

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




**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LEPTOSPIRA EN PACIENTES  
CON SEROLOGÍA NEGATIVA A DENGUE, REFERIDOS AL LABORATORIO  
NACIONAL DE SALUD EN EL AÑO 2005**

**JAIME ALBERTO BARRIOS BARRERA**

**Químico Biólogo**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2010**

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



**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LEPTOSPIRA EN PACIENTES  
CON SEROLOGÍA NEGATIVA A DENGUE, REFERIDOS AL LABORATORIO  
NACIONAL DE SALUD EN EL AÑO 2005**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**JAIME ALBERTO BARRIOS BARRERA**

**Para optar al título de**

**Químico Biólogo**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2010**

## **JUNTA DIRECTIVA**

<b>Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.</b>	<b>Decano</b>
<b>Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.</b>	<b>Secretario</b>
<b>Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.</b>	<b>Vocal I</b>
<b>Licda. Liliana Vides de Urizar</b>	<b>Vocal II</b>
<b>Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli</b>	<b>Vocal III</b>
<b>Br. María Estuardo Guerra Valle</b>	<b>Vocal IV</b>
<b>Br. Berta Alejandra Morales Mérida</b>	<b>Vocal V</b>

## ACTO QUE DEDICO A

**Dios y a la virgen María.**

Por darme la fe, sabiduría, paciencia y perseverancia para alcanzar mis metas.

**Mis padres: María Luisa Barrera y Jaime Barrios.**

Por darme las herramientas adecuadas para alcanzar mis objetivos, por su amor, apoyo y dedicación incondicional.

**Mis hermanos: Sindy Melisa y Jesse David<sup>+</sup>.**

Por darme esperanza, alegría y perseverancia en esta aventura.

**Lorena Pappa.**

Por su amor, apoyo y dedicación en gran parte de mi carrera universitaria.

**Residencia Universitaria "Ciudad Vieja" y a su fundador San José María Escrivá de Balaguer.**

Por ser mi segundo hogar y por darme formación espiritual y académica cuando más lo necesite.

**Familia.**

Tías, tíos, primas y primos, que de alguna u otra manera, me brindaron su ayuda para lograr esta meta.

**Amigos.**

Por compartir estos momentos.

## AGRADECIMIENTOS A

<b>Asesores:</b> <b>Licda. Leticia Castillo,</b> <b>Lic. Osberth Morales.</b>	Por darme la oportunidad de elaborar y finalizar de la mejor manera este proyecto.
<b>Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE) del Laboratorio Nacional de Salud.</b>	Por el apoyo brindado para realizar esta investigación.
<b>Departamento de Microbiología de la Facultad de ciencias químicas y farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala.</b>	Por el apoyo brindado para realizar esta investigación.
<b>Revisoras:</b> <b>Licda. María Luisa García de López.</b> <b>Msc. Vivian Matta.</b>	Por su colaboración en la revisión de esta investigación.
<b>Revisión estadística y conclusiones:</b> <b>Licda. Sheilee Diaz</b> <b>Lic. Ronald Kestler.</b>	Por su colaboración en la revisión de esta investigación.
<b>Catedráticos.</b>	Por los conocimientos y experiencias brindadas durante mi formación universitaria.

## INDICE

<b>I.</b>	RESUMEN.....	03
<b>II.</b>	INTRODUCCION.....	04
<b>III.</b>	ANTECEDENTES.....	07
	<b>A.</b> <i>Leptospira</i> .....	05
	1. Generalidades.....	07
	2. Agente etiológico.....	07
	3. Distribución.....	08
	4. Vigilancia epidemiológica de leptospirosis en Guatemala.....	10
	5. Estudios realizados en Guatemala.....	11
	6. Reservorio.....	13
	7. Mecanismos de transmisión.....	13
	8. Hallazgos patológicos y patogénicos.....	14
	9. Manifestaciones clínicas.....	15
	10. Diagnóstico.....	20
	11. Tratamiento.....	28
	10. Inmunización.....	29
	<b>B.</b> Dengue.....	29
	1. Generalidades.....	31
	2. Agente etiológico.....	32
	3. Distribución.....	32
	4. Epidemiología.....	32
	5. Reservorio.....	33
	6. Mecanismos de transmisión.....	34
	7. Hallazgos patológicos y patogénicos.....	36
	8. Manifestaciones clínicas.....	40
	9. Diagnóstico.....	44
	10. Tratamiento.....	48
<b>IV.</b>	JUSTIFICACION.....	51
<b>V.</b>	OBJETIVOS.....	52
<b>VI.</b>	HIPOTESIS.....	53

<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>IX.</b>	<b>DISCUSION DE RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## I. RESUMEN

El dengue es una infección viral aguda y sistémica que se transmite de una persona a otra por medio de un mosquito hematófago del género *Aedes*, siendo un grave problema de salud pública que afecta a la población guatemalteca. Esta enfermedad manifiesta síntomas similares con otras patologías, principalmente con la leptospirosis humana, la cual es una zoonosis de amplia distribución mundial causada por *Leptospira interrogans* en donde el hombre se infecta de manera accidental. En Guatemala no existen estudios epidemiológicos que permitan conocer el comportamiento, impacto y la magnitud de la leptospirosis como diagnóstico diferencial en la vigilancia epidemiológica de dengue. Por lo cual el presente estudio tuvo como objetivos determinar la presencia de anticuerpos anti-leptospira en muestras serológicas de pacientes con sintomatología sugestiva de dengue, de los hospitales Roosevelt y San Juan de Dios, referidos al Laboratorio Nacional de Salud en el año 2005 y que presentaron serología negativa al mismo, así como demostrar la circulación y frecuencia de los diferentes serogrupos de *Leptospira* por medio de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) y establecer los síntomas y signos más frecuentes en los casos de pacientes con serología positiva a *Leptospira interrogans*.

Se analizaron 48 muestras de suero, de las cuales 18 (38.5%) presentaron anticuerpos anti-leptospira, los serogrupos identificados principalmente fueron: *pyrogenes* (38.89%), *canicola* (22.22%), *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae* y *serjoe*. Los datos obtenidos de las fichas demuestran que los pacientes sospechosos a dengue refirieron que los principales síntomas y signos comunes a ambas enfermedades fueron: fiebre, dolor de cuerpo, escalofríos y dolor de cabeza. Al revisar la sintomatología de los casos que presentaron anticuerpos anti-leptospira, se confirmaron estas similitudes, lo cual evidencia que es necesario realizar el diagnóstico diferencial a las muestras sospechosas a dengue que presentan síntomas similares a la leptospirosis humana, por medio de pruebas de laboratorio que confirmen esta infección y que a la vez permitan dar el tratamiento adecuado a cada caso.



## II. INTRODUCCION

El dengue es una infección viral aguda y sistémica que se transmite de una persona a otra por medio de un mosquito hematófago del género *Aedes*, siendo un grave problema de salud pública que afecta el territorio nacional(1). Los síntomas de dengue son similares con otras patologías, principalmente con la leptospirosis humana. En un estudio realizado en la península de Yucatán, México, se demostró que la leptospirosis fue confundida clínicamente con dengue, ya que se encontraron un total de 7(14%) casos de leptospirosis en un total de 50 casos analizados que presentaban serología negativa a dengue, predominando las serovariedades *Canicola* y *Pomona* (2). Es una zoonosis de distribución mundial, que tiene por reservorios a algunos roedores salvajes y domésticos, ganado bovino, porcino, perros y algunos otros mamíferos (3). El cuadro clínico es de comienzo brusco, anunciado por una fiebre de alto grado, cefaleas severas, malestar general y dolores musculares, también abarca dolor ocular, fotofobia, sufusión e incluso hemorragia conjuntival (4). A esto se agregan náuseas, vómitos, tos o faringitis, hepatomegalia, exantema e ictericia (5, 6).

En Guatemala, el área de virología del Laboratorio Nacional de Salud cuenta con un programa de vigilancia virológica y serológica de dengue, anualmente se confirman los casos sospechosos de dengue clásico y hemorrágico que son referidos por los establecimientos de salud de todo el país. En el año 2005, de los Hospitales Roosevelt y San Juan de Dios de la ciudad capital, fueron referidas 182 muestras serológicas de pacientes con cuadro clínico sospechoso de dengue, se acompañaron con su respectiva ficha epidemiológica. De los 49 casos referidos del Hospital San Juan de Dios, se confirmaron 28 casos para dengue (57%), mientras que de los 133 casos referidos por el Hospital Roosevelt, se confirmaron 42 casos (32%). Lo que indica que se confirmaron un total de 70 casos (38 %) de los dos hospitales.

Debido a la similitud de los cuadros clínicos de leptospirosis y dengue en la etapa aguda (Tabla 1), la leptospirosis no es diagnosticada adecuadamente y se trata como dengue atípico, ocasionando que el paciente no evolucione satisfactoriamente.

**Tabla 1.** Diagnóstico diferencial de dengue.

Parámetro \ enfermedad	Leptospirosis	Dengue	HB	Malaria	Fiebre amarilla
Ictericia	P/A	A	P	P	P
Fiebre	I	I	PI	I	I
Dolor de cabeza	P	P	P	P	P
Dolor muscular	P	I	A	P	P
Vómito	P	P	P	P	P
Vómito negro	A	A	A	A	P
Vasculitis	P	A	A	A	A
Petequias	P	P	A	A	A
Daño hepático	P	P	P	P	NE
Daño renal	P	A	P	N	NE
Transaminasas	LE	LE	E	LE	NE
Ck	E	NE	N	NE	NE
LCR, pleocitosis, glucosa	N, N/D	NE	NE	NE	NE
Hematocrito	D	D	N	D	D
BUN / Creatinina	E,E	N,N	NE	NE	NE

E: elevado P: Presente PI: Poco Intensa. LE: Ligeramente elevado A: Ausente N: Normal NE: No evidencia D: Disminuido I: Intenso.

Tomado de: Trevejort, M, *et al.* Epidemic Leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage. Nicaragua, Jour Infect dis. 1998; 178:157-163.

Considerando la posibilidad de que la leptospirosis humana sea un problema importante en la salud de la población guatemalteca, es necesario conocer el porcentaje de seropositividad de leptospirosis que es diagnosticada erróneamente como dengue, esto permitirá promover nuevos estudios que establezcan la incidencia de leptospirosis en otras poblaciones a nivel nacional. En el presente estudio se analizaron las fichas epidemiológicas y muestras serológicas de pacientes del Hospital Roosevelt y San Juan de Dios, que fueron

referidas al Laboratorio Nacional de Salud (LNS) en el año 2005 como sospechosos de dengue. Se seleccionaron las muestras serológicas de pacientes que contaron con más de 6 días de sintomatología y que dieron negativa la prueba de MAC-ELISA para anticuerpos anti-dengue IgM, a las que les realizó la prueba de aglutinación microscópica (MAT) con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos totales anti-leptospira. A través de este estudio se podrá demostrar la importancia de la leptospirosis como diagnóstico diferencial de dengue en Guatemala.

### III. ANTECEDENTES

#### A. LEPTOSPIROSIS

##### Generalidades

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, que tiene por reservorios algunos roedores salvajes y domésticos, ganado bovino, porcino, perros y algunos otros mamíferos. La leptospirosis se conoce también con los nombres de Enfermedad de Weil, en homenaje al hombre que describió por primera vez la fiebre icterohemorrágica en 1886. Constituye un grupo de enfermedades bacterianas, que determinan una infección aguda generalizada, caracterizada por vasculitis extensa. Es una enfermedad ocupacional o accidental (3, 4, 5, 7).

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. El cuadro clínico es de comienzo brusco, anunciada por una fiebre de alto grado, cefaleas severas, malestar general y dolores musculares, también abarca dolor ocular, fotofobia, sufusión e incluso hemorragia conjuntival. A esto se agregan náuseas, vómitos, tos o faringitis, hepatomegalia, exantema, ictericia. La muerte es ocasional por fallo renal, miocarditis o hemorragia masiva con colapso cardiovascular y la hemorragia pulmonar es frecuentemente fatal. La leptospirosis clásica es una enfermedad bifásica, que consiste en una fase septicémica inicial y otra inmune secundaria. Después de un intervalo asintomático de 1-3 días se desarrolla la fase inmune de la infección (3, 4, 5, 6, 8, 9).

##### Agente Etiológico

Las bacterias del género leptospira (*orden spirochetales*) son bacterias filamentosas de 5 a 20 µm de largo y muy delgadas, de 0.5 µm de ancho; presentan espirales apretadas y regulares y ambos extremos se curvan en forma

de gancho. Tienen movimientos de rotación rápida sobre su eje longitudinal y traslación en dirección axial. Son Gram negativo y se tiñen débilmente con el colorante anilina. Se reconocen dos especies del género *Leptospira*, *L. interrogans*, que incluye todos los patógenos humanos y la especie saprofita *L. biflexa*. *L. interrogans* contiene muchos serotipos individuales que causan enfermedad humana. Los serotipos o serovariedades relacionados de manera antigénica se reúnen en serogrupos con propósitos de clasificación (6, 10).

Las serovariedades más frecuentes en infecciones humanas incluyen; *L. interrogans* serovar *canicola*, que es la especie asociada en forma principal con los perros. Se mantiene en ellos y se propaga fundamentalmente a través de la orina, al hombre, ganado bovino y gatos; *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* está asociado a las ratas. *L. interrogans* serovar *pomona*, denominada así por el sector de Australia donde fue reconocida por primera vez como una enfermedad febril de los lecheros, cerdos y en leche cruda de ganado vacuno. Entre otras serovariedades, también podemos mencionar: *L. interrogans* serovar *autumnalis*, *L. interrogans* serovar *australis*, *L. interrogans* serovar *bataviae*. Diferentes tipos de leptospiras pueden ser transportados por un solo género animal y un solo serotipo puede asociarse con más de un hospedero. En general, estos hospederos animales no están sintomáticos y no desarrollan anticuerpos a pesar de una infección abrumadora (3, 5).

### **3. Distribución**

Se distribuye a nivel mundial. La infección es endémica y ocurre con mayor frecuencia en regiones tropicales y subtropicales. Las personas más expuestas al riesgo son aquellas que trabajan en arrozales, plantaciones de caña de azúcar, mataderos, así como granjeros, veterinarios y personas que participan en actividades militares. También trabajadores de alcantarillados, mineros, bañistas, deportistas y personas que acampan al aire libre en zonas afectadas. Se informó leptospirosis en asociación con la práctica de navegación con kayacks (2, 11, 6).

En Cuba, el clima, la orografía, la red fluvial natural y artificial, las extensas áreas agrícolas y los regímenes lluviosos en determinadas épocas han favorecido la propagación de la leptospirosis en el hombre y los animales, lo cual se refleja en la tendencia al aumento de la morbilidad por esta enfermedad en todo el territorio nacional (12, 13).

En la península de Yucatán (México), se presentó una epidemia de dengue en el año 1994, de los sueros obtenidos durante la fase aguda y de convalecencia de la enfermedad, se estudiaron 100 sueros pertenecientes a 50 pacientes que resultaron negativos a dengue, finalmente se determinó que 7 pacientes (14 %) resultaron positivos a *Leptospira interrogans* de los cuales 3 presentaron la serovar *canicola* y cuatro la serovar *pomona* (2).

Los factores epidemiológicos que se asociaron con la leptospirosis en Hawai, incluyeron la presencia de agua estancada para uso doméstico, el contacto con bovinos y su orina o la manipulación de tejidos animales. Recientemente en Italia se presentó una epidemia transmitida por agua, se sugirió que el brote estuvo asociado a un erizo atrapado en un reservorio de agua (6).

En septiembre y octubre del año 1999 se registró una epidemia de leptospirosis en Khumuang, subdistrito de Buriram, provincia al noroeste de Tailandia, donde fueron infectados trabajadores que se dedicaban a la limpieza de estanques. Se examinaron 104 trabajadores, de los cuales 43 (41.03%) presentaron positividad para anticuerpos IgM para *Leptospira* y de ellos solo 17 (39.50%) presentaron enfermedad febril (15).

La Revista Panamericana de Salud en 1999, indicó: "Nicaragua fue el único país afectado por la leptospirosis después del paso del huracán Mitch en 1998. Sin embargo, la experiencia adquirida en la epidemia de 1995 le permitió implementar precozmente la vigilancia activa de los casos, de los cuales hubo un total de 868 después de Mitch, equivalente a un promedio semanal de 79 casos "(7).

En Buenos Aires (Argentina) durante los años 2000 – 2001, se reporto una epidemia de 47 casos en el área suburbana, de la localidad de Quilmes, en la que 4 pacientes murieron con sospecha de leptospirosis febril, de ellos 3 pacientes fueron confirmados, además se describieron 2 casos con hemorragia pulmonar letal (8).

