transferasa (GGT); la bilirrubina en la enfermedad de Weil puede exceder de 30 mg/dL (30, 33).

Los niveles de amilasa se encuentran en un rango de 112-663 U/L y de lipasa 377-2887 U/L. Se han descrito valores de nitrógeno de urea en sangre (BUN) en un rango de 55-185 mg/dL con una relación promedio de creatinina de 10.6. Existe aumento importante de CPK, hasta 5 veces su valor, y siempre hay alteraciones en el sedimento urinario (30, 33).

#### **a) Métodos directos**

##### **i. Observación directa**

La observación directa de leptospiras es el primer paso en el diagnóstico de laboratorio. La muestra directa o el sedimento obtenido por centrifugación de orina, LCR, sangre, tejidos y exudados se observa en un microscopio con

condensador de campo oscuro (13). Además, existen métodos de tinciones especiales como tinción de plata o rojo congo; el uso de inmunofluorescencia es frecuente en medicina veterinaria y recientemente se han aplicado métodos inmunohistoquímicos. Sin embargo, no se aconseja su empleo como procedimiento rutinario, ya que ciertos artefactos de la tinción o filamentos de fibrina podrían dar lugar a errores diagnósticos y deben ser utilizados como métodos auxiliares para el diagnóstico de la enfermedad (12, 30).

## **ii. Cultivo**

El aislamiento es muy importante para confirmar la presencia del agente y para identificar el serovar al que pertenece la cepa implicada, información esencial para propósitos epidemiológicos (32). Se debe tomar en cuenta la fase de la enfermedad (en la primera semana utilizar muestras de sangre y de LCR y de la segunda semana en adelante, muestras de orina) (31); además, el cultivo debe llevarse a cabo en las muestras donde se observó microscópicamente la presencia de leptospiras.

Se utilizan medios de cultivo artificiales como EMJH (Ellinghausen, McCullough, Jonson y Harris), Fletcher, Stuart, medios con polisorbato (Tween 80) y albúmina e incubando a 28-30 °C en la oscuridad durante 5 a 6 semanas (7-9). En los medios semisólidos el crecimiento de *Leptospiras* se observa por la formación de un anillo de turbidez debajo de la superficie (zona de Dinger), de unos 0.5 a 1 cm de espesor, que aparece en los 6-14 días posteriores a la inoculación (1, 2, 7, 13, 14).

## **iii. Inoculación en animales**

Puesto que la siembra directa no siempre permite aislar al agente causal, para aumentar el número de leptospiras en las muestras, éstas se inoculan en cobayos y hámsters (13). Esta metodología también se utiliza para lograr

aislamientos de cepas de materiales contaminados, recuperar un serovar específico de un cultivo mixto o para producir anticuerpos de los serovares específicos (1, 16, 32).

#### **iv. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica costosa pero altamente específica que se puede usar en cualquier muestra clínica. Permite demostrar al agente en los primeros 8 a 14 días de iniciados los síntomas, ya que el ADN bacteriano se debe detectar antes de que se produzca la respuesta inmune. Tiene gran sensibilidad, puede detectar la presencia de dos o tres copias de la secuencia buscada; además, la especificidad que reconoce género, especie y variedad (13,16).

#### **b) Métodos indirectos**

Las técnicas serológicas brindan un diagnóstico en corto tiempo, son capaces de detectar anticuerpos anti-*Leptospira* tanto IgM como IgG y son las más utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad (24, 36).

La macroaglutinación es una técnica rápida que puede ser utilizada para tamizaje en muestras de animales y humanos. El principio de la prueba consiste en poner a reaccionar los sueros con una suspensión densa de leptospiros preparada a partir de un serovar patógeno que ha sido tratado por métodos físicos para producir una reacción de aglutinación perceptible a simple vista (12, 32).

La técnica de hemaglutinación indirecta (HAI) detecta anticuerpos desde el cuarto día de inicio de la enfermedad; es sensible y específica (37). Es útil para estudios de seroprevalencia; el CDC de Atlanta recomienda su uso en laboratorios clínicos, ya que presenta una sensibilidad de 92 a 100% y una especificidad de 94 a 97% respecto a la prueba de MAT. Sin embargo,

según recientes estimaciones, la sensibilidad de esta prueba ha sido variada al aplicarla en poblaciones en las que la leptospirosis tiene un comportamiento endémico. En diversos estudios se ha reportado menor sensibilidad para esta prueba; a la vez se ha encontrado que es una prueba específica. Para la realización de esta prueba se deben utilizar sueros pareados; esto significa que debe tomarse una primera muestra de suero durante los primeros 7 días de la infección y debe tomarse una segunda muestra 10 o 15 días después. Esta prueba no puede diferenciar entre los distintos serovares de *Leptospira* sp. (3, 24, 34, 36).

Lepto dipstick, es un método rápido y de fácil lectura e interpretación que detecta precozmente anticuerpos tipo IgM contra diferentes serovares de leptospiras (Canicola, Ballum, Pomona y Sejroe). Consiste en una tira que contiene 2 bandas horizontales, una banda constituida por un antígeno de *Leptospira* de amplia reactividad (banda inferior) y una banda de control interno (banda superior) constituida por un anticuerpo anti-IgM humano. El ensayo se basa en la unión de los anticuerpos IgM específicos con el antígeno de *Leptospira*, unión que específicamente se detecta por un conjugado anti-IgM humana y se visualiza mediante una tinción al revelar las bandas. Los resultados coincidieron en 85.4% al comparar la metodología con la prueba de MAT. Trabajos realizados por diversos investigadores, han reportado, para esta técnica, valores de sensibilidad que oscilan entre 60 hasta 93%, y de especificidad entre 88 hasta 94%, dependiendo de la etapa en que se encuentre el paciente. En general, se ha comprobado que este ensayo combina alta especificidad con alta sensibilidad (35).

El método de ELISA se usa como prueba adicional o como alternativa para la prueba de MAT. Los anticuerpos contra *Leptospira* sp. en el suero, se combinan con el antígeno de leptospira (antígeno total) fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. La reacción antígeno-anticuerpo se

evidencia con la ayuda de un cromógeno. La intensidad de color está directamente relacionada con la concentración de anticuerpos contra leptospira presentes en la muestra. Los sueros positivos deben ser confirmados por la prueba de MAT. Diversos estudios han mostrado que esta prueba ofrece sensibilidad variable que va desde 36 hasta un 100% (12, 24, 38).

Se ha desarrollado una gran variedad de métodos de ELISA y al compararlos con la prueba MAT han mostrado alta concordancia (6). El método de dot-ELISA IgM es una prueba diagnóstica rápida, sensible y específica en la cual antígenos polivalentes de leptospira se colocan en discos de nitrocelulosa que permiten el uso de cantidades pequeñas de reactivo. Modificaciones recientes han permitido la detección de anticuerpos IgG e IgA adicionados a los de tipo IgM (3, 38).

#### **i. Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT)**

La Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) es el método de diagnóstico estándar de referencia internacional para la confirmación serológica de una infección reciente y pasada de leptospirosis; utiliza antígenos vivos por lo que es de alta sensibilidad y especificidad (mayores al 90 por ciento) para el serovar infectante. Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos anti-*Leptospira* tipo IgG e IgM; además, se usa para identificar los aislamientos, clasificar cepas y como base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad (7, 14, 34, 36).

La batería que se usa como antígeno está representada por los serovares más prevalentes del área. Sin embargo, en aquellas regiones donde no se conocen los serovares circulantes, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda por lo menos una cepa de referencia de los serovares representativos de las especies más frecuentes (anexo 2) (7, 12).



Es una técnica cualitativa y cuantitativa que requiere de personal capacitado. Los antígenos que se utilizan deben tener de 4 a 7 días de desarrollo en medio EMJH enriquecido, con una densidad de leptospiras comparable ( $1.5$  a  $2 \times 10^8$ ) y contener aproximadamente 100-200 microorganismos por campo de gran aumento (40x). Las cepas deben ser subcultivadas cada 4-10 días (8, 12, 13).

La prueba se basa en enfrentar diluciones seriadas de suero con igual volumen de suspensión de leptospiras para luego observarse en microscopio de campo oscuro, considerando 50% de aglutinación de leptospiras vivas como el título de corte para la positividad de la reacción por lo que títulos de 1:20 o mayores son positivos, según los criterios establecidos por la OMS. Si el título es de 1:50 se considera positivo cuando en la segunda muestra corrida juntamente con la primera hay un incremento de 4 veces o más (7-9).

Dicha prueba también se utiliza para llevar a cabo estudios seroepidemiológicos en la población en general, en las áreas donde se desconoce la prevalencia e incidencia de la leptospirosis ya que puede indicar la circulación de distintos serovares por medio de anticuerpos producidos en infección pasada, los cuales reaccionan con antígenos de serogrupos específicos (12).

## **H. Tratamiento**

El tratamiento de la leptospirosis depende de la severidad y duración de los síntomas. En el inicio de las manifestaciones la selección de la terapia por lo general es empírica debido a que el diagnóstico de la enfermedad requiere de mayor tiempo (3, 39).

Los pacientes que presentan la forma anictérica de leptospirosis requieren hospitalización y observación. Los pacientes con la forma severa o ictérica deben ser admitidos en la unidad de cuidados intensivos, hemodiálisis de urgencia y monitoreo electrocardiográfico. Pacientes con azoemia prerrenal deben ser hidratados inicialmente mientras se observa la función renal; los pacientes con daño renal severo requieren diálisis (3, 16).

Tradicionalmente la leptospirosis humana ha sido tratada con penicilina o doxiciclina. Varios agentes antimicrobianos han mostrado tener actividad *in vitro* en contra de un número limitado de serovares por medio de técnicas de macrodilución (39).

El tratamiento con penicilina, eritromicina, estreptomina, tetraciclina, ampicilina y amoxicilina ha demostrado que podría acortar la duración de la fiebre, disminuir la duración de la hospitalización y reducir la incidencia de complicaciones renales, hepáticas, hemorrágicas y neurológicas (16, 37).

La penicilina se considera la droga de elección porque la leptospira es muy sensible. Se recomiendan dosis de 1.5 millones cada 6 horas por 7 días. Se ha demostrado que la penicilina acorta el período sintomático, disminuye el grado de compromiso renal y la leptospiruria, aún si se inicia en las fases tardías de la enfermedad (16, 27).

La doxiciclina se recomienda únicamente para casos leves o moderados y dentro de los primeros 5 días de la enfermedad. No se ha demostrado beneficio si se inicia después de este período. Se usa además, como profilaxis en personas con alto riesgo ocupacional a dosis de 100 mg vía oral 2 veces por semana, lo cual ha disminuido la incidencia de la enfermedad (16, 27).

## I. Medidas de control y prevención

Dentro de las medidas de control se incluye la notificación de todos los casos a las autoridades correspondientes; aislamiento del paciente y precauciones universales al manipular sangre y fluidos corporales; vigilancia epidemiológica en áreas y grupos de riesgo; investigación de todos los casos, contactos y de la probable fuente de infección; investigación de probable exposición a animales infectados y aguas contaminadas; educación sanitaria en el personal de salud para difundir las medidas de prevención y el control de los reservorios o la reducción de la infección en ellos (4, 9).

Las medidas de prevención deben orientarse hacia el control de reservorios (ratas y ratones) en las viviendas y áreas alrededor de las casas y lugares de trabajo. Medidas de protección individual y colectiva de la población humana y animal (doméstica) en riesgo. Mejoramiento medioambiental e higiénico-sanitario de las poblaciones en áreas endémicas. Educación a la población respecto a los modos de transmisión de la enfermedad. Se ha observado que existe reacción cruzada entre los anticuerpos de los distintos serovares, especialmente al comienzo de la infección (12, 24). Los títulos de las reacciones cruzadas tienden a disminuir relativamente rápido, después de meses, mientras que los anticuerpos serogrupo y serovar específicos pueden persistir lapsos mayores, incluso años (12).