#### **4. Vigilancia Epidemiológica de Leptospirosis en Guatemala**

En Guatemala el primer caso de leptospirosis humana detectado fue efectuado por Torres en 1,980, el serogrupo fue confirmado por Suizel en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) correspondiendo al serogrupo *copehagenii*. Según los informes de Vigilancia Epidemiológica del Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, en el departamento de Guatemala, durante el año de 1998 se reportaron: siete casos de leptospirosis humana, uno proveniente de El Progreso, tres de Santa Rosa y tres de Izabal. En el año 2,002 se detectaron cinco casos los cuales fueron positivos para prueba de ELISA IgM, documentados en las áreas de salud de Guatemala, Escuintla, San Marcos e Izabal. Dichas áreas en el año 1,999 no reportaron ningún caso (10, 14).

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* tipo IgM. En el mismo año, cuatro pacientes fueron positivos, tres de Izabal y uno de la ciudad capital. En 1999 se analizaron ochenta y cuatro casos de los cuales diez fueron positivos, seis de Izabal, dos de la ciudad capital, uno de Sacatepéquez y uno de San Marcos. Para el año 2000 se analizaron 88 casos de los cuales dos fueron positivos, uno de la capital y uno de Zacapa. En el año 2001 disminuyó la cantidad de casos a sesenta y ocho, no se reportó ni un caso positivo. En el año 2002 aumentó a seis casos positivos de setenta y nueve muestras analizadas. La vigilancia de leptospirosis que se llevó a cabo en el LNS durante el periodo 2003-2009, reporto un total de

mil diecisiete casos sospechosos a leptospirosis, de los cuales sesenta y uno (6%) fueron positivos y novecientos cincuenta y seis (94%) negativos (10).

## 5. Estudios Realizados en Guatemala

La experiencia en humanos en Guatemala, se inicia con 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 Sosa en 1948 y Behar en 1,949 en su trabajo de tesis graduación de la Escuela de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Torres y colaboradores en 1980 presentaron el primer caso de Leptospirosis, para lo cual se envió un cultivo al Centro de Control de Enfermedades (CDC) en donde fue confirmado por la técnica de referencia (MAT) reportando *Leptospira interrogans* serovariedad *copehagenii* (10,16).

En el año 2003 Orantes realizó una comparación entre los métodos de campo oscuro y aglutinación en látex contra la prueba ELISA IgM para el diagnóstico de Leptospirosis en pacientes que asistieron a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios. En esta investigación encontró que la sensibilidad y especificidad de los métodos de aglutinación con látex y campo oscuro eran muy bajas, por lo que ambos métodos no se recomiendan para el diagnóstico de Leptospirosis humana. Además durante el periodo de mayo a octubre del año 2002, se determinó la frecuencia de Leptospirosis que existe en la emergencia de adultos del Hospital antes mencionado, la cual fue del 73.33% en 90 pacientes que presentaron cuadro clínico sugestivo de Leptospirosis (14).

Estrada (2004), estableció el diagnóstico diferencial de leptospirosis humana y dengue, por medio de pruebas inmunológicas, utilizando la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos tipo IgM en ambos casos. Con estas pruebas realizadas se demostró que los habitantes de Escuintla son vulnerables a presentar dengue y leptospirosis humana, por lo que recomendó efectuar el diagnóstico diferencial de estas patologías a pacientes con enfermedad febril, con



el fin de asegurar el diagnóstico temprano de la enfermedad, su adecuado tratamiento y seguimiento. Además resaltó la importancia de investigar las serovariedades circulantes en las diferentes regiones de Escuintla, lo cual permitirá en estudios posteriores identificar los posibles reservorios de la bacteria (17).

En el año 2006, Sikahall estandarizó la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana. En este estudio se analizaron 120 muestras, de las cuales el 25% del total fueron positivas, detectándose las serovariedades *icterohaemorrhagiae* (63.64%), *canicola* (24.24%), *pomona* (6.06%), *bataviae* (3.03%) y *pyrogenes* (3.03%). El 10% del grupo control negativo presentó una reacción positiva a la prueba, demostrando así que la leptospirosis en Guatemala es una zoonosis mas frecuente de lo esperado. El grupo de muestras de pacientes con diagnóstico serológico de dengue (ELISA IgM) no presentó resultados positivos a ninguna de las serovariedades estudiadas, indicando que dichos pacientes no presentaron infecciones mixtas (18).

En los meses de marzo a octubre del año 2007, se estableció la seroprevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro Masagua, Escuintla, considerada una zona con riesgo de sufrir inundaciones en la época de lluvia. La prevalencia se estableció a través de la presencia de anticuerpos anti-leptospira utilizando las pruebas de MAT y ELISA IgG, en 199 humanos mayores de 15 años y de 91 animales domésticos. Se encontró el 51.8% de positividad para humanos y 54.9% para las especies animales, especialmente alta en la población canina 58%, en suinos de 36% y en bovinos 13.2% (19).

Galindo (2008), demostró que el 12.86% de donadores de sangre que asistieron al Hospital General San Juan de Dios, presentó anticuerpos anti-leptospira, por medio de la prueba de MAT. Los serogrupos de *L. interrogans* encontrados en esta población fueron: *icterohaemorrhagiae* (27.27%) *hebdomadis* (27.27%), *sejroe* (18.18%), *canicola* (13.64%) y *bataviae* (13.64%) (20).

## 6. Reservorio

La leptospira se encuentra en animales salvajes como: cebúes, zarigüeyas, mapaches, musarañas, tlacuaches y en animales domésticos como: cabras, ovejas, cerdos, vacas, perros, gatos, y otros, en los cuales la enfermedad puede ser sintomática y asintomática. Como los reservorios mas notables podemos mencionar a: 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 Australia los cerdos parecen ser reservorios de *L. interrogans* serovar *fainei*). Se considera que las ratas y las vacas son el principal reservorio, debido a que el pH alcalino de la orina de estos animales favorece la sobrevivencia de la leptospira ya que 1 mL de orina de vaca puede contener hasta 100 millones de microorganismos. Como el hombre tiene una orina relativamente ácida para la leptospira, se considera un mal reservorio (16, 5, 17, 22, 21).

El vehículo más común de transmisión de este microorganismo al ser humano es el agua dulce, contaminada con orina de animales infectados, siendo una fuente importante de epidemias en nadadores y campesinos. Las aguas estancadas con contaminación alta son desfavorables para que sobreviva la leptospira. Bajo condiciones favorables el microorganismo puede sobrevivir en el agua hasta 183 días. El suelo es también un vehículo importante de transmisión. Algunos trabajos han demostrado que el microorganismo sobrevive hasta 15 días en suelos con orina (21).

## 7. Mecanismo de infección

La infección en humanos ocurre a través del contacto de la piel o membranas mucosas con agua o suelo húmedo, contaminado con orina de animales infectados. Las grietas en la piel facilitan la infección pero no existen estudios previos que hayan cuantificado la correlación entre heridas de la piel y leptospirosis (22, 23, 24).

Las lluvias copiosas e inundaciones, caminar sin zapatos, lavar en ríos y ocupaciones tales como: trabajar en granjas, rastros alcantarillados, ejército y minas, han sido implicadas en infecciones humanas. La transmisión de persona a persona es rara. Los enfermos suelen eliminar leptospira por la orina durante un mes, en algunos casos este período se prolonga hasta 11 meses (27,30, 9, 6).

## **8. Hallazgos patológicos y patogénicos**

La patogenia de la leptospirosis en su mayor parte no se conoce. Esta claro que hay una vasculitis en casos severos. Se sugirió que la capacidad de las espiroquetas de avanzar a través de los tejidos por la corriente sanguínea les permite penetrar en sitios privilegiados, como el humor acuoso del ojo y fluidos cerebro-espinales. 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. Las espiroquetas producen una hemolisina que puede contribuir a la hiperbilirrubinemia, pero es probable que el daño hepático sea más importante. Las anormalidades en el hígado varían de cordones hepáticos distorsionados a focos múltiples de necrosis. El daño renal se concentra en los túbulos contorneados, que experimentan una necrosis focal (4, 22).

Los infiltrados pulmonares son relativamente comunes, pero la enfermedad en general es leve. Se ha descrito leptospirosis como un síndrome de distrés respiratorio del adulto. En la enfermedad puede producirse una pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo en el 90% de los pacientes durante la segunda semana de la enfermedad, pero sólo la mitad de ellos tienen síntomas de una meningitis aséptica. La severidad varía de una infección subclínica a una enfermedad sistémica mortal conocida como enfermedad de Weil. Las características distintivas de la enfermedad de Weil son la ictericia y la insuficiencia renal aguda (4).

El fallo renal es un resultado primario del daño tubular y las leptospiras son comúnmente vistas en el lumen tubular. 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 (27, 34).

Durante la primera semana de infección la leptospira está presente en el líquido cefalorraquídeo (LCR), pero pueden estar ausentes los signos meníngeos. Después, cuando los anticuerpos séricos aparecen, la meningitis pueden desarrollarse, pero pueden no encontrarse leptospiras en LCR. La leptospirosis puede persistir por meses en el humor acuoso, causando ocasionalmente uveítis crónica recurrente. Aunque las 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 (23, 22, 30).

## **9. Manifestaciones clínicas**

La leptospirosis clásica es una enfermedad bifásica, que consiste en una fase septicémica inicial con una duración de 4-7 días y otra inmune secundaria 10-30 días. En casos severos las dos fases se fusionan y puede no reconocerse un intervalo sintomático. Los estudios de trabajadores en una situación de riesgo laboral demostraron anticuerpos sin un episodio reconocido de leptospirosis en el 5% al 16% de los evaluados. En los pacientes en quienes se reconoce una infección por leptospiras, la enfermedad de Weil ocurre en el 5 al 10% (4).

La fase septicémica inicial (4-7 días) de la enfermedad es de comienzo brusco, anunciada por una fiebre de alto grado, cefaleas severas, malestar general y dolores musculares. La presentación característica abarca dolor ocular, fotofobia

y sufusión incluso hemorragia conjuntival. Los pacientes pueden presentar erupciones maculares, maculopapulares, urticarianas o hemorrágicas como petequias (4).

Después de un intervalo asintomático de 1 a 3 días, se desarrolla la fase inmune de la infección (10-30 días), la cual dura entre 4-30 días. Tempranamente en este estado la leptospirosis desaparece de la sangre y LCR, pero puede encontrarse en el riñón, en la orina y el humor acuoso. Esta fase se caracteriza 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 icterica, pueden algunas veces ser aisladas de la sangre por 24-48 horas después de aparecer la ictericia (4, 22).

#### **a. Leptospirosis anictérica o benigna**

Esta común forma de leptospirosis, (ocurre en el 85 - 90% casos); es caracterizada por abruptos episodios de fiebre, dolor de cabeza, severos dolores abdominales, malestar, decaimiento, y en raros casos, colapso circulatorio (26).

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 (10-30 días), la fiebre generalmente no está presente o es baja, con duración de 1-3 días, meningitis aséptica, infiltrados pulmonares y colescistitis (comúnmente en niños). El dolor de cabeza es intenso, frecuentemente palpitante, este es usualmente frontal o bitemporal y puede ser asociado con dolor retrobulbar. Los hallazgos físicos más comúnmente encontrados en la segunda fase son problemas musculares, daño a nivel de conjuntiva, adenopatía, hepatoesplenomegalia y rash. Las manifestaciones incluyen sufusiones de la conjuntiva, fotofobia, dolor ocular y hemorragia conjuntival que son relativamente comunes y son sugestivos del diagnóstico (31).

Los infiltrados pulmonares son relativamente comunes, pero generalmente leves. Se ha descrito leptospirosis que se presenta como un síndrome de distrés respiratorio del adulto. La implicación respiratoria en la leptospirosis, puede ser clasificada como: a.) leve a moderada (20% al 70% de pacientes), con infiltración pulmonar comúnmente asociada con ictericia y mínima alteración de las funciones renales; b.) severa, con ictericia, nefropatía, hemorragias (síndrome de Weil severo), y ocasionalmente muerte debido a falla renal, miocarditis o hemorragias masivas con colapso cardiovascular; c.) hemorragia pulmonar la cual es frecuentemente fatal sin ictericia, nefropatía u otras hemorragia. 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 (32, 33, 34).

En las dos décadas pasadas un número creciente de casos de hemorragias pulmonares por leptospira han sido reportados, especialmente del sudeste de Asia (29).

En un estudio de leptospirosis en Brasil, la muerte estuvo asociada con falla renal en un 76.2%, mientras el 3.5% estuvo relacionado con hemorragias pulmonares. En la epidemia surgida en Nicaragua en 1995 esta forma fue considerada la causa de muerte en los 40 casos reportados (37, 35).

En 1998, en el estado de Yucatán, México, varios casos de leptospirosis anictérica fueron erróneamente diagnosticados como dengue, durante una epidemia de esta virosis (2).

Las leptospiras pueden ser encontradas en el LCR durante el primer estado de la enfermedad, estas desaparecen durante la segunda semana con la aparición de anticuerpos séricos. Puede producirse una pleocitosis en el LCR, en el 90% de los pacientes durante la segunda semana de la enfermedad, pero solo la mitad de ellos tienen síntomas de una meningitis aséptica. El LCR muestra una pleocitosis

moderada de 50-200 células/ml y por rareza cifras más altas. Al principio puede haber predominio de segmentados, pero rápidamente pasa a células mononucleares. Las proteínas por lo general son menores de 120 mg/dl. La glucosa es normal, pero puede estar disminuida (3, 28, 33).

#### **b. Leptospirosis icterica (Síndrome de Weil)**

La severidad de la leptospirosis clásica varía de una infección subclínica a una enfermedad sistémica mortal, conocida como enfermedad de Weil, en homenaje al hombre que describió por primera vez la fiebre icterohemorrágica en 1886. Esta forma severa fue originalmente descrita en infecciones que fueron por serovares icterohemorrágicos (3, 22, 30).

En la fase septicémica (3-7 días) los síntomas son similares a la forma anictérica. En la fase inmune (10-30 días) se presenta ictericia "Reddish" o ictericia "Rojiza" por presentar (ictericia+conjuntivitis+vasculitis cutánea), además existe daño renal, oliguria o anuria en casos muy raros, incremento en nitrógeno de urea (BUN) y creatinina en suero, con niveles normales o disminuidos de potasio en suero, los niveles de bilirrubina sérica (directa) es usualmente debajo de 20 mg/100mL. 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 (24, 27).

La combinación de la elevación de marcadores séricos de CK con leve elevación de las transaminasas en pacientes con ictericia puede 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 es la colecistitis aguda la cual requiere cirugía (29, 32, 33).

Pueden presentarse manifestaciones hemorrágicas como epistaxis, petequias, rash, hemorragia pulmonar y gastrointestinal. Los pacientes con ictericia severa, son los que mayormente se relacionan con presentaciones de

fallo renal, hemorragias y colapsos cardiovasculares. El análisis de orina es anormal, con proteinuria y hematuria. La azotemia usualmente aparece durante la segunda semana. Los niveles de nitrógeno de urea (BUN), raramente exceden los 100 mg/100mL y la Creatinina sérica los 8 mg/dL. Además hay sangrado a nivel de las glándulas suprarrenales y el SNC. Esta tendencia hemorrágica se puede explicar por la vasculitis generalizada, la trombocitopenia está presente hasta en 50% de los casos y en menor grado por la hipotrombinemia. El compromiso de la función renal debido principalmente a una necrosis tubular aguda y a otros mecanismos ya discutidos, pueden llevar al paciente a azotemia severa, recurriéndose en la mayoría de estos casos a diálisis peritoneal o hemodiálisis. El colapso cardiovascular por lo general es la causa de muerte en estos pacientes. En el desarrollo de esta complicación se han implicado factores tipo endotoxinas (27, 22, 29, 30). Los primeros casos de leptospirosis icterica en México en 1920, fueron reportados por Noguchi y Klieger, encontrando 6 casos positivos en 56 pacientes con ictericia, aislando el serotipo *pomona*. En el año 1977 un número de casos severos (síndrome de Weil) fueron reportados con un desenlace fatal (2).

En un estudio realizado en el mes de marzo del 2001, en Buenos Aires Argentina, se notificó casos de pacientes con ictericia severa, nefropatía y hemorragias (Síndrome de Weil), que ocasionalmente produjeron la muerte por insuficiencia renal, miocarditis, y hemorragias masivas con colapso cardiovascular; y hemorragia pulmonar (8).