Orientación a los trabajadores con riesgo ocupacional para el uso de equipo de protección individual, como máscaras, guantes, botas; en ausencia de estos, usar bolsas de polietileno que cubran las manos y los pies del trabajador. Promoción del uso de elementos de protección al realizar actividades recreacionales en áreas potencialmente contaminadas. Drenaje o relleno de terrenos bajos o fácilmente inundables. Recolección de los residuos sólidos en recipientes cerrados de preferencia lejos del suelo y depositarlos en rellenos sanitarios o lugares de tratamiento con el fin de evitar que se conviertan en fuente de alimento para roedores y cerdos (4, 5, 9).

Para evitar la transmisión se debe impedir la permanencia de los animales domésticos en el interior del hogar o en lugares donde se almacenen alimentos. En caso de identificación de animales infectados, se les debe separar de los demás para evitar la contaminación por medio de la orina (9).

La inmunización de animales de granja y domésticos evita la enfermedad pero no necesariamente la infección ni la eliminación de los microorganismos por medio de la orina. Los animales vacunados podrían infectarse sin presentar signos o síntomas (4, 9).

La vacunación contra los serovares que afectan la región es una medida que se puede considerar eventualmente porque proporciona cierto grado de protección a serovares específicos. Para ello es preciso definir los serotipos que producen enfermedad en el lugar y disponer de preparados inmunizantes apropiados (12, 16).

La inmunización humana en grupos de riesgo por medio de una vacuna que contenga los serovares circulantes es una medida importante de prevención que se ha utilizado con buenos resultados en Italia, Japón, Polonia, Israel, Francia, Rusia y China. En el Instituto Carlos Finlay se produjo una vacuna trivalente que contiene los tres serovares más frecuentes en el país (Canícola, Copenhageni, Mozdok), debido a la alta incidencia de la enfermedad en el lugar (40, 41).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El entorno ambiental de Guatemala presenta condiciones ideales para la transmisión de *Leptospira interrogans*, debido al clima húmedo, subtropical y tropical de muchas regiones y a la elevada densidad poblacional, la falta de reconocimiento de la enfermedad por el personal de salud y las condiciones socioeconómicas de gran parte de la población, especialmente rural. Esas son las condiciones que contribuyen a la endemia de leptospirosis en un país.

En Guatemala no se han realizado estudios epidemiológicos que proporcionen datos sobre el impacto de la leptospirosis humana por lo que es necesario iniciarlos con el fin de conocer el comportamiento de esta enfermedad en el país.

Estudios epidemiológicos realizados en países vecinos como México, demostraron la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en una población clínicamente sana por medio de la prueba MAT. Ese resultado propició que se considerara importante realizar en Guatemala un estudio en una población con características similares para determinar anticuerpos anti-*Leptospira*, producto del estímulo directo del microorganismo, debido a que en el país no existe un programa de vacunación contra la leptospirosis humana.

Asimismo, permitirá conocer la frecuencia y circulación de los distintos serogrupos y continuar con estudios epidemiológicos necesarios para establecer programas de inmunización.

Se utilizaron muestras de suero de donadores de sangre, debido a que se considera una población aparentemente sana para demostrar la circulación de este agente causal ya que la producción de anticuerpos se debe exclusivamente al contacto con esa bacteria.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en muestras de sueros de donadores del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios por medio de la prueba MAT.

### B. Específicos

1. Demostrar, a través de la prueba MAT, la circulación de los diferentes serogrupos de *Leptospira* sp.
2. Determinar el tipo de serogrupo infeccioso más frecuente que circula en la población en estudio.

## V. HIPÓTESIS

Este estudio no presenta hipótesis por ser de tipo descriptivo.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Sueros obtenidos del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

#### 1. Muestra

La constituyeron 140 sueros del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios (dicho número fue calculado con base en el total de donadores que asistieron el año anterior, *anexo 3*)

### B. Recursos

#### 1. Humanos

Investigadora: Br. Sara Virginia Galindo Barrientos

Asesoras: Licda. Maria Luisa García de López

Licda. Leticia Castillo Signor

#### 2. Institucionales

Laboratorio Nacional de Salud (LNS), Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSP y AS)

Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

### A. Materiales y equipo

#### 1. Equipo

- Cabina de Bioseguridad nivel II
- Congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Refrigerador
- Incubadora
- Microscopio de campo oscuro



- Estufa simple
- Autoclave
- Pipetas semiautomáticas de volumen variable (10-100  $\mu$ L, 50-300  $\mu$ L)
- Cronómetro
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Baño de María
- Termómetro
- Filtros con membrana de acetato de celulosa de 0.22  $\mu$ m
- Bomba de filtración al vacío

## 2. Materiales

### a. Cepas de *Leptospira*

Diez serogrupos de *Leptospira* sp (anexo 2)

### b. Medios de cultivo

Fletcher (DIFCO)

EMJH (HIMEDIA M1009)

Ambos medios enriquecidos con suero de conejo a una concentración final del 10%

### c. Reactivos

- Alcohol al 70%
- Solución de amonio cuaternario
- Extrán
- Cloro
- Agua destilada

### d. Otros

- Puntas plásticas para pipetas semiautomáticas (10-100  $\mu$ L, 50-300  $\mu$ L)

- Eppendorfs 1.5 mL
- Tubos 16 x 150 mL con tapa de rosca
- Guantes desechables
- Láminas portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hielera
- Baterías para hielera
- Papel absorbente
- Contenedor de material contaminado
- Placas de poliestireno con pozos de capacidad mínima de 300  $\mu$ L
- Pipetas Pasteur
- Bulbos
- Matraces de 250 mL
- Pipetas de 1 mL, 10 mL y 25 mL
- Pipeteador
- Probeta
- Algodón

## B. Métodos

### 1. Preparación de medios de cultivo

#### a. Fletcher (medio semisólido de mantenimiento de cepas)

- Se preparó según las indicaciones del medio de cultivo (anexo 4).
- Se esterilizó a 121  $^{\circ}$ C por 15 minutos y dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregó asépticamente suero de conejo estéril para llegar a una concentración final del 10 por ciento.
- Se mezcló adecuadamente y distribuyó en volúmenes de 10 mL, en tubos 16 x 150 mL con tapa de rosca.

- Se realizó una tindalización a 56 °C por 30 minutos con el objetivo de descomplementar el suero y eliminar posible contaminación.
- El medio preparado se conservó en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su uso.