El compromiso pulmonar en leptospirosis humana frecuentemente se manifiesta por síntomas respiratorios, pero la neumonía comúnmente no es una manifestación clínica frecuente, ni fulminante. En otro estudio llevado a cabo en Quilmes, Buenos Aires, Argentina, se reportó una epidemia de leptospirosis de cuarenta y siete casos, cuatro pacientes murieron con sospecha de leptospirosis icterica, de los cuales 3 fueron confirmados, también se reportaron dos casos por hemorragia pulmonar letal. En leptospirosis graves la miocarditis y/o pericarditis



son causadas por la vasculitis o bien responden a los trastornos metabólicos propias (32, 36, 37).

## 10. Diagnóstico de Laboratorio

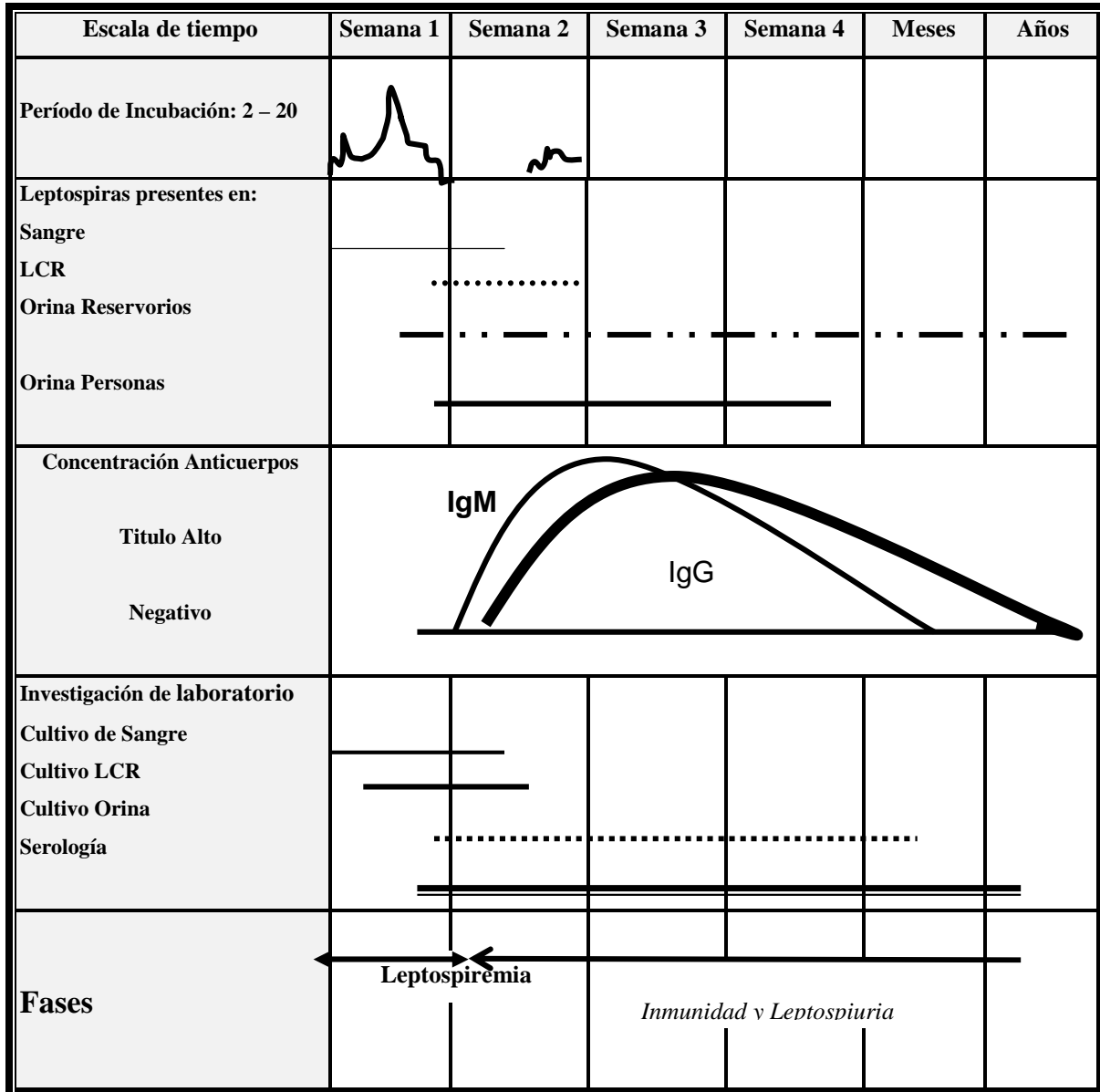
- a. **Observación directa de leptospiras:** Se realiza a través del examen microscópico en campo oscuro de sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y biopsias. Es el primer paso que realiza el microbiólogo para el diagnóstico sugestivo de leptospirosis. Tiene la desventaja de poseer una baja sensibilidad y especificidad (38,39, 40).
- b. **Cultivo:** Las leptospiras son bacterias exigentes que para su crecimiento requieren condiciones nutricionales adecuadas, además de ser incubadas en condiciones de aerobiosis, pH y temperatura óptimos, para lo cual es necesario que el microbiólogo posea pleno conocimiento de la dinámica de la enfermedad (39).

En la evolución clínica se reconocen 2 fases: la primera conocida como la fase leptospirémica o septicémica, ocurre durante el primer estadio de la enfermedad (aproximadamente entre el 4to. y 7mo. día), antes de la aparición de los síntomas y hasta el fin de la primera semana de la enfermedad aguda. Después de un lapso de quietud de 1 a 3 días, se inicia la segunda fase "inmune", que cursa con signos y síntomas diversos, aunque también puede ser asintomática. Los hemocultivos (en medios semisólidos) deben ser tomados durante el período febril agudo de la fase septicémica (entre el primer y séptimo día), antes del inicio de la terapia antibiótica (39).

La leptospiruria se inicia en la segunda semana de enfermedad sintomática y puede durar varias semanas. La viabilidad de las leptospiras en orinas humanas y de animales domésticos es limitada, por lo que deben procesarse inmediatamente. El aislamiento es importante no sólo para

confirmar la presencia del agente sino también para la obtención de material que permita identificar el serovar al que pertenece la cepa implicada (Figura 1) (41, 33, 42).

**Figura 1.** Dinámica de la Leptospirosis.



Tomado de: Céspedes MZ, Araujo MG. 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. 53p

Para el aislamiento de la *Leptospira* pueden utilizarse muestras de líquido cefalorraquídeo, orina, sangre completa, biopsia de hígado, riñón, pulmón y cerebro (43).

- c. **Métodos Serológicos:** La mayoría de casos son detectados por serología, siendo importante el uso de reactivos que detecten las serovariedades más comunes de la región. Los anticuerpos son detectables en sangre aproximadamente una semana después de inicio de los síntomas. Existen varias pruebas para la determinación de anticuerpos contra leptospira, tales como la técnica de aglutinación microscópica (MAT), fijación del complemento(FC), hemaglutinación(HA), inmunofluorescencia y ELISA (39).

Se debe recordar que la detección de anticuerpos aglutinantes por diferentes métodos serológicos aplicados al diagnóstico de esta enfermedad, se ve afectada por una terapia agresiva, temprana e indicada antes de la toma de la primera muestra. Aunque la respuesta individual de cada persona, también es un importante factor influyente en la detección de estas inmunoglobulinas, el diagnóstico clínico se hace muy difícil en numerosas ocasiones y necesita la confirmación microbiológica para declarar un caso como positivo (45, 43).

1. **Hemaglutinación Pasiva:** Está técnica posee una sensibilidad del 92% y una especificidad del 95%, es una prueba rápida y de bajo costo, que detecta anticuerpos de tipo IgM, siendo de gran ayuda en el diagnóstico de las infecciones recientes. Para la realización de esta prueba se utiliza sueros pareados lo que significa que debe tomarse una primera muestra de suero durante los primeros 7 días de la infección y debe haber una segunda muestra a los 10 – 15 días después (43, 44).
2. **Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT):** Se conoce a nivel internacional por sus siglas en Inglés -MAT- que significa Microscopic Agglutination Test. Es el método de referencia para la confirmación serológica de una infección reciente y pasada de

leptospirosis, en esta prueba la muestra del paciente se enfrenta con suspensiones de leptospiras vivas de los distintos serovares. Es utilizada para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-leptospiras aglutinantes presentes suero o plasma, identificar cepas presentes en aislamientos y servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad. La prueba detecta anticuerpos totales (IgG e IgM) (39, 45, 47, 40, 46).

Para la realización de la prueba de MAT, se utilizan cultivos de los serovares de leptospiras con 12 a 15 días de desarrollo en medio EMJH líquido o Fletcher, antes de emplearse hay que comprobar la pureza de cada cepa y su morfología, además, de la concentración de los microorganismos que se debe ajustar aproximadamente de 1 a  $2 \times 10^6$  leptospiras/mL (39).

La batería que se usa como antígeno debe estar representado por los serovares más prevalentes del área. Sin embargo, en aquellas regiones en donde no se conoce los serovares circulantes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda por lo menos una cepa de referencia de los serovares más representativos de las especies más frecuentes (Tabla 2) (45, 47,46).

La reacción de aglutinación que se lleva a cabo en la prueba de MAT, se observa en el microscopio de campo oscuro y su interpretación se basa en que el punto final de la prueba es la dilución más alta del suero donde el 50% de la aglutinación ocurre. Debido a la dificultad de detectar que el 50% de las leptospiras están aglutinadas, el punto final es determinado por la presencia de aproximadamente el 50% de leptospiras libres no aglutinadas en comparación a la suspensión control (39, 47).

**Tabla 2.** Serovares de Referencia utilizados como antígenos para la prueba de aglutinación microscópica (MAT).

<b>Especie</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Serovar</b>	<b>Cepa</b>
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. noguchii</i>	Australis	Nicaragua	1011
<i>L. interrogans</i>	Autumnales	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	HondUtrechIV
<i>L. weillii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. Kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia
<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LSU 1945
<i>L. weillii</i>	Manhao	quingshui	L105
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. meyeri</i>	Ranarum	ranarum	ICF
<i>L. weillii</i>	Sarmin	Sarm111	Sarmin
<i>L. borgpetersenii</i>	Serjoe	sejroe	M84
<i>L. interrogans</i>	Serjoe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Serjoe	wolffi	3705
<i>L. biflexa</i>	Samaranga	Patoc	Patoc I
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K

**Tomado de:** Human Leptospirosis Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Washington DC: OPS, ILS, 2003.

Esta metodología tiene la desventaja de que está restringida a laboratorios que sean capaces de mantener cepas para la preparación de los antígenos vivos, además de ser una técnica muy compleja de controlar, ejecutar e interpretar, la manutención de cultivos vivos puede presentar un riesgo para los trabajadores del laboratorio. Otra desventaja que presenta este método es el riesgo de contaminación cruzada de los cultivos de los antígenos, necesitando verificaciones periódicas de cada serovar (47, 46).

La interpretación de la prueba del MAT es complicada por la alta relación de reacciones cruzadas que ocurren entre los diferentes serogrupos, especialmente en muestras recolectadas durante la fase aguda. Es importante señalar que se requieren de sueros pareados

para confirmar el diagnóstico con certeza (39, 40). El Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta –CDC- al igual que la Organización Mundial de la Salud –OMS-, definen como caso probable de leptospirosis al hallazgo de un título mayor o igual a 100, junto con la enfermedad clínicamente compatible (45, 38).

- 3. Prueba de aglutinación macroscópica:** En esta técnica, el antígeno que se usa es una suspensión densa de leptospiras, preparadas a partir de un serovar patógeno y que ha sido tratado por métodos físicos con la finalidad que exprese la mayor cantidad de sitios antigénicos de la bacteria y pierda la especificidad del serogrupo. Esta prueba ha sido elaborada como tamizaje para el diagnóstico serológico de la leptospirosis en humanos y animales. La especificidad de esta prueba es limitada en comparación con la prueba de MAT, además, todos los resultados positivos con esta prueba deben ser confirmados con la misma (45, 40, 48).
- 4. Prueba de ELISA indirecto IgM:** Es el método más utilizado para detectar leptospirosis en su fase aguda, también es utilizada como prueba adicional o como una alternativa a la prueba de MAT. Utiliza un solo antígeno o pool de antígenos, se pueden determinar anticuerpos IgM frente a varios serovares antigénicamente relacionados. Se ha desarrollado una gran variedad de estudios que comparan las pruebas de ELISA y MAT, en los cuales se ha demostrado una concordancia muy alta. Los sueros positivos deben ser confirmados mediante la técnica de MAT (48, 49).
- 5. Prueba de ELISA indirecto IgG:** Está técnica es utilizada para estudios epidemiológicos como una prueba adicional a la prueba de MAT. Los anticuerpos del tipo IgG son los que se presentan posteriormente a los anticuerpos de tipo IgM. Cuando los anticuerpos

IgG están presentes en el suero, se combinan con el antígeno de *Leptospira* (antígeno total) fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. El principio es el mismo que del ELISA IgM. Al igual que las otras pruebas antes mencionadas esta también debe confirmarse con MAT (39, 40, 49).

**6. Lepto dipstick:** Recientemente se desarrolló esta prueba en Cuba, la cual es muy sencilla y rápida de realizar y permite la detección de anticuerpos IgM específicos a *Leptospira*, sin necesidad de un equipamiento especial. 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 es específicamente detectada por un conjugado anti – IgM humana, y que se visualiza mediante una tinción al revelar las bandas. La intensidad de la tinción es importante para la interpretación de los resultados. La banda de control interno permite comprobar la integridad de los reactivos de detección y la presencia de suero. La detección de anticuerpos con esta prueba se da entre los 5 – 10 días del comienzo de la enfermedad. Estudios realizados con la prueba han reportado valores de sensibilidad que oscilan desde 60 hasta 93% y de especificidad desde 88 hasta 94%, aunque depende de la etapa en que se encuentre el paciente. Al compararla con la prueba de MAT coincidió en un 85.4% de los resultados (52).

**7. Identificación del genoma por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Actualmente en el Laboratorio Nacional de Salud, a las muestras de los pacientes con menos de 6 días de sintomatología se les realiza la prueba de PCR mediante la

amplificación de una secuencia de ADN de leptospira específica. Las muestras pueden ser: suero, orina, saliva y heces. Una de las mayores desventajas es que es una técnica muy cara, pero de gran utilidad para el diagnóstico de leptospirosis, ya que permite demostrar la presencia del agente en los primeros 8 días de la enfermedad. Con las pruebas que detectan anticuerpos, hay que esperar a que estos aparezcan en un título significativo, lo que ocurre hasta después de 8 a 10 días de iniciados síntomas, mientras que el cultivo de leptospiras puede llegar a tardar hasta dos meses para presentar crecimiento. La prueba de PCR tiene una gran sensibilidad ya que puede detectar la presencia de dos o tres copias de la secuencia buscada, así como también especificidad ya que reconoce género, especie y variedad de un microorganismo en unas cuantas horas (55, 39).

- 8. Inoculación en animales de Laboratorio:** Puesto que la inoculación directa en medios de cultivo no siempre permite aislar el agente, se inocula en cobayos o hámsters para aumentar el número de leptospiras aisladas. Esta prueba se basa en el hecho de que las leptospiras invaden rápidamente el torrente sanguíneo cuando se inoculan por vía intraperitoneal, mientras que las otras bacterias necesitan más tiempo para efectuar el mismo proceso, siendo esta técnica utilizada para estudios de investigación de leptospirosis (39, 40).

La muestra clínica sospechosa (sedimento de orina, sangre) se inocula por vía intraperitoneal; después de 3 a 6 días de la inoculación, el animal debe presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad que pueden consistir en disminución de peso, pelo erizado, fiebre, diarrea o daño neurológico. Posteriormente se inyecta por vía intraperitoneal 2 mL de solución salina amortiguada y



con la misma jeringa se toma una muestra del exudado. Se hace una preparación entre porta y cubreobjetos y se observa al microscopio de campo oscuro. Si hay abundantes leptospiras se sacrifica al animal y se obtienen fragmentos de hígado, riñones y pulmones y se procede a sembrar para su posterior identificación (39).

- 9. Titulación de anticuerpos:** En casos donde no se puede aislar el agente o para verificar el éxito del tratamiento, se realizan titulaciones de anticuerpos anti-leptospira. Deben utilizarse obligadamente pares de sueros obtenidos el primero durante el cuadro agudo y el segundo en la convalecencia (39, 40, 52).

## **11. Tratamiento**

El tratamiento antibiótico específico utilizado es la penicilina u 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. El tratamiento de la leptospirosis difiere ya que depende de la severidad y duración de los síntomas en el tiempo en que se presentan (53).

Pacientes con síntomas leves requieren solamente tratamiento sintomático, pero debería tenerse cuidado para solicitar posteriormente ayuda médica si ellos desarrollan ictericia. Pacientes que se presentan con leptospirosis anictérica requieren que se ingresen a un hospital bajo observación. Si el dolor de cabeza es particularmente severo, una punción lumbar produce un mejoramiento significativo. 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 requieren diálisis con motivo de urgencia (53).