#### **b. Medio base EMJH (medio líquido de propagación de cepas)**

- Se preparó según las indicaciones del medio de cultivo (anexo 4).
- Se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregó asépticamente suero de conejo estéril para llegar a una concentración final del 10 por ciento (anexo 4).
- Se mezcló bien y distribuyó en volúmenes de 6 mL, en tubos 16 x 150 mL con tapa de rosca.
- El medio preparado se conservó en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su uso.

## **2. Inoculación en medios de cultivo**

- Trabajar en cabina de Bioseguridad.
- De las cepas mantenidas en el medio Fletcher, tomar aproximadamente 1mL del “anillo de Dinger” que se encuentra entre el centro y la superficie del medio. Se debe evitar la aspiración de agar al momento de tomar la muestra.
- Inocular aproximadamente 0.5 mL del contenido de la pipeta resbalando por las paredes del tubo, primero el medio Fletcher y luego el medio EMJH, sin tocar el medio para no causar contaminación.
- Incubar el medio Fletcher a 30 °C por 15-22 días, mantener el control de la temperatura, para un mejor desarrollo de la cepa.
- Incubar el medio EMJH a 30 °C por 5-7 días, mantener el control de la temperatura, para un mejor desarrollo de la cepa.

- Revisar periódicamente los cultivos para observar microscópicamente el crecimiento y la ausencia de contaminación.

### 3. Recolección de muestras

- Las muestras de sueros se obtuvieron durante cinco días seguidos. A cada donador se le leyó el consentimiento informado y procedió a firmarlo.
- Se seleccionaron las muestras que cumplían con los criterios de inclusión del total de sueros procesados durante el día. Los donadores aceptaron participar en el estudio por medio del consentimiento informado (anexo 5).
- Se tomaron 0.5 mL de suero de las muestras seleccionadas y se recolectaron en los tubos eppendorf.
- Las muestras fueron transportadas en cadena de frío al Laboratorio Nacional de Salud y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

### 4. Determinación de anticuerpos por medio de la Técnica de Aglutinación Microscópica MAT (2,9)

#### a. Preparación de antígenos

- Los cultivos de los distintos serogrupos de *Leptospira* sp. que fueron utilizados como antígenos para la prueba MAT debían tener de 5 a 7 días de desarrollo en medio EMJH modificado con un crecimiento de  $2-4 \times 10^8$  leptospiras.
- Se eligieron los cultivos que tuvieran buen crecimiento con la concentración adecuada, indicada en el inciso anterior y que no mostraran evidencia microscópica de auto aglutinación, ni de contaminación. Esto se verificó por medio de la observación al

microscopio (para cultivos muy densos se debió diluir con buffer fosfato salino, PBS, pH 7.2.-7.4).

- El antígeno óptimo para la prueba tiene que permitir observar en el microscopio de campo oscuro entre 150-200 leptospiras en movimiento por campo o hasta lograr una opalescencia de 0.5 de la escala de MacFarland.

#### **b. Tamizaje**

- Se utilizó una placa de poliestireno de las que se emplean para la prueba ELISA en donde se colocaron las muestras por fila (ocho muestras por placa, A-1 a H8) enfrentadas a cada serogrupo colocados por columna (diez serogrupos).
- Se realizó una dilución 1:10 de los sueros problema de la siguiente manera: 540 $\mu$ L de Buffer fosfato salino (PBS) más 60 $\mu$ L de muestra. Se adicionaron 50 $\mu$ L a los primeros diez pozos de la fila.
- Se agregaron 50  $\mu$ L de cada uno de los diferentes serogrupos de *Leptospira* sp. (antígenos) por investigar para obtener una dilución final del suero 1:20.
- Para el control de antígenos se agregaron 50  $\mu$ L de PBS más 50  $\mu$ L de cada serogrupo de *Leptospira* sp. por enfrentar con el suero problema.
- Se cubrió la placa con papel aluminio e incubó por 1 hora a 37 °C (o bien 2 horas a temperatura ambiente).

#### **c. Lectura**

- Se colocó en una lámina portaobjetos de vidrio limpio y libre de grasa, una gota de cada pozo.
- Se procedió a observar en microscopio de campo oscuro con objetivo de 16x (puede utilizarse 10x o 25x) en busca de aglutinación evidente.

**d. Interpretación** (anexo 6).

- Un suero se consideró reactivo si en la dilución 1:20 se observó una aglutinación del 50 por ciento o mayor frente a uno o más serogrupos de *Leptospira* sp.
- Un suero se consideró no reactivo si no se observó aglutinación evidente en una dilución 1:20 con ninguno de las diferentes serogrupos (42).

**C. Diseño de la investigación****1. Tamaño de la muestra**

Ciento cuarenta muestras de sueros que cumplen con los criterios de inclusión.

**2. Tipo de muestreo**

Por conveniencia

**3. Tipo de estudio**

Descriptivo

**4. Criterios de inclusión**

Las muestras fueron seleccionadas según los criterios establecidos en el Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios para la aceptación de donantes (entrevista, examen previo y pruebas serológicas):

- No tener resultados positivos para hepatitis, SIDA, paludismo, sífilis o Chagas
- Haberse presentado en ayunas o con ligero desayuno (que no contenga huevos, leche u otros alimentos con grasa)
- Gozar de buena salud física y mental

- No tener conductas de riesgo
- Mantener la presión arterial entre los rangos de referencia
- Tener un peso mínimo de 115 libras
- Edad comprendida entre 18 y 55 años
- No padecer de alguna enfermedad en el momento de la donación y no estar tomando medicamentos
- En mujeres: no estar embarazada ni en período de lactancia y contar con más de 6 meses de haber tenido parto, aborto o legrado uterino

#### **6. Tabulación de datos**

Los datos de edad y sexo, recolectados mediante el consentimiento informado, se tabularon por medio de una hoja electrónica (Microsoft Excel).

#### **5. Análisis de resultados**

Los resultados fueron analizados por medio de tablas de la siguiente manera: porcentaje de muestras positivas y/o negativas, frecuencia y porcentaje de sueros positivos por serogrupo, porcentaje de muestras positivas por grupo de edad (menores de 20 años, 20-40 años, mayores de 40 años) y por género.