La doxaciolina (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 (53).

En febrero de 2,001 en Francia, un paciente fue diagnosticado con leptospirosis, presentaba dolor de cabeza intenso, hepatomegalia, confusión y conjuntivitis. El examen neurológico determinó signos de irritación meníngea, incluida rigidez cervical y fotofobia. El paciente recibió como tratamiento amoxicilina 12 g/día por vía intravenosa, por 10 días, mostrando una gran mejoría. La fiebre disminuyó el 4º día y el paciente se recuperó al séptimo día (5, 21).

En un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina 2,001, se reportaron 47 casos de leptospirosis humana. Dos pacientes de sexo femenino, mostraron enfermedad febril, neumonía severa, sin ictericia y trombocitopenia. Por las características sintomatológicas, para una de ellas el tratamiento fue de 4 g de ceftriaxona más un gramo de eritromicina diario, en el otro caso la dosis de antibióticos fue de ciprofloxacina 800 mg/7días. El tratamiento administrado a cada una de ellas no mejoró su cuadro, al realizarles un examen de endoscopía mostró lesiones en el lumen bronquial y el aspirado abundantes secreciones hemorrágicas. Las dos pacientes fallecieron por colapso cardiovascular, después de 10 -11 días de iniciada la enfermedad (8).

## **12. Inmunización**

La inmunidad hacia la leptospirosis es mayormente humoral y esta relacionada 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. Una de las medidas importantes de prevención de la leptospirosis humana, además de la utilización de medios de protección para los trabajadores expuestos, es la inmunización, con una vacuna que contenga las serovariedades circulantes en la región; dicha vacuna, aunque

no se ha aplicado ampliamente en el mundo, se ha utilizado con buenos resultados en algunos países como China, Israel, Polonia y Rusia (56, 57).

En Cuba desde 1,983 hasta 1,991, fecha en que se abandonó la vacunación, fueron inmunizados con una vacuna de procedencia rusa todos los trabajadores expuestos al riesgo. Con el objetivo de continuar la inmunización de los grupos en riesgo del país, en el Instituto Carlos Finlay centro de investigación, producción de vacunas y sueros, se desarrolló una vacuna coadyuvada con cepas autóctonas de gran importancia epidemiológica por ser las de mayor circulación (55).

En los ensayos preclínicos se obtuvieron resultados favorables en las pruebas de toxicidad e inmunogenicidad, lo que permitió iniciar los ensayos clínicos en humanos. La morbilidad por leptospirosis humana en la provincia de Holguín (Cuba), ha presentado una tendencia ascendente y a partir de 1992 hasta 1995 se ha observado un aumento marcado de la notificación de casos. La eficacia de la vacuna puede comprobarse epidemiológicamente comparando el riesgo relativo de adquirir la enfermedad de individuos vacunados y no vacunados. El desarrollo de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana respondió a una necesidad epidemiológica del país, dada la elevada incidencia de la enfermedad (59, 60).

## **B. DENGUE**

### **1. Generalidades**

El dengue es una infección viral aguda y sistémica que se transmite de una persona a otra por medio del piquete de la hembra del mosquito hematófago del género *Aedes* y de la especie *aegypti* principalmente. *Aedes aegypti* (Linneo) es una de las principales especies de mosquito en el ecosistema urbano. Originario del África, se encuentra distribuido y adaptado a las regiones tropicales y subtropicales del mundo, es vector del virus del dengue. El virus pertenece a los Arbovirus, del grupo de los Flavivirus. Fue aislado por Sabin en Hawai en 1,944 a partir de sangre humana y se denominó dengue 1. Ese mismo año, Sabin aisló el tipo 2 en Nueva Guinea. Los tipos 3 y 4 fueron aislados durante la fiebre hemorrágica en Manila en 1956. En Guatemala, la presencia del virus del dengue se conoce desde 1972. La enfermedad en su forma clásica presenta altas tasas de morbilidad, mientras que la forma hemorrágica causa mayor mortalidad. Las infecciones virales por dengue causan un aspecto de enfermedades que varía desde el proceso asintomático a la fiebre indiferenciada o al dengue clásico y de esta a la fiebre hemorrágica. El periodo de incubación es de 3-8 días (3 como mínimo y 14 máximo) (2, 61, 62).

El cuadro clínico se caracteriza por comienzo brusco, fiebre alta (40° C), mialgias y artralgias intensas, exantema y ataque al estado general. El período de incubación oscila entre 3 y 8 días, con una variación de 2.5 a 15 días, seguida de síntomas prodrómicos generales. El inicio clínico es brusco, persiste por 5 ó 6 días y habitualmente culmina en crisis, por lo que se le ha conocido como “fiebre de los 5 días”. La hipertermia se acompaña de cefalea intensa, dolor retrocular, dolor de músculos y articulaciones con calorfrío moderado, la alteración del sentido del gusto es frecuente al inicio de la enfermedad. Puede haber astenia, mareos, fotofobia, diaforesis, ardor de garganta, tos, epistaxis, hiperestesia, dolor inguinal, testicular y ocasionalmente delirio (62).

## **2. Agente Etiológico**

El virus del dengue pertenece a la familia Flaviviridae. Con métodos serológicos se pueden distinguir cuatro serotipos, que se designan como dengue 1, dengue 2, dengue 3 y dengue 4. La infección en el hombre por determinado serotipo produce inmunidad para toda la vida contra la reinfección para ese serotipo, pero sólo protección temporal y parcial contra los otros. Todos los serotipos han sido aislados de casos autóctonos de la Américas (12).

## **3. Distribución del Vector**

*Aedes aegypti* es una especie tropical y que se encuentra en todo el mundo, por lo general limitada a las latitudes comprendidas entre 35° norte y 35° sur, correspondientes a una isoterma de invierno de 10° C. La distribución de *Aedes aegypti* también está limitada por la altitud. Aunque generalmente no se encuentra por encima de los 1,000 metros SNM (13).

La aparición del dengue y del dengue hemorrágico en América Latina siguió a la reinfestación por *Aedes aegypti* en la mayoría de los países de donde este vector había sido erradicado (15).

## **4. Epidemiología**

Si bien desde 1,981 en adelante, 25 países de las Américas habían notificado experiencias con el dengue hemorrágico, hasta febrero del 1,998 la mayoría de casos (52.5%) y las muertes (36%) se habían registrado solamente en Venezuela (63).

En 1990 hubo un significativo incremento en la ocurrencia de epidemias de dengue en Brasil – 560 mil casos en 1998. Actualmente, las notificaciones permanecen en más de 200 mil casos, con la circulación de serotipos 1 y 2 en 18 estados y el aislamiento de un tercer serotipo –DEN3- en la ciudad de Río de Janeiro en enero de 2001. Las poblaciones más afectadas fueron las de los niños

y adolescentes. En 1,999 se investigó una epidemia de la enfermedad que afectó Nuevo Laredo, Tamaulipas, México y Laredo, Texas, Estados Unidos, así como ciudades contiguas que comparten la línea fronteriza (2, 5, 3, 6).

El primer caso reconocido de dengue hemorrágico en la Guyana Francesa ocurrió en 1992. En enero de 1997, Cuba notificó un brote de dengue 2 en el municipio de Santiago de Cuba. Colombia, en el año de 1997 presentó una epidemia de 330 casos que se extendió a 1998 con 284 casos. Las poblaciones más afectadas fueron las de los niños y adolescentes. En 1999, se investigó una epidemia de la enfermedad que afectó Nuevo Laredo, Tamaulipas, México y Laredo, Texas, Estados Unidos, así como ciudades contiguas que comparten la línea fronteriza (10, 7, 5, 6, 3, 4).

## **5. Reservorio**

*Aedes aegypti*, una especie del subgénero *stegomyia*, se originó probablemente en África, donde existen formas selváticas y domésticas, mientras que en las Américas sólo se encuentran las formas domésticas. Parece probable que fuera transportado por buques del Viejo al Nuevo Mundo en barriles de agua durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas. *Aedes aegypti* se conoce comúnmente como el mosquito de la “fiebre amarilla” porque durante siglos esta especie transmitió la fiebre amarilla urbana, un grave problema de salud pública en África y las Américas (9).

En el Nuevo Mundo, *Aedes aegypti* es ante todo una especie “doméstica” que infesta los recipientes naturales o artificiales encontrados en las viviendas humanas o en sus cercanías. La hembra se alimenta sobre todo de sangre humana y de la de los animales domésticos. Este mosquito raras veces se encuentra a más de 100 metros de las casas, aunque se han notificado excepciones en las Indias occidentales y en la parte meridional de los Estados Unidos (14). Se pueden distinguir cuatro serotipos, que se designan como dengue 1, dengue 2, dengue 3 y dengue 4 (9).

## 6. Mecanismos de Transmisión

La enfermedad se propaga por la picadura de la hembra de *Aedes aegypti* infectada, que ha adquirido el virus al ingerir la sangre de una persona con dengue. El zancudo infectado transmite la enfermedad al picar a otras personas, que también se enferman (64, 65).

### a. Macrofactores determinantes de la transmisión del dengue: factores de riesgo ambiental y social.

#### i. Ambientales

- Latitud: 35° N a 35° S
- Altitud menor a 2,200 mts.
- Gama de temperatura ambiente: 15° C – 40° C
- Humedad relativa : de moderada a alta

#### ii. Sociales

- Densidad de la población : de moderada a alta
- Patrones de asentamiento: Urbanización no planificada y densidad de asentamiento elevada.
- Vivienda: Tejidos de alambre inadecuados o inexistentes, y desagües obstruidos con desechos.
- Aprovechamiento de agua: agua almacenada en la casa por más de 7 días, ausencia de abastecimiento de agua corriente individual, disponibilidad intermitente y uso de toneles o tanques destapados.
- Recolección de desechos sólidos: envases de almacenamiento inadecuados, recolección inadecuada o inexistente, recipientes pequeños en desuso de menos de 50 litros, neumáticos o pilas de neumáticos desechados, y automóviles abandonados.
- Estado socioeconómico
- Períodos inactivos en la casa durante el día
- Creencias y conocimientos sobre el dengue (63,64).

**b. Microfactores determinantes de la transmisión del dengue:** factores de riesgo de hospederos, agentes y vectores.

**i. Factores individuales del hospedero**

- Sexo
- Edad
- Grado de inmunidad
- Condiciones de salud específicas
- Ocupación

**ii. Factores del agente de la enfermedad**

- Nivel de viremia
- Factores de los vectores
- Abundancia y focos de proliferación de mosquitos
- Densidad de hembras adultas
- Edad de las hembras
- Frecuencia de la alimentación
- Preferencia de hospederos
- Disponibilidad de hospederos
- Susceptibilidad innata a la infección

Luego de una ingestión de sangre infectante, el mosquito puede transmitir el agente después de un período de 8-12 días de incubación extrínseca (66, 67).

El zancudo del dengue es el *Aedes aegypti*, es un pequeño insecto blanquinegro, con rayas en el dorso y patas. Los zancudos infectados transmiten la enfermedad a la persona que pican (12).

Como no hay manera de saber si un zancudo transporta o no el virus del dengue, las personas deben de tratar de evitar toda clase de picaduras y sobre todo evitar la proliferación de zancudos, controlando sus criaderos (64, 65).



Pican de preferencia en las primeras horas de la mañana y al final de la tarde. La hembra se alimenta sobre todo de sangre humana o de animales domésticos. Debido a su estrecha asociación con el hombre, *Aedes aegypti* es un zancudo urbano. La ingestión de sangre proporciona una fuente de proteínas para el desarrollo de los huevos. Las superficies de reposo preferidas por el zancudo son las paredes, los muebles y objetos colgantes como ropa, toallas y cortinas. Los huevos de *Aedes aegypti*, se adhieren a la superficie interna de los recipientes en la parte húmeda, apenas por encima del nivel del agua. El desarrollo embrionario normal se completa en 48 horas, una vez completo, los huevos pueden resistir largos períodos de sequedad, a veces durante más de un año. Cuando se vuelven a mojar los huevos la mayoría eclosionan. Los recipientes preferidos por las hembras para poner sus huevos son toneles, tanques, pilas, tinajas, botes, floreros y llantas. Las larvas pasan por cuatro estadios cuya duración depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y densidad larvaria del recipiente, variando entre 6 y 12 días, dependiendo de las condiciones ambientales (62, 64, 65).

## **7. Hallazgos Patológicos y Patogénicos**

La fiebre por dengue y sus principales manifestaciones clínicas, como fiebre, dolores osteo-mio-articulares, vómitos y exantema, responde a mecanismos fisiopatológicos comunes a otras enfermedades agudas causadas por virus. La forma clínica fiebre hemorrágica dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) tiene como característica diferencial la extravasación de líquidos a través de los endotelios, expresada en derrames en cavidades serosas, edema, hemoconcentración y choque. También están presentes sangrados, trombocitopenia y otras alteraciones de la sangre, así como la afectación visceral (hígado, corazón, encéfalo) y de los linfocitos y órganos linfoides. Estas alteraciones se deben no a un mecanismo único sino diverso, no totalmente aclarado, cuyos componentes coinciden en el tiempo y se expresan como un todo en cada paciente, pero con particularidades en cuanto a su intensidad y localización (68).

En general, estos mecanismos fisiopatológicos pueden resumirse en:

- a. **Acción directa del virus sobre las células:** La unión de virus a células depende de diferentes receptores a la superficie celular. Cuando se trata de un dengue secundario, la infección de algunas células se facilita por adherencia inmune mediada por anticuerpos antidengue en células con receptores FC para las inmunoglobulinas; ya dentro del monocito, se produce una elevada replicación viral y después la subsecuente liberación de gran cantidad de virus, lo que determina la viremia aumentada que infecta muchas células en hígado, médula ósea, bazo y demás órganos y tejidos (66, 69).
  
- b. **Acción de anticuerpos específicos directamente o mediante la activación del sistema del complemento:** En la fiebre amarilla, los anticuerpos contra proteínas NS1 hace que las células hepáticas infectadas queden sensibilizadas para la acción citolítica mediada por el complemento. Probablemente esto también ocurra en el dengue. En el suero de pacientes con fiebre hemorrágica de dengue y síndrome crónico de dengue, tomados durante la fase aguda de la enfermedad, se han encontrado niveles aumentados de IgG-1 fijadora de complemento, en comparación con los existentes en pacientes con fiebre por dengue 3. Algunos componentes del complemento, como C3a y C5a son potentes anafilatoxinas que pueden causar o contribuir al choque (69).
  
- c. **Acción de Linfocitos T citotóxicos:** La respuesta inmunológica estudiada en voluntarios humanos infectados por virus dengue permitió constatar la elevación de interferón gamma (INF-gamma), del receptor soluble de Interleuquina 2, CD4 soluble e interleuquina 2 durante el periodo de viremia. Posteriormente se apreció la elevación de linfocitos CD8. Todo lo cual ratifica que las células T son activadas *in vivo* por la infección del dengue.

Los linfocitos T citotóxicos pueden provocar la lisis de células diana mediante un periodo de apoptosis (70).

- d. Acción de citoquinas y otros mediadores:** Las funciones de los linfocitos T citotóxicos son moduladas por la (IL-2 e IL-7) y por el IFN-gamma. También la interleucina 8 participa en estos mecanismos, así como la interleucina 1 y un inhibidor de la misma que pueden causar inmunosupresión y participar en el proceso de la infección por virus dengue (71).

Todos estos mecanismos de acción van a ser influenciados por algunos factores del virus, como son el tipo de cepa infectante, las diferencias en su estructura genómica y la dosis infectante o multiplicidad de la infección; así como por factores del hospedero, como son las particularidades de restricción del antígeno leucocitario humano (HLA) o antígeno mayor de histocompatibilidad propias de cada ser humano, las diferencias individuales (polimorfismo) para un número de receptores Fc gamma, la respuesta anamnésica a la infección por otro serotipo del virus dengue, así como la edad y la estructura genética del hospedero que influye en la producción de citoquinas (70).

- e. Extravasación capilar, choque y edema pulmonar:** En los enfermos con dengue hemorrágico se ha demostrado el aumento de la permeabilidad intravascular, utilizando métodos no invasivos (Pletismografía). Los virus del dengue son capaces de infectar y replicarse en cultivos de células endoteliales, siendo la infección viral dependiente de la multiplicidad de la infección (71).

Los monocitos y macrófagos tisulares producen moléculas bioactivas capaces de influir en el funcionamiento de muchos tejidos entre estas moléculas están el factor de necrosis tumoral (TNF alfa o caquectina) y la

IL-1, cada una de las cuales va a actuar a nivel de receptores específicos en hígado, riñones, pulmones y otros órganos induciendo respuesta a nivel celular caracterizadas por una despolarización de los potenciales de la membrana de las mismas, que se traducen entre otros efectos, en un escape de líquidos, hemoconcentración, choque, acidosis y daño multivisceral (71).

- f. Hemorragias, trombocitopenias y otras alteraciones en la sangre:** Las hemorragias en el dengue son un fenómeno multicasual: diapedesis, trombocitopenia, alteración de los mecanismos de la coagulación y otros. Hoy se acepta que los mecanismos que determinan trombocitopenia en el curso de infecciones virales también pueden ser multifactoriales entre ellos:
- a) La penetración del virus en las plaquetas o sus precursores los megacariocitos, los cuales ofrecen un medio adecuado para la replicación viral; este mecanismo fue propuesto para el dengue en la década de 1,960;
  - b) los virus pueden fijarse o adsorberse a las plaquetas provocando su agregación o degranulación, lo cual puede conducir a trombosis intravascular con depleción de las plaquetas y factores de coagulación; y c)
- mecanismos de tipo inmunológico (72).
- g. Daño hepático:** El hígado es uno de los órganos más frecuentemente afectados durante la FHD y donde se aprecia alteraciones más importantes. No obstante, aún no se conoce con exactitud el mecanismo patogénico del daño hepático y más aún se desconoce la participación del hígado en la cascada patogénica de la FHD/SCD (69).
- h. Afectación del sistema nervioso central:** Se ha hablado indistintamente de encefalitis o encefalopatía por dengue para referirse a paciente con síntomas y signos neurológicos muy variados en el curso de esta enfermedad. Algunos de estos casos cumplen los criterios para la FHD, otros no. La afectación de la conciencia ha variado desde la somnolencia y confusión hasta el coma. Se ha referido convulsiones, espasticidad,

parálisis, signos extrapiramidales. A veces el paciente ha sido hospitalizado con el diagnóstico inicial de meningitis aséptica y diagnosticado después como dengue (71).

- i. **Daño órganos linfoides:** La activación de endonucleasas que resultan en formación de fragmentos de ADN de aproximadamente 180bp constituyen los cambios a nivel molecular que evidencian que la apoptosis, a diferencia de la necrosis, es un modo activo de muerte celular, que requiere de síntesis de ARN y proteínas. La apoptosis puede presentarse en distintos tipos de condiciones. Una de ellas es cuando ocurre muerte celular a partir de estímulos patológicos de naturaleza química, física o biológica (71).
  
- j. **Daño al miocárdico:** La lesión cardíaca se hace evidente por la frecuencia con que encuentran alteraciones electrocardiográficas en los pacientes graves. Existen informaciones sobre enfermedad cardíaca producida por arbovirus (miocarditis y miocardiopatía) incluidos pacientes que tuvieron dengue. Actualmente, se reconoce un componente inmunológico en casi todas las miocarditis producidas por virus, lo cual podría ser el caso de las encontradas en el dengue. Tempranamente durante la fase aguda, los antígenos virales se expresan en la superficie de la célula miocárdica y se convierten en dianas de monocitos y macrófagos, los cuales se adhieren y liberan mediadores, así como de linfocitos T citotóxicos que producen daño miocárdico. También se produce activación del complemento a partir de los complejos virus-anticuerpos, que contribuyen a la destrucción celular (70).

## 8. **Manifestaciones clínicas.**

El cuadro clínico se caracteriza por comienzo brusco, fiebre alta (40° C), mialgias y artralgiyas intensas, exantema y ataque al estado general. El período de incubación oscila entre 3 y 8 días, con una variación de 2.5 a 15 días, seguida de síntomas prodrómicos generales. El inicio clínico es brusco que persiste por 5 ó 6 días y habitualmente culmina en crisis, por lo que se le ha conocido como “fiebre

de los cinco días”. La hipertermia se acompaña de cefalea intensa, dolor retrocular, dolor de músculos y articulaciones con escalofrío moderado, la alteración del sentido del gusto es frecuente al inicio de la enfermedad. Puede haber astenia, mareos, fotofobia, diaforesis, ardor de garganta, tos, epistaxis, hiperestenia, dolor inguinal, testicular y ocasionalmente delirio (62).

- a. Dengue clásico:** Las características clínicas de la fiebre del dengue dependen a menudo de la edad del paciente. Los lactantes y preescolares pueden sufrir una enfermedad febril indiferenciada con erupción maculopapular. Los niños mayores y los adultos pueden tener una enfermedad febril leve o bien la clásica enfermedad incapacitante de inicio abrupto, fiebre alta, cefalea intensa, dolor retroorbital dolores musculares y articulares y erupción cutánea. Las hemorragias de la piel (con prueba del torniquete positiva, petequias o ambas) no son raras. Es frecuente la leucopenia y en ocasiones se observa trombocitopenia. La tasa de mortalidad es sumamente baja (14).

Muchas epidemias de fiebre del dengue se asocian a complicaciones hemorrágicas tales como epistaxis, hemorragia gingival, hemorragia gastrointestinal, hematuria e hipermenorrea. Es importante diferenciar los casos de dengue con hemorragia inusual de los casos de dengue hemorrágico (62, 65).

- b. Dengue hemorrágico:** Los casos típicos de dengue hemorrágico observados en Asia se caracterizan por cuatro manifestaciones clínicas fundamentales: fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, hepatomegalia y a menudo, insuficiencia circulatoria. La trombocitopenia de moderada a intensa con hemoconcentración simultánea es un hallazgo de laboratorio característico. El cambio fisiopatológico principal que determina la gravedad de la enfermedad en el DH y lo distingue del dengue clásico es la

extravasación de plasma, puesta de manifiesto por un incremento del hematocrito y una hemoconcentración ascendente (62, 65, 66).

La trombocitopenia y la hemoconcentración son hallazgos constantes en el DH. Por lo general, de 3 a 8 días después del inicio de la enfermedad el recuento de plaquetas es inferior a 100,000/mm<sup>3</sup>. La hemoconcentración, que indica extravasación de plasma, se encuentra siempre, incluso en casos sin choque; sin embargo, es invariablemente más grave en casos de choque. El hallazgo de hemoconcentración con elevación del hematocrito en un 20% o más se considera prueba del aumento de la permeabilidad capilar y de la extravasación de plasma. Conviene observar que el valor del hematocrito puede verse modificado por la reposición precoz de líquidos, o por las hemorragias. En la mayoría de los casos, los estudios de coagulación y los factores fibrinolíticos muestran descenso del fibrinógeno, protrombina, factor VII, factor XII y antitrombina III (68).

Otros resultados comunes son hipoproteinemia, hiponatremia y niveles ligeramente elevados de aspartato aminotransferasa sérica. En los pacientes con choque prolongado es frecuente la acidosis metabólica, mientras que en la fase terminal de estos casos suele encontrarse un aumento del nitrógeno ureico en sangre. Las radiografías de tórax muestran derrames pleurales, por lo general del lado derecho, como hallazgos frecuentes (62, 65).

Clasificación de la gravedad del dengue hemorrágico (DH). La gravedad del DH se clasifica en cuatro grados :

**Grado I:** Fiebre acompañada de síntomas generales no específicos, la única manifestación hemorrágica es una prueba de torniquete positivo.

**Grado II:** Hemorragia espontánea, además de las manifestaciones de los pacientes de grado I, generalmente en forma cutánea, de otras localización, o ambas.

**Grado III:** Insuficiencia circulatoria, que se manifiesta por pulso rápido y débil, tensión diferencial disminuida (20mm Hg o menos) o hipotensión, con piel fría y húmeda y agitación.

**Grado IV:** Choque profundo con presión arterial y pulso imperceptibles.

La trombocitopenia con hemoconcentración simultánea diferencia el dengue simple de los grados I y II del dengue hemorrágico (62).

- c. **Dengue hemorrágico sin choque:** La enfermedad suele comenzar con un aumento súbito de temperatura, que viene acompañada por rubor facial y otros síntomas constitucionales no específicos, que se asemejan al dengue, como anorexia, vómitos, cefalea y dolores musculares o de las articulaciones. El malestar epigástrico, la sensibilidad en el reborde costal derechos y el dolor abdominal generalizado son comunes. La temperatura es típicamente alta durante 2 a 7 días y luego baja al nivel normal o subnormal; ocasionalmente puede subir hasta 40° C – 41° C y pueden presentarse convulsiones febriles (62, 64).

La manifestación hemorrágica más común es una prueba del torniquete positiva; en la mayoría de los casos se encuentran moretones y hemorragias en los sitios de venipuntura. Durante la fase febril inicial pueden observarse petequias finas diseminadas en las extremidades, las axilas, la cara y el paladar blando. La epistaxis y la hemorragia gingival son menos comunes. En ocasiones se produce una hemorragia gastrointestinal leve (62, 64).



- d. Síndrome de choque del dengue:** En casos graves, el estado del paciente se deteriora en forma súbita luego de una fiebre de pocos días de duración. En el momento en que se baja la temperatura o poco más tarde, entre 3 y 7 días después del inicio, aparecen los signos de insuficiencia circulatoria; la piel se torna fría y congestionada a menudo se observa cianosis y el pulso se debilita y acelera. El dolor abdominal agudo es una molestia frecuente poco antes de sobrevenir el choque. El choque se caracteriza por un pulso acelerado y débil con reducción de la presión del pulso ó hipotensión con piel fría y húmeda y agitación. Los pacientes en choque están en peligro de muerte si no se les administra en seguida el tratamiento apropiado. Pueden pasar a una etapa de choque profundo, haciéndose imperceptibles la presión arterial y el pulso. La duración del choque es corta; es paciente puede morir en 12-24 horas o recuperarse con rapidez después de recibir el tratamiento de reposición de líquidos apropiado (62, 65-68).

En enero de 1997, Cuba notificó un brote de dengue 2 en el municipio de Santiago de Cuba. Doscientos cinco pacientes se clasificaron como fiebre hemorrágica del dengue y síndrome de choque del dengue FHD/SCD, de los cuales fallecieron doce (todos adultos). La tasa de letalidad fue de 5.8 por cada 100 casos de FHD/SCD y de 0.4 por cada 100 casos FD (7, 74).

## **9. Diagnóstico de laboratorio**

El diagnóstico del dengue se puede realizar por medio de aislamiento viral y por pruebas serológicas. Las muestras para aislamiento viral deben ser colectadas en los tres primeros días del inicio de la enfermedad. Deben recolectarse asépticamente 10 ml de sangre total, la cual será transferida a tubos estériles libres de aditivos o preservantes. Los tubos conteniendo la sangre se colocan en hielo o en el refrigerador (4° C) lo más pronto posible. Para asegurar óptimas condiciones para el aislamiento viral la separación del suero se realiza el mismo día de la toma de la muestra y en forma aséptica. Los tubos con el suero se congelan y almacenan a temperaturas entre -20 y -70° C. El suero debe enviarse lo antes posible al laboratorio transportándolo siempre congelado (75).

Usualmente se toman dos muestras de suero para el diagnóstico serológico: una en la fase aguda y otra en la fase convaleciente. El suero de fase aguda se extrae durante los primeros cinco días de la enfermedad y el de fase convaleciente dos a tres semanas más tarde. Para lograr el máximo rendimiento del suero, la sangre recolectada se deja a temperatura ambiente por una hora y a 4° (en refrigeración) el suero se transfiere a un tubo previamente rotulado y se congela a -20°C. El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (-20° C) o a 4°C (75).

a. **Aislamiento del virus del Dengue:** Uno de los sistemas biológicos más empleados en el aislamiento del virus del dengue, a pesar de su baja sensibilidad, ha sido el ratón lactante inoculado por vía intracerebral. También se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos incluyendo: células BSC1, VERO, BHK-21, LLCMK2. En los últimos años se han desarrollado una serie de líneas de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus en comparación con los sistemas anteriores. Dentro de las más utilizadas se encuentran las células AP-61, C636, TRA-284. La elevada sensibilidad de estos sistemas ha permitido alcanzar un alto índice de aislamiento. Actualmente se emplea con éxito la inoculación intratorácica de mosquitos sistema que ha demostrado ser el más sensible (75, 76).

i. **Cultivo de Mosquito:** Las células más sensibles para el aislamiento del virus son: C636, AP61 y las TRA-284, en orden creciente. Cabe señalar que algunas líneas del clono celular C636 se han vuelto menos sensibles a los virus del dengue, sugiriendo que el mismo no es homogéneo. Aún cuando algunas pocas células se infectan, varias cepas no se replican y diseminan al resto de las células lo que influye en la identificación de los virus utilizando anticuerpos monoclonales. Las ventajas de esta línea celular es su facilidad de manipulación y rapidez de crecimiento (75, 76).

Como método general se inocula la muestra, se espera de 10 a 14 días (observando la posible aparición de ECP) y se realiza la IFI. Esta última se realiza primero como tamizaje utilizando un pool de sueros humanos positivos o líquido ascítico hiperinmune (LAH). En los casos positivos se realiza una inmunofluorescencia indirecta IFI utilizando anticuerpos monoclonales (AcM) específicos a los cuatro tipos de dengue (75).

- b. Inmunofluorescencia:** La inmunofluorescencia o técnica de anticuerpos fluorescentes (IF) se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo. El fluorocromo es una sustancia que al ser excitada por una onda luminosa es capaz de emitir luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la de la onda que provoca la excitación. El fluorocromo de más amplia aplicación en esta técnica es el isotiocianato de fluoresceína (75, 76).

En 1941, Coons y colaboradores, introdujeron la técnica de IF, empleando isocianato de fluoresceína para el marcaje de antígenos y anticuerpos. Posteriormente Riggs y colaboradores modificaron las técnicas de conjugación reemplazando el isocianato por el isotiocianato, este último más estable, más fácil de conjugar y de obtener comercialmente.

A partir de 1,950 la IF ha sido ampliamente utilizada para la identificación de parásitos, bacterias y numerosos virus así como para la detección de anticuerpos dirigidos contra ellos (75).

**Principio de la técnica:** Las proteínas moleculares de los anticuerpos se unen al marcador fluorescente (fluorocromo) por medio de enlaces químicos firmes que esencialmente no alteran la actividad inmunológica de estos anticuerpos, manteniendo íntegramente su capacidad de unirse a los antígenos homólogos. Debido a la alta especificidad de la reacción

antígeno-anticuerpo, la IF se ha convertido en un método muy útil para el diagnóstico así como también el tiempo relativamente corto que se requiere para el procesamiento de la muestra hasta llegar al resultado final. La IF es aplicable a cualquier sustancia antigénica que se localice dentro o fuera de las células, ya sean protozoarios, bacterias, rickettsias, virus, hormonas, enzimas, antígenos tisulares y otros (75, 76).

**c. Inmunoensayo Enzimático (ELISA):** En la actualidad se han desarrollado métodos inmunológicos que han tenido una aplicación creciente en el campo de la virología. Algunos de estos métodos se han agrupado bajo el nombre de "métodos rápidos para el diagnóstico virológico", entre los cuales destaca el inmunoensayo enzimático sobre fase sólida conocido como ELISA, que por reunir características que lo hacen muy útil para la detección de anticuerpos y antígenos ha reforzado o remplazado algunos de los métodos clásicos. Uno de los componentes principales de este sistema lo constituyen los conjugados, que están formados por una enzima ligada a un antígeno o anticuerpo determinado (75, 76).

**i. ELISA de Captura de IgM / MAC-ELISA:** En la infección primaria por cualquier virus del complejo dengue se produce una respuesta de anticuerpos de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que las muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del sexto día del establecimiento de la enfermedad (75, 76).

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) ha sido utilizado como método para el diagnóstico serológico en un gran número de enfermedades virales. Uno de los métodos aplicados es el de captura de IgM utilizado para demostrar infecciones actuales o

recientes. Para ello se emplea Inmunoglobulinas humanas anti-IgM fijadas a una placa.

La detección de anticuerpos IgM al virus Dengue resulta de extrema utilidad tanto en el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos como en los sistemas de vigilancia epidemiológica para esta enfermedad (75, 76).

Gubler describió un método ELISA de captura de IgM para la vigilancia del dengue hemorrágico. Comparó los resultados del estudio con la inmunofluorescencia directa y encontró una buena sensibilidad y especificidad muy semejantes a la de esta última técnica. Además, es un método rápido para determinar infecciones de dengue en casos hospitalizados de área endémicas. Es muy útil en la vigilancia de áreas no endémicas, ya que con seguridad cualquier caso positivo indica infección reciente. Por otra parte, es importante señalar que para el diagnóstico solamente se requiere de una muestra (76).