## VII. RESULTADOS

La muestra estuvo constituida por 140 sueros de donadores que se presentaron al Hospital General San Juan de Dios. En dicha muestra 56 fueron del sexo femenino y 84 del sexo masculino y se seleccionaron de acuerdo con los criterios de inclusión establecidos previamente en el estudio.

De las 140 muestras analizadas por la técnica de aglutinación microscópica MAT, en la que se utilizaron diez serogrupos de *Leptospira interrogans* como batería de antígenos vivos, se encontró que 18 muestras (12.8%) fueron reactivas cuando se enfrentaron a los serogrupos y se determinó que la frecuencia de anticuerpos anti-*Leptospira* fue igual tanto en hombres como mujeres, como se observa en la tabla 1.

**Tabla 1: Frecuencia de muestras en las que se detectaron anticuerpos anti-*Leptospira*, según género**

Género	Positivas	%	Negativas	%	Total	%
Femenino	9	6.4	47	33.6	56	40.0
Masculino	9	6.4	75	53.6	84	60.0
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>12.8</b>	<b>122</b>	<b>87.2</b>	<b>140</b>	<b>100.0</b>

Fuente: datos experimentales

En la tabla 2, se establece la reactividad de las muestras según el grupo etario trabajado que en general fue de 18 a 55 años. Se observa que en el grupo de 20 a 40 años se obtuvo una mayor frecuencia de sueros reactivos a los serogrupos de *Leptospira* incluidos en el panel de la prueba MAT.

**Tabla 2: Frecuencia de muestras en las que se detectaron anticuerpos anti-*Leptospira*, según grupo etario**

Género	Edad ( en años)					
	18 a 20	%	20 a 40	%	40 a 55	%
Femenino	0	0.0	7	38.9	2	11.1
Masculino	0	0.0	9	50.0	0	0.0
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>16</b>	<b>88.9</b>	<b>2</b>	<b>11.1</b>



La tabla 3 muestra la frecuencia de los serogrupos de *L. interrogans* identificados en el grupo de estudio, de los cuales Icterohaemorrhagiae y Hebdomadis presentaron la mayor frecuencia (27.3%) y Canicola y Bataviae la menor (13.6%). No se observó presencia de los serogrupos Ballum, Australis, Celledoni, Djasamin ni de *L. biflexa* Samaranga Patoc.

**Tabla 3: Frecuencia de serogrupos de *Leptospira* identificados con la prueba MAT**

Serogrupo	Serovar	Frecuencia	%
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	6	27.3
Canicola	Canicola	3	13.6
Sejroe	Wolffi	4	18.2
Ballum	Castellonis	0	0.00
Bataviae	Bataviae	3	13.6
Hebdomadis	Hebdomadis	6	27.3
Australis	Australis	0	0.00
Celledoni	Celledoni	0	0.00
Djasamin	Djasamin	0	0.00
Samaranga	Patoc	0	0.00
<b>Total</b>		<b>22</b>	<b>100.00</b>

Fuente: datos experimentales. \*Cepario, Depto. Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Se determinó que de 18 muestras (12.8%) a las que se les detectaron anticuerpos anti-leptospira, 5 (30.7%) reaccionaron a dos o más serogrupos de *Leptospira interrogans*. Una muestra reaccionó a los serogrupos Icterohaemorrhagiae -Bataviae-Hebdomadis, dos a Canicola-Hebdomadis, una frente a Icterohaemorrhagiae-Bataviae, dos a Bataviae-Hebdomadis.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En Guatemala existen las condiciones necesarias para la transmisión de *Leptospira interrogans*, agente causal de la leptospirosis humana, como el clima húmedo, subtropical y tropical de muchas regiones del país, la elevada densidad poblacional y bajas condiciones económicas. En países vecinos al nuestro se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en grupos de personas aparentemente sanas, como los donadores de sangre.

El presente estudio tuvo como principal objetivo determinar la presencia de dichos anticuerpos en muestras de sueros del Banco de sangre del Hospital General San Juan de Dios, utilizando la prueba MAT. Además, establecer la frecuencia y circulación de los distintos serogrupos de *Leptospira interrogans*. Estos esfuerzos servirán de base para llevar a cabo los estudios epidemiológicos necesarios para el control y prevención de dicha enfermedad.

En el trabajo realizado se evaluó una única muestra de suero de acuerdo con el criterio establecido por la OMS, en el que un suero se considera positivo (reactivo) al observar 50% de leptospiras aglutinadas en una dilución 1:20; se demostró la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en el hombre, empleando la prueba MAT (42).

De las 140 muestras estudiadas, 18 (12.86%) fueron reactivas frente a uno o más de los diez serogrupos de *Leptospira interrogans*, con los que se contaba para realizar la prueba MAT. Esta positividad es superior al 7% encontrado en el estudio realizado en México en un grupo con similares características (6).

En la tabla 2 se observa que el grupo más afectado se encuentra entre las personas de 20 a 40 años con un 88.89%, que por lo general son económicamente productivas. Este dato concuerda con la literatura consultada; además, podría deberse a que es el grupo en que se encuentra la mayor asistencia de donadores.

En el grupo de mayores de 40 años se encontraron dos casos del sexo femenino; representan el 11.11% y se podría relacionar con la escasa cantidad de donadores de esa edad que contenía el universo de estudio. En el grupo de 18 a 20 años no hubo muestras reactivas, probablemente porque solamente se presentaron dos personas.

Los serogrupos más identificados fueron *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae y Hebdomadis con 27.27%; además, se obtuvo reacción frente a los serogrupos Canicola, Bataviae y Sejroe, serogrupos que han sido encontrados con mayor frecuencia en estudios realizados en el mundo (13).

Los resultados permiten confirmar que la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* se debe únicamente al contacto con el microorganismo y no a la inmunización, ya que en nuestro país desde 1978 se vacuna únicamente ganado bovino, suino y canino<sup>1</sup> y a los seres humanos no se les vacuna contra leptospirosis.