## **10. Tratamiento**

Un oportuno y efectivo reemplazo de pérdidas de plasma o un expansor de plasma o fluidos o soluciones electrolíticas resultan en una favorable recuperación en la mayoría de los casos. Con una adecuada y apropiada administración de fluidos, el DSS (dodecilsulfato de sodio) es rápidamente irreversible en una rápida y oportuna resucitación de choque y la corrección de alteraciones metabólicas y electrolíticas prevendrá la diseminación de coagulación intravascular. La prognosis depende principalmente del pronto reconocimiento y tratamiento del choque, el cual depende de un cuidadoso monitoreo y pronta acción. No es necesario hospitalizar a todos los pacientes sospechosos de DHF, aunque el choque se desarrolla en solamente un tercio. El descenso continuo en el conteo de plaquetas, concurrente en un aumento del

hematocrito es un indicador importante del principio del choque. De esta forma los signos tempranos del choque pueden ser reconocidos, los pacientes deberán de tener repeticiones continuas de conteo de plaquetas y hematocrito. Parientes y otras personas cercanas a los pacientes deberán ser aconsejadas de observar signos de deterioro o signos de alerta de choque tales como desasosiego o letargo, dolor abdominal agudo, extremidades frías, congestión de la piel y oliguria. El período crítico es usualmente en el día del término del choque, típicamente después del tercer día de enfermedad (76).

En la fiebre del dengue hemorrágico la sed y la deshidratación es resultado de la fiebre alta, anorexia y vómitos por lo tanto la ingestión oral de fluidos debe ser adecuado. Una solución de reemplazo electrolítica o jugo de fruta es preferible sobre el agua pura. Soluciones de hidratación oral como en el tratamiento de enfermedades diarreicas, es recomendada; Durante la fase febril aguda, existen algunos riesgos de convulsión. Los antipiréticos pueden ser indicados en pacientes con hiperpirexia, particularmente con aquellos pacientes con historia de convulsiones febriles; Los salicilatos no son recomendados, pues pueden causar sangrados y acidosis o síndrome Reye. El paracetamol es preferible para reducir la fiebre pero debe ser usado con precaución (76).

Una dosis deberá ser administrada cuando la temperatura corporal es mayor a 39° C, pero no más de seis dosis deberán ser administradas en un periodo de 24 horas. Los pacientes deberán ser observados de cerca para signos de choque. El periodo crítico es la transición desde la febril a la fase afebril de la enfermedad, lo cual usualmente ocurre después del tercer día. Las determinaciones del hematocrito son una guía esencial para la terapia de este cuadro; puesto que ellas indican indirectamente el grado de fuga de plasma y la correspondiente necesidad de fluidos intravenosos. Un hematocrito alto usualmente precede a cambios en la presión sanguínea y pulso. El hematocrito deberá ser determinado diariamente desde el tercer día de la enfermedad hasta que la fiebre del paciente ha subsistido por uno o dos días. Si la determinación de

hematocrito no es posible, la determinación de hemoglobina puede ser usada aunque es menos sensible (76).

Terapia parenteral de fluidos puede ser dada en una unidad de rehidratación de pacientes para aquellos con fiebre, vómitos y anorexia que producen deshidratación. El fluido usado para corregir la deshidratación se elige de acuerdo a la naturaleza de la pérdida de fluidos. En caso de deshidratación isotónica, 5% de glucosa (50 g/L) diluida 1:2 o 1:1 en solución salina fisiológica puede ser usada; La terapia de hospitalización de fluidos intravenosos puede ser necesaria cuando existe una deshidratación significativa (>mayor del 10% del peso corporal) y se necesita una rápida expansión de volumen (76).

El síndrome de choque del dengue se considera una emergencia médica. La inmediata administración de fluido intravenoso es esencial para expandir el volumen del plasma. Cuando el choque persiste, el hematocrito y el oxígeno deben ser monitoreados. Si el hematocrito está en aumento, el plasma es sustituido por 5% de albúmina (10-20mL/Kg) esto puede ser administrado rápidamente, se puede repetir si es necesario hasta un total de dosis de 20 a 30 mL por Kg de una solución coloidal. Si el choque aun persiste, el hematocrito debe ser evaluado para evidenciar su declinación, ya que este podría indicar una hemorragia interna. La transfusión de sangre completa fresca (10 mL/kg si el hematocrito está por arriba del 35%). La hiponatremia y la acidosis metabólica puede ocurrir en casos severos. Los niveles de electrolitos y la presión de los gases arteriales puede ser determinada periódicamente en los pacientes severos y en paciente que no respondan prontamente a lo esperado (76).

#### IV. JUSTIFICACION

La población que asiste a los hospitales nacionales Roosevelt y San Juan de Dios, por sus condiciones sociales y ambientales está expuesta a numerosas enfermedades febriles como el dengue, malaria, leptospirosis entre otras. En el año 2005, fueron referidos al Laboratorio Nacional de Salud (LNS) un total de 182 muestras serológicas de pacientes con diagnóstico clínico de dengue, procedentes de dichos hospitales. Estas muestras fueron analizadas para confirmar los casos de dengue. De las muestras referidas, 70 (38%) fueron confirmadas para dengue, mientras que 112 (62%) fueron negativos. En vista de que el mayor porcentaje de casos referidos al LNS fueron confirmados negativos a dengue, es necesario conocer cuál es la causa de la sintomatología presentada por los pacientes. Tomando en cuenta que la leptospirosis y el dengue son enfermedades infecciosas presentes en el país, es importante realizar el diagnóstico diferencial.

En Guatemala un estudio realizado en el año 2004 demostró que los habitantes de Escuintla son vulnerables a presentar dengue y leptospirosis humana, por lo que se recomendó efectuar el diagnóstico diferencial de estas patologías a pacientes con enfermedad febril (17). Por tal razón, en este estudio se analizaron las muestras serológicas de los casos referidos al LNS en el año 2005 y que fueron diagnosticadas clínicamente como dengue, pero que resultaron negativas en las pruebas de confirmación inmunológica. Para el efecto, se realizó la prueba de aglutinación microscópica MAT, para detectar anticuerpos totales (IgM e IgG) anti-leptospira en dichas muestras. Lo cual nos permitirá determinar la presencia de anticuerpos en las muestras estudiadas. Asimismo, los resultados que se obtengan permitirán considerar a la leptospirosis en el diagnóstico diferencial de diversos padecimientos, tales como el dengue. Por lo que esta investigación generará información de mucho valor que permitirá conocer la importancia de la leptospirosis en Guatemala.



## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

Determinar anticuerpos anti-*Leptospira*, en muestras serológicas de pacientes de los hospitales Roosevelt y San Juan de Dios, cuyos sueros fueron referidos al Laboratorio Nacional de Salud en el año 2005 y que presentaron serología negativa a dengue.

### B. Objetivos Específicos

1. Determinar el porcentaje de seropositividad a leptospirosis humana en sueros de pacientes a través de la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
2. Identificar las serovariedades circulantes de *Leptospira* en los sueros de pacientes a través de la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
3. Establecer los síntomas y signos mas frecuentes en los casos de pacientes con serología positiva a *Leptospira interrogans*.

## **VI. HIPOTESIS**

Este estudio no presenta hipótesis por ser de tipo descriptivo

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo

182 muestras serológicas de pacientes del Hospital Roosevelt y San Juan de Dios, que ingresaron en el año 2005 al Laboratorio Nacional de Salud con cuadro clínico sospechoso de dengue, con resultado negativo en la prueba MAC-ELISA IgM dengue.

#### 1. Muestra

La muestra fue constituida por 48 muestras serológicas que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para el estudio.

#### 2. Criterios de inclusión.

- Muestras de pacientes de casos sospechosos de dengue con su respectiva ficha epidemiológica (Anexo 1) y que hayan sido referidos al LNS en el año 2005.
- Muestras de pacientes con más de 6 días de sintomatología, confirmados serológicamente negativos en la prueba MAC-ELISA IgM dengue. Ya que la respuesta inmunológica en pacientes infectados por *Leptospira interrogans* se puede detectar por la prueba de aglutinación microscópica (MAT) pasados por lo menos 5 días desde el inicio de síntomas.

### **3. Criterios de exclusión.**

- Muestras con datos incompletos en la ficha epidemiológica de investigación de caso sospechoso de dengue o que no cuenten con la misma.
- Muestras que no cumplan con más de 6 días de sintomatología sospechosa de dengue.

## **B. Recursos**

### **1. Humanos**

Tesista: Br. Jaime Alberto Barrios Barrera.

Asesora: Licda. Leticia Castillo. Coordinadora de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE), del Laboratorio Nacional de Salud.

Co-asesor: Lic. Osberth Morales. Profesor del departamento de Microbiología, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **2. Institucionales**

Área de Bacteriología de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica del Laboratorio Nacional de Salud, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala.

### **3. Equipo.**

#### **Equipo de Filtración**

- Membrana de acetato de celulosa o acetato de nitrilo con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- Bomba de vacío

- Kitazato.

**b. Equipo y Mobiliario de Laboratorio**

- Cabina de Seguridad Biológica Nivel II
- Congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Incubadora a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Microscopio de campo oscuro
- Estufas simples
- Mecheros de gas
- Incinerador
- Centrífuga
- Pipetas Semiautomáticas de volumen variable ( $50 - 200\ \mu\text{L}$ ,  $200 - 1000\ \mu\text{L}$ ).
- Autoclave
- Baño de María
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Refrigeradora
- Reloj
- Termómetro

**4. Reactivos**

- Hipoclorito de sodio al 5%
- Alcohol al 70%
- Tween 80
- Glicerol
- Seroalbumina

## 5. Materiales

### a. Cepas de Leptospiras

22 serovariedades de *Leptospira* (Tabla 2) que forman parte del cepario de la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica del Laboratorio Nacional de Salud, las cuales fueron donadas por el Dr. Alberto Montoya del Centro Nacional de Diagnostico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua.

### b. Medios de Cultivo

Medio Base para Fletcher.

Medio base para EMJH.

### c. Suplementos de Medios de cultivo

Vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>12</sub>. (EMJH)

Sales de Magnesio, calcio, fosfato de sodio, y sales de amonio.  
(EMJH)

Suero de Conejo. (Fletcher)

### d. Cristalería

Tubos de ensayo sin anticoagulante

Tubos 16 X 150 mL con tapa de rosca

Portaobjetos

Cubreobjetos

Frascos con tapón de rosca

Probetas

### e. Otros:

Solución de Amonio Cuaternario

Fosfato disódico (anhidro) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Contenedor de material contaminado

Puntas plásticas

Guantes descartables

Cinta testigo

Hielera

Gradillas

Placa de poliestireno

### **C. Procedimientos**

**a. Selección de muestras:** Las muestras serológicas fueron obtenidas de la seroteca de la Unidad de Virología del Laboratorio Nacional de Salud, que se encontraban almacenadas a temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ .

#### **b. Preparación de medios de cultivo para la conservación de *Leptospira***

##### **Fletcher (37)**

- i. Se preparó el medio de acuerdo a las indicaciones y se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
- ii. El medio preparado se distribuyó en volúmenes de 9 mL en tubos 16 X 150 mL con tapa de rosca, posteriormente se agregó 1 mL de suero de conejo estéril, para llegar a una concentración final del 10%.
- iii. Se mezcló y homogenizó el medio, posteriormente se realizaron 3 tinalizaciones en baño de maría a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, durante 3 días seguidos.
- iv. El medio preparado se conservó en refrigeración hasta su uso.

##### **EMJH (11)**

- i. Se preparó el medio de acuerdo a las indicaciones y se esterilizó a  $120^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.
- ii. Por cada 9 partes del medio base preparado se le agregó 1 parte de AFAS (Suplemento de ácidos grasos y albúmina).

- iii. Finalmente el medio se filtró.
- iv. El medio preparado se conservó en refrigeración hasta su uso.

**c. Inoculación en medios de cultivo para la obtención de antígeno de *Leptospira* (36, 37)**

- i. Una vez preparados los medios de cultivo EMJH y Fletcher, se inocularon las distintas serovariedades de *Leptospira*, teniendo cuidado de inocular primero en EMJH y luego en medio Fletcher.
- ii. Se incubaron a 30°C por un período de 7 días (medio de cultivo EMJH) hasta que los distintos serovares de leptospiaras alcanzarán una concentración adecuada. El medio Fletcher se incubó por 7 días (Fletcher se repitió el proceso cada 3 meses).
- iii. Se realizó un recuento de las espiroquetas móviles o viables para determinar el crecimiento adecuado de los distintos serovares de *Leptospira*. Lo anterior se realizó agregando una gota del cultivo en un portaobjetos y se procedió a observar al microscopio de campo oscuro para establecer si se observaba más del 50% de leptospiaras vivas en el campo.

**d. Prueba de aglutinación microscópica (MAT)**

Se emplearon como antígeno las cepas de referencia (Tabla 2) que se replicaron semanalmente para realizar la prueba. Una vez revisados los cultivos, se eligieron aquellos con un buen crecimiento y que no formaron aglutinaciones entre ellas (auto-aglutinación). Para que el antígeno sea óptimo para la prueba de MAT, tiene que observarse en el microscopio de campo oscuro entre 150-200 leptospiaras por campo o hasta lograr una opalescencia de 0.5 de la escala de Mac Farland. La prueba se basa en



enfrentar diluciones seriadas de suero con igual volumen de una suspensión de leptospiras (antígeno) y se observa en microscopio de campo oscuro para estimar el 50% de aglutinación como el punto final de la reacción antígeno-anticuerpo (44).

## **I. Preparación de soluciones**

- **Solución amortiguada de Sorensen (de stock)**

Para la preparación de la solución se pesó 8.33 gramos de fosfato disódico y 1.09 gramos de fosfato mono potásico y se mezclaron ambos con un litro de agua destilada.

- **Solución salina fisiológica (de stock)**

Se preparó un litro de solución salina al 85 por ciento.

- **Solución salina amortiguada con fosfatos (SAF)**

La solución SAF se preparó mezclando 40 mL de solución amortiguada de Sorensen con 460 mL de solución salina fisiológica. Se tomó el pH (el pH indicado debe de ser de 7.2). Se autoclaveó a 121°C durante 15 minutos. La solución final preparada se guardó en refrigeración a 8° C hasta su uso.

## **II. Tamizaje:**

- Se prepararon diluciones separadamente del suero 1:50, 1:100, 1:200 en un volumen final de 1.5 mL con PBS en un tubo de dilución.
- Se distribuyó la micro placa en 8 columnas para la dilución de suero y 24 filas para los antígenos.
- Se agregaron 50 uL a cada pocillo de la dilución del suero 1:50 en la primera y quinta columna.
- Se agregaron 50 uL a cada pocillo de la dilución de suero 1:100 en la segunda y sexta columna.
- Se agregaron 50 uL a cada pocillo de la dilución de suero 1:200 en la tercera y séptima columna.

- Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de PBS en la cuarta y octava columna para el control del antígeno.
- A cada pocillo de la primera fila (columna 1, 2, 3 y 4), se le agregaron el antígeno correspondiente al primer serogrupo. La dilución de suero fue de 1:2.
- Se realizó este procedimiento sucesivamente de la segunda hasta la veinticuatroava fila.
- Posterior a la adición de los antígenos, se colocó la microplaca sobre el agitador y se agitó a una revolución 500 rpm durante cuatro segundos para que la muestra de suero y antígeno se mezclaran.
- La microplaca se cubrió con papel platino y se incubó por 2 hrs. a  $30^{\circ}\text{C}$ .

### **III. Titulación**

- Se realizó el tamizaje a las muestras que presentaron aglutinación igual o menor a 2+ con uno o más serogrupos, en una dilución de 1:400.
- Se rotuló la placa con los números de las muestras y serogrupo según el protocolo diseñado.
- Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de PBS en todos los pocillos, excepto en el número 2.
- Se adicionaron 45  $\mu\text{L}$  de PBS en el pocillo 2.
- Se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra de suero en el pocillo 2, quedando un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , y una dilución inicial de la muestra de suero de 1:10.
- Se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del pocillo 2 y se pasaron al pocillo 3, donde ya se habían servido 25  $\mu\text{L}$  de PBS.

- Se homogenizaron y se tomaron nuevamente 25  $\mu$ L de la dilución y se pasaron al pocillo 4 y así sucesivamente hasta el pocillo 8 ó más, eliminando los últimos 25  $\mu$ L.
- Se adicionaron a todos los pocillos 25  $\mu$ L del cultivo de leptospiras del serogrupo determinado previamente y con una concentración de  $2 \times 10^8$  leptospiras/mL sin autoaglutinación (Cultivo de 7 – 10 días).
- Se adicionaron los 25  $\mu$ L del cultivo de leptospiras a las diluciones de la muestra, éstas se duplicaron, es decir de 1:10 pasa a 1:20, 1:20 pasa a 1:40, y así sucesivamente.
- El pocillo 1 funcionó como control de la cepa (control negativo).
- Se homogenizó suavemente y se incubó todo a 37°C por 1 hora, o de 28 – 30°C por 2 horas.

#### **IV. Lectura:**

- Se extrajeron 15  $\mu$ L de mezcla antígeno-suero y 15  $\mu$ L del control, los que se traspasaron a una lámina porta-objetos.
- La lectura se realizó utilizando el microscopio de campo oscuro con objetivos de 10X, sin cubreobjetos.
- Se observó el grado de aglutinación del pozo de muestra y del de antígeno y se comparó con el antígeno control.
- El título final se determinó en la dilución del suero que presentó 50% de aglutinación. Se reportó como cruces de aglutinación:
  - 1+** = 25% aglutinación y 75% de células libres.
  - 2+** = 50% aglutinación y 50% de células libres.
  - 3+** = 75% aglutinación y 25% de células libres.
  - 4+** = 100% aglutinación y 0% de células libres.

## **V. Interpretación:**

- Positivo: cuando presentó una aglutinación de 2+ en una dilución de suero igual o mayor a 1:100.
- Negativo: no se observó aglutinación con ningún serovar en una dilución de suero menor a 1:100.

## **E. Diseño de investigación**

### **1. Tamaño de la muestra**

Se tomaron todos los casos que cumplieron con los criterios de inclusión.

### **2. Tipo de estudio**

Descriptivo, prospectivo.

### **3. Variables de interés:**

Determinación de anticuerpos totales (IgG e IgM) anti-leptospira por medio de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT).

### **4. Tabulación de datos**

Se utilizó una hoja electrónica (Microsoft, EXCEL), para realizar el cálculo de frecuencias y porcentajes.

### **5. Análisis de resultados**

Se reportó la frecuencia, por medio del cálculo de frecuencia absoluta y porcentaje de casos positivos (prevalencia).

Para identificar las serovariedades circulantes de *Leptospira* en los sueros de pacientes a través de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) se reportó la frecuencia de las serovariedades presentes en los casos positivos por medio del cálculo de la frecuencia absoluta y porcentaje.

Para establecer los síntomas y signos presentes en los casos de pacientes con serología positiva a *Leptospira interrogans*, se analizaron las fichas epidemiológicas de cada caso y se reportó la frecuencia por medio del cálculo de frecuencia absoluta y porcentaje.

## VIII. RESULTADOS

Se seleccionaron 48 muestras que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos previamente en el estudio, encontrándose que 18 (38.5%) presentaron anticuerpos anti-leptospira (Tabla 3).

**Tabla 3.** Determinación de anticuerpos anti-leptospira en muestras de pacientes con serología para dengue negativo.

Reactivos	No reactivos	Total
18 (38.5%)	30 (62.5%)	48

Fuente: Datos experimentales.

En la Tabla 4, se observó que la frecuencia de los casos con anticuerpos anti-leptospira fue mayor en las mujeres en comparación con los hombres. Con respecto al grupo etario se puede observar que el grupo comprendido de 1 a 20 años, presentó una mayor frecuencia de sueros reactivos a los diferentes serogrupos de *Leptospira* que se utilizaron en la prueba de MAT. En relación a la procedencia, los casos referidos por el Hospital Roosevelt presentaron una mayor frecuencia de casos reactivos a anticuerpos anti-leptospira.

**Tabla 4.** Descripción demográfica de la población que presentó anticuerpos anti-leptospira (n=18) frente a la población no reactiva a la prueba de dengue (n=30).

	Reactivos (n=18)*			No reactivos (n= 30)		
	(N)	(%)	IC <sup>95%</sup>	(N)	(%)	IC <sup>95%</sup>
<b>Género</b>						
1) Masculino	7	38.9	17.3 – 64.3	9	30	14.7 – 49.4
2) Femenino	11	61.1	35.7- 82.7	21	70	50.6 – 85.3
3) Total	18			30		
<b>Edad</b>						
1) 1 - 20	13	72.2	46.5 – 90.3	13	41.4	23.5 – 61.1
2) 21 – 40	4	22.2	6.4 – 47.6	15	51.7	32.5 – 70.6
3) 41 – 60	1	5.6	0.1 – 27.3	2	6.9	0.8 – 22.8
<b>Procedencia</b>						
1) Hospital Roosevelt	18	94.4	72.7 – 99.9	29	96.7	82.8 – 99.9
2) H.G.S.J.D.	0	5.6	0.1 – 27.3	1	3.3	0.1 – 17.2

Fuente: Datos experimentales.

De los 22 serogrupos de *L. interrogans* a los que se enfrentaron las muestras de suero en la prueba de MAT, se identificaron 5 de los cuales, la mayor frecuencia la presentó *pyrogenes* (7), mientras que *canicola*, *hebdomadis*, *hardjo* e *icterohaemorrhagiae* presentaron la menor. No se observó presencia de los 17 serogrupos restantes (Tabla 5).

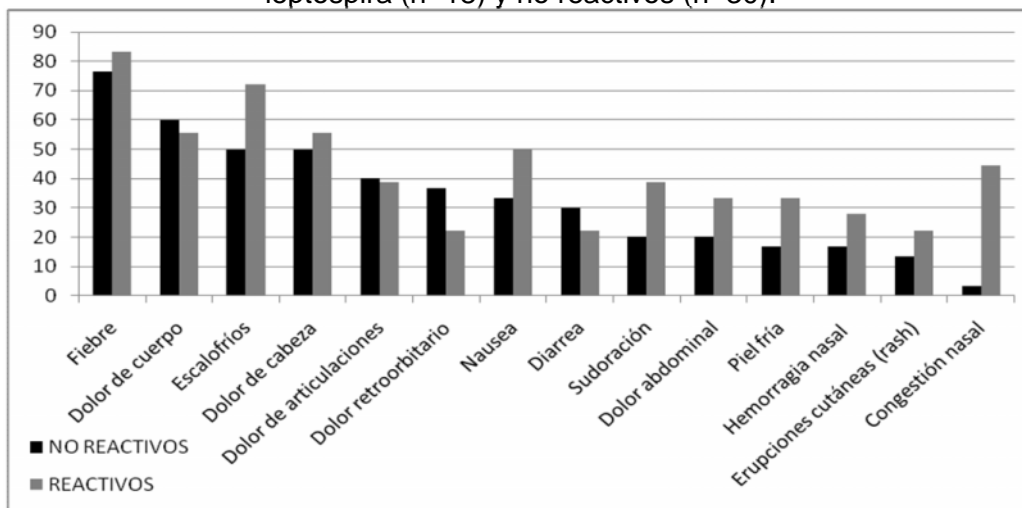
**Tabla 5.** Frecuencia y porcentaje de serogrupos de *L. interrogans* identificados con la prueba MAT (n=18).

Serogrupo	Serovar	Frecuencia	%	Título
<i>pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>	7	38.89	1(1:320), 5(1:80), 1(1:40)
<i>canicola</i>	<i>canicola</i>	4	22.22	4(1:40)
<i>hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	3	16.67	2(1:20), 1(1:60)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>	2	11.11	2(1:40)
<i>serjoe</i>	<i>hardjo</i>	2	11.11	2(1:80)

Fuente: Datos experimentales.

De los datos obtenidos de la ficha epidemiológica, se observó que al comparar los casos en los que no se detectaron anticuerpos anti-leptospira (30) y los casos reactivos (18), los síntomas comunes en ambos grupos fueron: fiebre (76.7% y 83.3%, respectivamente), dolor de cuerpo (60% y 55.6%), escalofríos (50% y 72.2%) y dolor de cabeza (50% y 55.6%). Los síntomas restantes presentaron menor frecuencia (Figura 2).

**Figura 2.** Comparación de los signos y síntomas en pacientes reactivos a anticuerpos anti-leptospira (n=18) y no reactivos (n=30).



Fuente: Ficha de investigación epidemiológica de dengue clásico y hemorrágico.

En la Tabla 6, se muestra el hospital, procedencia, título y serovar de cada uno de los casos que presentaron anticuerpos anti-leptospira, de ellos solamente un caso mostró título mayor a 1:100, en tanto que los demás presentaron títulos menores a este valor. Como se indico anteriormente se identificaron cinco serovares.

**Tabla 6.** Procedencia, título y serovar de los casos que fueron reactivos a anticuerpos anti-leptospira.

<b>Caso No.</b>	<b>Hospital</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Título</b>	<b>Serovar</b>
1	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Canicola</i>
2	Roosevelt	Guatemala	1:320	<i>Pyrogenes</i>
3	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Icterohaemorrhagiae</i>
4	Roosevelt	Guatemala	1:80	<i>Pyrogenes</i>
5	Roosevelt	Guatemala	1:80	<i>Pyrogenes</i>
6	Roosevelt	Guatemala	1:80	<i>Serjoe</i>
7	Roosevelt	Guatemala	1:80	<i>Pyrogenes</i>
8	Roosevelt	Guatemala	1:20	<i>Hebdomadis</i>
9	Roosevelt	Guatemala	1:80	<i>Pyrogenes</i>
10	Roosevelt	Guatemala	1:80	<i>Serjoe</i>
11	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Canicola</i>
12	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Canicola</i>
13	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Icterohaemorrhagiae</i>
14	Roosevelt	Escuintla	1.80	<i>Pyrogenes</i>
15	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Pyrogenes</i>
16	Roosevelt	Guatemala	1:20	<i>Hebdomadis</i>
17	Roosevelt	Guatemala	1:60	<i>Hebdomadis</i>
18	Roosevelt	Guatemala	1:40	<i>Canicola</i>

Fuente: Datos experimentales.



## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

El dengue y la leptospirosis humana son enfermedades febriles que presentan una sintomatología similar, por lo que el diagnóstico a nivel de laboratorio es esencial para diferenciarlas. Además es necesario conocer su adecuado manejo así como el diagnóstico de las diferentes presentaciones clínicas de estas enfermedades, que se adaptan y distribuyen en regiones tropicales y subtropicales. En Guatemala, existen las condiciones necesarias para la transmisión de *L. interrogans*, agente causal de la leptospirosis humana, entre ellas el clima de las regiones del país, las bajas condiciones económicas, la convivencia con animales reservorios de *Leptospira* y que en países vecinos se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-leptospira en grupos de personas sospechosas de padecer dengue (9).

En esta investigación, el objetivo principal fue determinar el porcentaje de seropositividad a leptospirosis humana en la población estudiada a través de la prueba de aglutinación microscópica (MAT). Para ello se evaluaron un total de 48 muestras serológicas negativas para dengue, de las cuales 18 (38.5%) fueron reactivas a cinco de los 22 serogrupos de *Leptospira* utilizados en la prueba de MAT. Esta positividad fue superior al 14% encontrado en el estudio realizado en pacientes de un brote de dengue que se dio en la península de Yucatán, México, en el cual se investigó leptospirosis anictérica (2). También la frecuencia fue mayor a lo encontrado en un estudio realizado en Guatemala en el año 2003 con el objetivo de investigar la presencia de dengue y leptospirosis en 84 pacientes con síndrome febril en la población de Escuintla, encontrándose 8 (10%) casos positivos a leptospirosis humana. Estas diferencias pueden deberse a que la población analizada en este estudio proviene de los dos hospitales con mayor afluencia en el sector de salud pública y al que son referidos la mayoría de casos críticos de todas las regiones del país (17).

En relación al género de los pacientes, en este estudio la frecuencia fue mayor en las mujeres en comparación con los hombres. Lo cual no concuerda con la literatura que indica que esta enfermedad está asociada a actividades laborales (corte de caña, ganadería, actividades militares, etc.) realizada mayormente por el sexo masculino (11, 27, 28). Por otra parte es interesante mencionar que esta tendencia concuerda con lo reportado anteriormente en el estudio realizado en el municipio de Escuintla en el año 2003, en el cual se obtuvo un 75% de positividad en el género femenino (17). Además esta tendencia también concuerda con lo encontrado en el estudio realizado en pacientes de un brote de dengue que se dio en la península de Yucatán, México, en el cual se investigaba leptospirosis anictérica (57% femenino, 43% masculino) (2). Esto puede estar relacionado a que en la población nacional el sexo femenino también desempeña labores productivas lo cual propicia que prevalezcan en los grupos de riesgo.

Con respecto al grupo etario se puede observar que el grupo comprendido de 1 a 20 años, fue el que presentó una mayor frecuencia de sueros reactivos a la batería de serogrupos de leptospira que se utilizaron en la prueba de MAT. Esto puede estar asociado a que en nuestro país las personas menores de 20 años están propensas a realizar trabajos relacionados con labores agrícolas o de ganadería, las que suponen algún riesgo para contraer leptospirosis.

Los casos referidos por el Hospital Roosevelt presentaron una mayor frecuencia de casos reactivos a anticuerpos anti-leptospira. Esto puede deberse a que en el año 2005 el Hospital Roosevelt envió un mayor número de casos sospechosos de dengue al LNS para su confirmación. Por otro lado, la procedencia de los casos también puede estar influyendo, ya que al hospital Roosevelt, por su ubicación, se refieren pacientes de la zona sur-occidente mientras que al hospital San Juan de Dios se refieren los casos de la zona Nor-oriente del país.

Con relación a la serovariedad circulante, los serogrupos más identificados de *L. interrogans* fueron *pyrogenes* y *canicola*, obteniéndose además una reacción frente a los serogrupos *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae* y *sejroe*, serogrupos que han sido encontrados con mayor frecuencia en estudios realizados en el mundo (49).

Los serogrupos encontrados en este estudio ya fueron reportados anteriormente en el país (17, 18, 19, 20). Además es importante mencionar que el Serogrupo *pyrogenes* también reportó la mayor frecuencia en el estudio realizado en el 2007 en la aldea El Milagro, Escuintla, en el cual se determinó la seroprevalencia de leptospirosis en humanos y animales (19). Estudios realizados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos sobre la leptospirosis animal en Guatemala demostraron que la prevalencia en cerdos fue del 46% que correspondía a *L. pyrogenes*, mientras que en perros la prevalencia fue del 12.13% que correspondía a *L. Canicola* (18) Lo cual puede indicar que los casos reactivos en este estudio pueden haber estado en contacto con perros o cerdos infectados con *Leptospira*.

Los datos obtenidos de las fichas permitieron demostrar que los pacientes con serología negativa a dengue refirieron síntomas y signos comunes a dengue y leptospirosis, como lo son fiebre, escalofríos, dolor de cuerpo y dolor de cabeza. En este estudio al comparar los síntomas que presentaron mayor frecuencia entre los casos reactivos y no reactivos a la presencia de anticuerpos anti-leptospira, se confirmaron estas similitudes, ya que la mayoría de pacientes presentaron principalmente fiebre (76.7% y 83.3%), dolor de cuerpo (60% y 55.6%), escalofríos (50% y 72.2%) y dolor de cabeza (50% y 55.6%) respectivamente (36, 53, 77).

Esto demuestra que es necesario realizar el diagnóstico diferencial a las muestras de pacientes que presenten síntomas similares a dengue y leptospirosis humana, por medio de pruebas de laboratorio que confirmen cual de las dos patologías es la causante del cuadro clínico, lo que permitirá proporcionar el tratamiento adecuado a cada caso (20, 36, 53).

Por tal razón, este estudio permitió demostrar que en los casos incluidos, la leptospirosis fue causante de una sintomatología clínica similar a la de dengue y es importante considerar que probablemente un 38.5% de los casos que presentan serología negativa a dengue, pueden padecer de una infección por *L. interrogans*.

Con referencia a la prueba de MAT, al igual que con otras pruebas serológicas, deberían ser examinadas idealmente dos muestras consecutivas de suero para observar la seroconversión del paciente, o un incremento de cuatro veces o más en el título (77). Sin embargo, en las regiones en donde solo es posible analizar una muestra, frecuentemente se obtiene una muestra de sangre, de la fase aguda de la enfermedad. El significado de los títulos en muestras únicas es un tópico de debate en diferentes áreas, ya que distintos puntos de corte pueden utilizarse. Algunos consideran un título de 1:100 como positivo, mientras que otros aceptan 1:200, 1:400 o 1:800 como diagnóstico de una infección actual o reciente. En este estudio se analizó una única muestra y los títulos que se detectaron oscilaron desde 1:20 hasta 1:320 y solo una presentó un título mayor a 1:100, las demás presentaron títulos menores (77).

La OMS considera que en las áreas en donde la leptospirosis es rara o no ha sido bien estudiada, un título relativamente bajo tiene valor diagnóstico, siempre y cuando sea compatible en conjunto con los factores clínicos y epidemiológicos (exposición, grupos de riesgo), que en este caso concuerdan y sugieren que la presencia de anticuerpos anti-leptospira es debida a una infección reciente de leptospirosis (77).