De acuerdo con la literatura revisada, a los sueros que reaccionan frente a uno o más antígenos con la prueba MAT, se les realiza una nueva titulación, duplicando las diluciones del suero a partir de la original y se reporta la dilución más alta en la cual se observa el 50 por ciento de leptospiras aglutinadas, con lo que se identifica el serogrupo infectante (14, 42, 43).

En este estudio, el 12.86% del total de las muestras que presentan anticuerpos, el 30.33%, fueron reactivas frente a dos y tres serogrupos de *Leptospira interrogans*, pero por tratarse de una sola muestra, no fue posible realizar más diluciones para establecer el serogrupo específico.

---

<sup>1</sup>Entrevista personal con Dra. Blanca Zelaya de Romillo, Depto. de Microbiología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USAC.

Los cruces antigénicos en las leptospiras, se deben a que poseen antígenos de superficie que comparten por género, por serogrupo y por serovar y al producirse la respuesta inmune se originan anticuerpos hacia cada uno de ellos y a medida que avanza la respuesta inmune se vuelve más específica. Por ejemplo el gen FlaB codifica una proteína en el flagelo que produce una reacción cruzada entre los serogrupos Grippotyphosa y Hardjobovis; el gen Lag 42 codifica una proteína de 42kDa en la membrana interna de todas las leptospiras patógenas (3, 41, 42). Por lo tanto, se recomienda aplicar este criterio en futuras investigaciones; eso permitirá obtener datos más específicos acerca de la circulación de los distintos serogrupos de *Leptospira interrogans* en Guatemala. En este trabajo la información obtenida proporciona una impresión general acerca de los serogrupos potencialmente infectivos presentes en la población estudiada (3,12).

Para llevar a cabo el análisis de las muestras fue necesario modificar las condiciones de trabajo que al inicio no eran las ideales. Por ello se utilizaron solamente diez cepas de *Leptospira* sp. debido a que se observó contaminación en dos de las doce cepas con que se contaba. Además, se preparó el suplemento para medio EMJH en vez de utilizar el suplemento comercial que no proporcionaba las condiciones óptimas para el crecimiento de las leptospiras.

El presente trabajo corresponde a una población urbana y asintomática en la que se detectó el 12.86% de anticuerpos *anti-Leptospira*, lo que demuestra que existe contacto con este microorganismo, además, la frecuencia de seropositividad encontrada, mayor a la esperada, proporciona información acerca del alto riesgo que existe en la población masculina y femenina, así como de las repercusiones en aspectos de salud y económicos.

## IX. CONCLUSIONES

1. El 12.86% de las muestras analizadas posee anticuerpos anti-*Leptospira* utilizando la prueba de MAT.
2. Los serogrupos de *Leptospira interrogans* circulantes en la población en estudio son Icterohaemorrhagiae (27.27%), Hebdomadis (27.27%), Sejroe (18.18%), Canicola (13.64%), Bataviae (13.64%).
3. Los serogrupos de *Leptospira interrogans* mayormente encontrados fueron Icterohaemorrhagiae y Hebdomadis en un 27.27%.

## XI. REFERENCIAS

1. Buschiazzo HO. Cañas M. Leptospirosis un país enfermo. *Femeba* 2001;(4):66:8-9
2. Rodríguez B *et al.* Leptospirosis humana: ¿un problema de salud? *Rev Cubana Salud Pública* 2000;26:27-34
3. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):296-326
4. Leptospirosis. Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud. Chile 7 enero 2006 <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/leptospirosis.htm>
5. Suárez M. *et al.* Brotes de leptospirosis humana en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. *Rev da Sociedade Brasileira de Med Trop* 1999;32:13-18.
6. Gavaldón D. *et al.* La importancia de la leptospirosis humana en México. Detección de anticuerpos antileptospira en una población de donadores de sangre. *Gac Méd Méx* 1995;131(3):289-292
7. Céspedes Zambrano MA., Glenny M. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de Salud: Ministerio de Salud. Doc Tec. No. 34. Lima, Perú. 2002. 61p
8. Varela A. *et al.* Guía de control y manejo de leptospirosis. Organización Panamericana de la Salud. Comisión del convenio MSP/MGAP para el control, vigilancia e investigación en zoonosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.01/02. 2002
9. Laguna Torres VA. Leptospirosis. Módulos Técnicos. Serie Documentos Monográficos No. 2. Lima: Instituto Nacional de Salud. 2000. 56p.
10. Orantes JA. Comparación de métodos para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes que asisten a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003. 58 p.
11. Estrada PM. Diagnóstico diferencial de leptospirosis humana y dengue de pacientes con enfermedad febril referidos al Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del área de salud de Escuintla. Universidad de San Carlos de

- Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004. 97 p.
12. Terpstra WJ *et al.* Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization. International Leptospirosis Society, 2003. 122p.
  13. Caballeros Servin A. Romero García J. Leptospiras. Manual de Procedimientos de laboratorio del INDRE. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Editorial Escobar Gutiérrez A. México 1997
  14. Myers DM. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota técnica No. 30 . 1985
  15. Michel V. Branger C. Andre-Fontaine G. Epidemiology of leptospirosis. Rev Cubana Med Trop 2002;54(1):7-10
  16. Monte Del A. Leptospirosis. Universidad de la República. Facultad de Medicina. Uruguay, 2002. 7 Enero 2006 <<http://www.higiene.edu.uy/leptos.htm>>
  17. Nájera S. *et al.* Leptospirosis ocupacional en una región del caribe colombiano. Salud Pública Méx, 2005;47:240-244
  18. Zavala-Velázquez J *et al.* Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la península de Yucatán. Rev Biomed 1998; 9:78-83
  19. Carneiro M. *et al.* Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: estudio clínico y epidemiológico. Rev Chil Infect 2004; 21(4): 339-344
  20. Ochoa JE. Sánchez A. Ruiz I. Epidemiología de leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. Infectio. Rev Asoc Col Infecto 2001;5(2):4-17
  21. Anzuelo A., Torres M., Bran JL. Leptospirosis humana en Guatemala. 1er Caso confirmado. Revista Universidad de San Carlos de Guatemala. 1982. 16p
  22. Unidad de Vigilancia Epidemiológica, Departamento de Epidemiología, Dirección General del Sistema Integral de Atención en Salud. MSPAS. Leptospirosis. (Documento). Guatemala, 2006
  23. Sikahall SV. Estandarización de la prueba de aglutinación microscópica en placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana. Universidad de San

- Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006. 54p.
24. Perret C. *et al.* Prevalencia y presencia de factores de riesgo de leptospirosis en una población de riesgo de la Región Metropolitana Rev Méd Chile 2005; 133: 426-431
  25. Sepúlveda A. Dimas JS. Preciado FJ. La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. Rev Cub Med Trop 2002;54(1):21-3
  26. Arbey J. Arango JH. De Lima E. Leptospirosis icterohemorrágica. Presentación de un caso. Colombia Med 1998;29:43-46
  27. Velásquez RT. Seroprevalencia y factores asociados a la transmisión de leptospirosis en trabajadores de la procesadora municipal de carnes (Promuca) de San Pedro Sula, Honduras de mayo a junio de 2004. Nicaragua 2004. 35p
  28. Pumarola Suñé T. Jiménez de Anta Losada MT. Leptospirosis. Medecine 2002;8(69):3688-3692
  29. Lemarroy Valenzuela D. Carrillo Vela M. Leptospirosis y disfunción orgánica múltiple. Caso clínico y revisión de la literatura. Rev Asos Mex Med Crit y Ter Int 2003;17(5):176-183
  30. Martínez Geijo. Ribó R. Herranz R. Infecciones por leptospira. Formas clínicas. Actitudes diagnósticas y terapéuticas. Medicine 1998;7(79):3672-3675
  31. Acosta H. Moreno CH. Viáfara D. Leptospirosis. Revisión de tema. Colombia Med 1994;25:36-42
  32. Rao RS *et al.* Leptospirosis in India and the rest of the world. Braz J Infect Dis, 2003;7(3):178-193
  33. Ibarra C. Espinoza C. Cornejo R. Enfermedad de Weil. Presentación de un caso clínico. Clin y Ciencia 2003;1(6):25-32
  34. Hickey P. Demers D. Leptospirosis. Medicine. 2003  
7 Enero 2006 <[www.emedicine.com/ped/topic1298.htm](http://www.emedicine.com/ped/topic1298.htm)>
  35. Rodríguez I *et al.* Lepto dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop 2002;54:44-47



36. Navarro Aguirre L. et al. Comparación de técnicas para el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Rev Cubana Invest Biomed* 2004;22:19-22
37. Rojas G. et al. Una causa infrecuente de falla renal aguda e ictericia. Leptospirosis: caso clínico y revisión de literatura. *Rev Chil Pediatr* 2001;72(3):230-234
38. Pappas MG. et al. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific Dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34(2):346-54
39. Clinton K. Murray and Duane R. Hospenthal. Broth Microdilution Susceptibility Testing for *Leptospira* spp. *Antimicrob A Chemother.* 2004;48(5):1548–1552.
40. Martínez Sánchez R. et al. Evaluación de la efectividad de una nueva vacuna contra la leptospirosis humana en grupos de riesgo. *Rev Panam Salud Pública/ Pan Am J Public Health* 2000;8(6):385-392
41. Martínez Sánchez R. et al. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna cubana inactivada trivalente contra la leptospirosis humana según diferentes esquemas. *Rev Cubana Med Trop* 2002;54:37-43
42. Hartskeerl RA. et al. International course on laboratory methods for the diagnosis "leptospirosis Habana 2006". Instituto Pedro Kourí. 2006. p
43. Faine S. et al. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne, Australia. 1999. 296p