Por otra parte, dado que más del 50 % de las muestras analizadas ya habían sido negativas a dengue y ahora también lo son para leptospirosis, se recomienda realizar otras investigaciones en las que se determine la etiología del cuadro clínico similar, entre ellas, infecciones por hantavirus, fiebre amarilla, rickettsiosis, borreliosis y malaria (2, 77).

Finalmente, los datos obtenidos indican que es importante incluir pruebas específicas para identificar leptospirosis, como un diagnóstico diferencial en la vigilancia epidemiológica de dengue, por lo que es necesario implementar una ficha unificada de dengue y leptospirosis en la vigilancia epidemiológica, para que el personal de salud tome en cuenta el diagnóstico de la leptospirosis en Guatemala.

## X. CONCLUSIONES

1. Se determino que el 38.5% de las muestras analizadas, presentaron anticuerpos anti-leptospira por medio de la prueba de aglutinación microscópica (MAT).
2. Las serovariedades de *Leptospira interrogans* presentes en las muestras seropositivas fueron *pyrogenes* (38.89%), *canicola* (22.22%), *hebdomadis* (16.67%), *icterohaemorrhagiae* y *serjoe* (11.11%) cada uno.
3. Los casos en los que se detectaron anticuerpos anti-leptospira presentaron principalmente: fiebre (83.3%), escalofríos (72.2%), dolor de cuerpo (55.6%) y dolor de cabeza (55.6%).

## XI. RECOMENDACIONES

1. Es importante realizar estudios que establezcan el punto de corte de anticuerpos anti-Leptospira para el diagnóstico en la población nacional, ya que esto permitirá hacer más eficiente la interpretación de los resultados de la MAT.
2. Continuar con los estudios seroepidemiológicos, que permitan establecer la prevalencia de la leptospirosis humana en Guatemala, tanto a nivel rural como urbano lo cual permitirá conocer la magnitud de la enfermedad.
3. Continuar con los talleres y capacitaciones dirigidos al personal de todas las áreas consideradas endémicas, con el objetivo de que se conozca el diagnóstico, tratamiento, vigilancia epidemiológica y control de la leptospirosis y que debe ser tomada en cuenta para el diagnóstico diferencial con otras patologías.
4. Que el Centro Nacional de Epidemiología maneje una ficha unificada de dengue y leptospirosis, para que el personal médico clínico, epidemiológico y de laboratorio tome en cuenta ambas enfermedades en el diagnóstico diferencial.

## XII. REFERENCIAS

1. Knudsen, A; *et al.* Vector- borne disease problems in rapid urbanization: New approaches to vector control. Bull W H Org. 1992; 310:70-71).
2. Zavala J, Velásquez; *et al.* Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la península de Yucatán, México. Rev. Biomed. 1998; 9:78-83.
3. Bañuelos A. Boletín Leptospirosis. OPS-OMS. InterWeb Services C.A. 1998.
4. Koneman, E; *et al.* Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas color. Editorial Médica Panamericana. 5ta edición. USA. 1997; 1195:945-949.
5. Villegas de Olazábal, H. Boletín Leptospirosis. Web oficial del Sector Salud en Costa Rica. Net-Salud Costa Rica, 1995- 1997.
6. Benenson, A. Manual para el control de las enfermedades Transmisibles. Decimosexta edición. OPS-OMS, 1997; 405:294-297.
7. Melo R, *et al.* Principales Enfermedades Infecciosas en Centroamérica, durante 1998, antes y después de Mitch. Rev. Pan Sal Púb. 1999; 6:440-443.
8. Seijo A, *et al.* Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: An emerging disease in Buenos Aires, Argentina. Rev. Emer Infect Dis. 2002; 8(9):1004-1005.
9. Zavala J, *et al.* Clinical epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. Rev. Instit Med Trop. 2002; 44:254-259.
10. MSPAS. Unidad de Vigilancia Epidemiológica. Departamento de Epidemiología, Dirección General del Sistema Integral de Atención en Salud. Leptospirosis (Doc). Guatemala, 1999.
11. Sasaki D, *et al.* Active surveillance an risk factors for leptospirosis in Hawaii. Am J Trop Med Hyg 1993; 48:35-43.



12. Martínez R, *et al.* Evaluación de la efectividad de una nueva vacuna contra la leptospirosis humana en grupos de riesgo, *Rev. Pan Sal Púb.* 2000; 6:385-392.
13. Martínez R, *et al.* Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna contra la leptospirosis humana, *Rev. Cub Med Trop.* 2003; 55(2):96–99.
14. MSPAS. Boletín Epidemiológico Nacional. Guatemala Marzo 2003; 3(20): 44-58.
15. Prhraisuwan P, *et al.* Leptospirosis: Skin wounds and control strategies in Thailand. *Rev. Emer Infect Dis.* 2002. 8(12):455-1459.
16. Torres MF, *et al.* Leptospirosis Humana en Guatemala; Primer caso confirmado. Guatemala: USAC, 1982. 33:16-24.
17. 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. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004; 101:1-2.
18. Sikahall Sh. Estandarización de la prueba de Aglutinación Microscópica en placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2006; 53:1-2.
19. Zelaya B, *et al.* Seroprevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, Guatemala, CONCYT, 2007.
20. Galindo SV. Determinación de Anti-cuerpos Anti-leptospira en donadores de sangre del hospital San Juan de Dios. Guatemala, Universidad de San Carlos de

Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia)  
2009; 64:3-5.

21. Noguchi H, *et al.* The survival of *Leptospira* (spirochaeta) icterohaemorrhagiae in nature: observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. *Rev biomed*, 1998; 37: 609-25.
22. Arzouni J, *et al.* First isolation of *Leptospira fainei*; serovar hurstbridge from two human patient's with Weil's syndrome. *Jour Med microb.* 2001; 50:96-100.
23. Mandell G, Douglas J, Bennett's, R. Principles and practice of infection disease. Fourth edition. Churchill Livingstone. USA. 1995; 2:2,137-2,141.
24. Tappero J, Ashford DA; *et al.* Principles and practice of infectious diseases. 5<sup>th</sup> ed. New York. 1999; 3058:2495-501.
25. Chan Hl. Bacterial Infections of the skin. 2 cutaneous dues to systemic infections. *Ann Acad Med Singapore.* 1983; 12:98-102.
26. Plank R, *et al.* Overwiev of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of the *Leptospira* spp. In humans. *Microbes infect.* 2000; 2:1265-1276.
27. Corwing A, *et al.* A waterborne outbreak of leptospirosis among United Sates Military personnel in Okinawa, Japan. *Jour Epid.* 1990; 19:743-748.
28. Bovet P, *et al.* Factors associated with clinical leptospirosis; a population based case-control study in the seychelles Indian Ocean. *Journ Epid* 1992; 28:583-590.
29. Watt G. Leptospirosis. *Current opinion infection disease.* 1997; 10:149-152.
30. Gallop Th. R, *et al.* Leptospirosis Wet *Jour Med.* 1993; 315:159-176.
31. Levin N, *et al.* Panuveitis with papillitis in Leptospirosis. *Amer Jour Ophthal.* 1994; 117(1):118-119.

32. O'neal K, *et al.* Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Rev. Infect Dis.* 1991; 13:705-709.
33. Im JG, Yeon; *et al.* Leptospirosis of the lung; radiographic findings in 58 patients. 1989; 152:955-959.
34. Guncalves Aj., *et al.* Hemoptise e syndrome de angustia respiratoria do adulto como causas de morte na leptospirose; mudanas de padroes clínicos e anatomopatológicos. *Rev Soc Brasil. Med Trop* 1992; 25:261-268.
35. Trevejort, M, *et al.* Epidemic Leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage. *Nicaragua, Jour Infect dis.* 1998; 178:157-163.
36. Comisión Científica Sobre Leptospirosis. *Manual de Leptospirosis.* 1ª Edición. Buenos Aires, Argentina. 1994; 47:25-32.
37. 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.
38. Laguna VA. *et al.* Leptospirosis. Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud. *Doc. Tec.* Lima, Perú. 2000. 56:1-30.
39. Caballero AS, García JR. *Manual de procedimientos de laboratorio del Instituto nacional de diagnóstico y referencia epidemiológico (INDRE).* México. 1997; 41:1-30.
40. Terpstra W.J. *Human Leptospirosis Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.* Washington DC: OPS, ILS, 2003.
41. Reingold A. Definiciones de caso: Dengue y Leptospirosis: OPS y OMS. *Boletín epidemiológico.* 2000; 21(2):25-55.

42. Murray PR. *et al.* Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Washington DC. 2000; 744:512-600.
43. Céspedes MZ, Araujo MG. 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; 53:15-45.
44. Orantes JA. Comparación de métodos para el diagnóstico de Leptospirosis en pacientes que asisten a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2003; 65:21–24.
45. Obregón AM. *et al.* Importancia de la confirmación microbiológica en un brote de leptospirosis humana en la ciudad de Villa Clara. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” Rev. Cub Med Trop. 2003; 55(2):96–99.
46. Effer PV, *et al.* Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. Rev. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:1081–1084.
47. Cumberland P, Everard C, Levelt P. Assesment of efficacy of the IgM enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute Leptospirosis. Rev. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999; 61:731–734.
48. Brandao AP. *et al.* Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis. J Clin Microb. 1998; 36(11):3138–3142.
49. Hartskeerl R, *et al.* International course on laboratory methods for the diagnosis of “Leptospirosis Havana 2006”. Instituto Pedro Kourí. La Havana, Cuba. 2006; 37:12-17.

- 50.** Levett P; *et al.* Two methods for rapid serological diagnosis of acute Leptospirosis. *Rev Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 6:349–351.
- 51.** Rodríguez I. *et al.* Lepto distick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” *Rev. Cubana Med Trop.* 2002; 54(1):44–47.
- 52.** Tenorio G. *et al.* Utilidad de la determinación serológica de anticuerpos en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis ocular con la leptospirosis ocular. *Rev Méd del Hospital General de México.* 2002; 65(3):135–143.
- 53.** Zakki Sr, *et al.* Epidemic Working Leptospirosis as a cause of múltiple organ failure. *Rev Méd Chile,* 1996; 124(3):359-362.
- 54.** Joseph K, *et al.* Leptospirosis in India. *Jour Med.* 1966; 54:611-614.
- 55.** Pooja, L, *et al.* Serological evidence of leptospirosis by IgM elisa and IgM dipstick in patients of acute febrile illness. XXV National congress of Indian association of medical microbiologist. 2001; 90:15-70.
- 56.** Jagovkin E, *et al.* The improvement of inmunobiological preparations against leptospirosis. An experimental study of a new concentrated purified vaccine against icterohemorrhagic leptospirosis for human inmunization. *Epi Inmun.* 1990; 65:47-51.
- 57.** Grizhebovskiy G. Proyecto de la vacuna antileptospirósica para uso humano. Ministerio de salud pública. Instituto de sueros y vacunas Stavropol. Moscú. 1986; 55:12-45.
- 58.** Fiodorov Y; Instrucción para el uso de la vacuna antileptospirósica. Departamento de enfermedades infecciosas del MINSAP. Rusia. 1988; 60:10-54.

- 59.** González M., *et al.* Vacuna antileptospirósica trivalente absorbida para uso humano. Instituto Finlay. Cuba. Diciembre 1997; 25:2-10.
- 60.** Martínez R. Estudios de fase I y II para la evaluación de una vacuna contra la leptospirosis humana. Boletín epidemiológico semanal. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. 1996; 6(21):3-4.
- 61.** Varma MGR. Geographical Distribution of arthropod-borne Disease and their principal vectors. World Health Organization (document). Geneva, 1989; 125:56-82.
- 62.** Gubler D, Kuno G. Dengue, Dengue Hemorrágico en las Américas; Guías para su Prevención y control. OPS Publicación Científica. 1995; 548: 41-51.
- 63.** Pinheiro F, *et al.* Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. *Infect Med.* 1998; 305:244-255.
- 64.** Espinoza A, *et al.* Fiebre hemorrágica dengue, estudio clínico en pacientes adultos hospitalizados, III Congreso Nacional de Medicina Interna. Habana. 1982.
- 65.** Gubler D. Dengue/dengue hemorrhagic fever in the Americas; prospects for year 1992; dengue a worldwide problem a commons strategy. México, 2000; 42:19-27.
- 66.** Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Bol, secretaria de Salud. 1998; 57:36-40.
- 67.** Instituto Nacional de Estadística geografía e Informática. Anuario estadístico del estado de Colima. México. 1998.
- 68.** Martínez E. Dengue y dengue hemorrágico. Editorial de la Universidad de Quilmes. Buenos Aires, Argentina. 1998; 30:1-25.

- 69.** Marianneau P, *et al.* Dengue Virus Replication in human's hepatoma cell, activates NF-kappa B which in turn induces apoptotic cell death. *J of vir.* 1997; 339:244-249.
- 70.** Deprés P, *et al.* Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse neurovirulent dengue viruses. *Jour of vir.* 1998; 900:823-829.
- 71.** Miagostovich M, *et al.* Retrospective study of dengue fatal cases. *Clin neuro.* 1997; 16(4):204-208.
- 72.** Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage a pathogenic cascade. *Rev Infect Dis.* 1989; 11:830-839.
- 73.** Malheiros SM, *et al.* Dengue muscle biopsy findings in 15 patients. *Arq. Neuropsiquiatrica.* 1993; 51:159-165.
- 74.** Soler M, *et al.* Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Instituto Oswaldo Cruz.* 1991; 86:330-367.
- 75.** Manual de laboratorio para el Diagnóstico del Dengue: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, publicación. INCAP. 1990; 85:6-77.
- 76.** World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever; diagnosis, treatment, prevention and control. 2<sup>nd</sup> edition. Geneva 1997; 68:10-47.
- 77.** Terpstra W.J. Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Washington DC: OPS, ILS, 2008.
- 78.** Buschiazzi HO. Cañas M. Leptospirosis en un país enfermo. *Femeba* 2001;(4):66:8-9 001;(4):66:8-9.

### XIII. ANEXOS

#### Figura A. Ficha epidemiológica

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y A.S.  
LABORATORIO NACIONAL DE SALUD  
UNIDAD DE DIAGNOSTICO CLINICO  
Km. 22 Carretera al Pacifico, Bárcena, Villa Nueva  
Tel. 6312013

No. CODIGO \_\_\_\_\_

**FICHA NACIONAL DE INVESTIGACION**  
**CASO SOSPECHOSO DENGUE CLASICO Y/O HEMORRAGICO**

**DATOS GENERALES**

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_ Loc.: \_\_\_\_\_ Depto. \_\_\_\_\_  
Persona responsable: \_\_\_\_\_

**2. DATOS CLINICOS**

	FECHA	TIPO DE MUESTRA
Fiebre _____	Primer síntoma _____	SUERO <input type="checkbox"/>
Dolor de cabeza _____	Primer muestra _____	PAPEL FILTRO <input type="checkbox"/>
Dolor de ojos _____	Segunda muestra _____	
Dolor de cuerpo _____	Pte. Embarazada: _____	
Dolor de Articulaciones _____	Meses de embarazo: _____	
Escalofríos _____		
Náuseas _____		
Vómitos _____		
Diarrea _____		
Erupción cutánea _____		
Vómitos con sangre _____		
Hemorragia en nariz _____		
Hemorragia en encía _____		
Sangre en orina _____		
Hemorragia vaginal _____		
Melena _____		
Patequias _____		
Púrpura o equimosis _____		
Prueba de torniquete _____		

**Para paciente hospitalizado:**

DATOS DEL LABORATORIO CLINICO		
HB: _____	HT: _____	PLAQUETAS: _____
Recuento de Glóbulos Blancos: _____		
Fórmula: N _____	L _____	B _____ E _____

**3. DATOS EPIDEMIOLOGICOS**

a) Durante los 10 días antes de su enfermedad, viajó a otro lugar: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
¿A donde viajó? \_\_\_\_\_

b) ¿Ha viajado durante su enfermedad? SI: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_ ¿Adónde? \_\_\_\_\_

c) ¿Tuvo DENGUE antes? (fiebre, dolor, dolor ojos, erupción) SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
¿Cuándo? (MES - AÑO) \_\_\_\_\_

d) ¿Fue picado por mosquito diurno? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

ENVIAR RESULTADO A:	RESULTADO
Nombre: _____	No. De Registro _____
Institución: _____	Fecha de Recibido: _____
Dirección: _____	Fecha Examen: _____
	POSITIVO <input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/>
	Tipo de DENGUE: _____

**NOTA:** Original: se queda archivada en el servicio en que se estudió el caso.  
Copia: enviar con muestra representativa al Laboratorio Nacional de Salud.