XII. ANEXOS

ANEXO 1

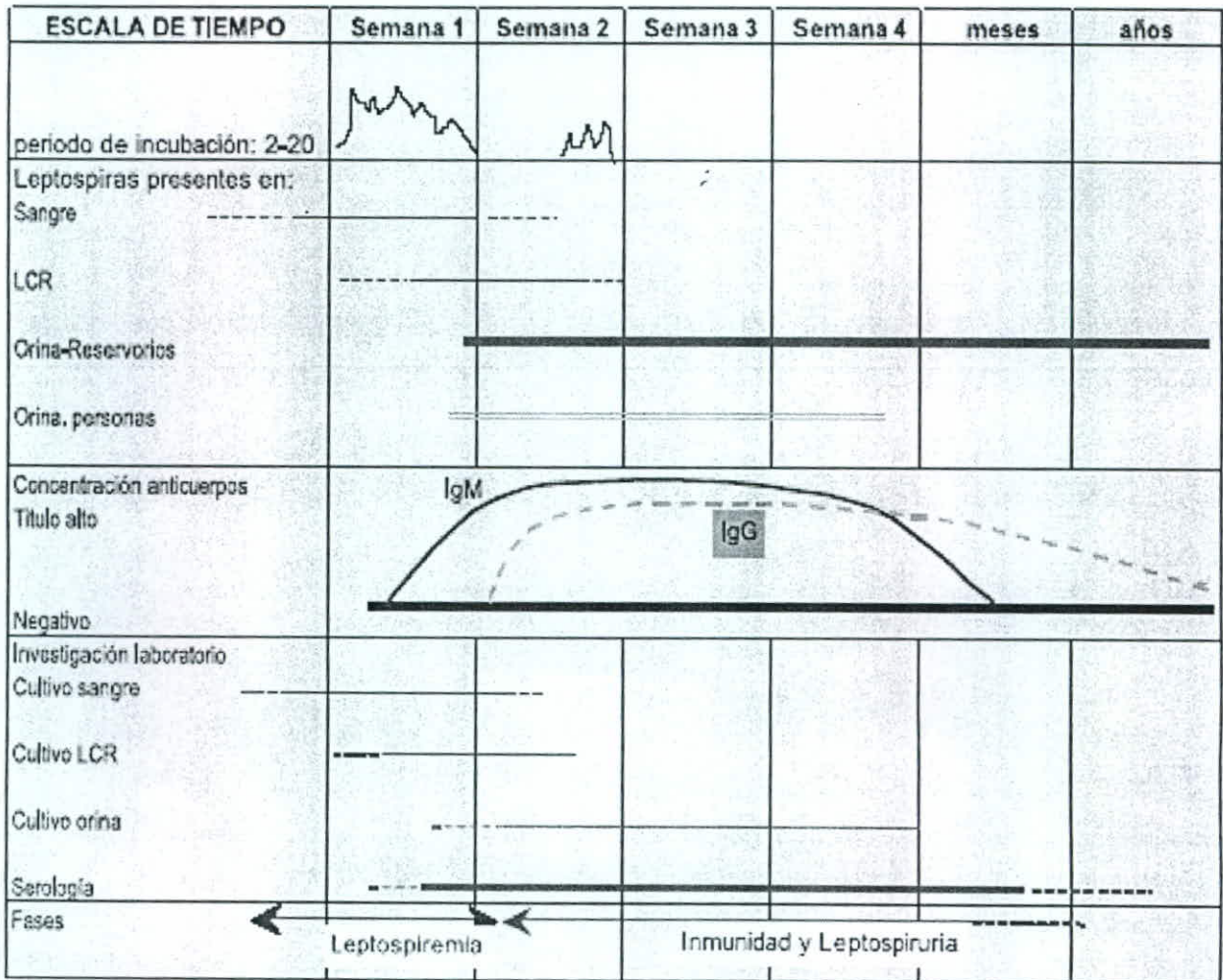


Figura 1: Cinética de la leptospirosis

Tomado de: Céspedes Zambrano MA. Glenny M. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de Salud: Ministerio de Salud.

Doc Tec. No. 34. Lima, Perú. 2002. 61p

## ANEXO 2

**Tabla 1: Serogrupos de referencia utilizados como antígenos para la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT)**

Serogrupo	Serovar	Cepa
Icterohaemorrhagiae	Copenhagēni	M20
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Sejroe	Wolffi	3705
Ballum	Castellonis	Castellon 3
Bataviae	Bataviae	Swort
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Australis	Australis	Ballico
Celledoni	Celledoni	Celledoni
Djasimin	Djasamin	Djasamin
Samaranga	Patoc	Patoc I

Tomado de: Céspedes Zambrano MA. Glenny M. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de Salud: Ministerio de Salud. Doc Tec. No. 34. Lima, Perú. 2002. 61p

## ANEXO 3

**Tamaños de muestra y precisión para estimación de una  
proporción poblacional**

Tamaño poblacional:	11745
Proporción esperada:	10.000%
Nivel de confianza:	95.0%
Efecto de diseño:	1.0

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

N = Total de la población

$$Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$$

p = proporción esperada

$$q = 1 - p$$

d = precisión

Precisión (%)	Tamaño de muestra
---------------	-------------------

1.000	2672
2.000	806
3.000	372
4.000	213
5.000	137

## ANEXO 4

## COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

## 1. Medio Fletcher (mantenimiento de cepas)

## Fórmula

Peptona	0.3g
Extracto de carne	0.2g
Cloruro de sodio	0.5g
Agua destilada	920 mL
Suero estéril de conejo	10 por ciento

Para la preparación de 200 mL del Medio Fletcher se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{array}{rcl} 2.5 \text{ g} & 920 \text{ mL} & \\ X & 200 \text{ mL} & X = 0.54 \text{ g del medio Fletcher} \end{array}$$

Se debe comprobar que cada lote de medio terminado tenga la capacidad de promover el desarrollo de varios serovares de *Leptospira* entre 4 y 7 días de incubación a 28 °C cuando se siembran cantidades mínimas.

## 2. Medio Base EMJH (propagación de cepas)

## Fórmula

Ortofosfato hidrógeno de disodio	1.00 g
Difosfato monopotásico	0.30 g
Cloruro de sodio	1.00 g
Cloruro de amonio	0.25 g
Tiamina	0.005 g

## Preparación:

Suspender 2.56g de medio en 900mL de agua destilada y disolver completamente. Dejar el enriquecimiento *Leptospira* (FD066) a temperatura ambiente y agregar asépticamente 100 mL al medio base EMJH (M1009).

## ANEXO 5

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del estudio: "Determinación de anticuerpos anti-leptospira en donadores de sangre del Hospital General San Juan de Dios"**

La leptospirosis humana es una zoonosis causada por la bacteria *Leptospira interrogans*, es una enfermedad que se encuentra distribuida mundialmente. El ser humano se infecta de manera accidental al entrar en contacto con superficies, aguas, orina o tejidos de animales infectados y las manifestaciones clínicas van desde un aparente resfriado hasta una enfermedad icterica que afecta hígado y riñón.

Yo \_\_\_\_\_ estoy de acuerdo en participar voluntariamente en este estudio cuyo objetivo es determinar anticuerpos anti-leptospira y la frecuencia de esta bacteria en esta población, por lo que autorizo que mi sangre sea utilizada en este estudio.

No. identificación \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Nombre del investigador (a) \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

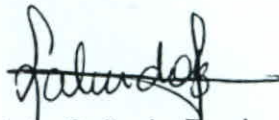
## ANEXO 6

Tabla 2: Lectura para la prueba MAT

CRUCES (AGLUTINACIÓN)	OBSERVACIÓN
+	25% aglutinación con 75% de células libres
++	50% aglutinación con 50% de células libres
+++	75% aglutinación con 25% de células libres
++++	100% aglutinación o lisadas con 0-25% de células libres

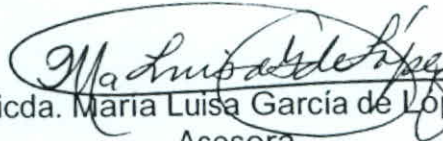
Tomado de: Céspedes Zambrano MA. Glenny M. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de Salud: Ministerio de Salud.

Doc Tec. No. 34. Lima, Perú. 2002. 61p



Br. Sara Virginia Galindo Barrientos

Autora



Licda. María Luisa García de López

Asesora




Licda. Leticia Castillo

Asesora



Licda. Alba Marina Valdés

Revisora



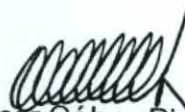
Licda. Amanda Gálvez

Revisora



M.Sc. Vivian Matta Ríos de García

Directora



Ph.D. Oscar Cobar Pinto

Decano