

I. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

- A. **Titulo del proyecto macro:** Caracterización fenotípica, serológica y molecular de *Leptospira* spp en fuentes de agua de consumo humano en Masagua, Escuintla.
- B. **Coordinador del proyecto:** Licda. María Luisa García de López.
- C. **Titulo del seminario:** Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en fuentes de agua de la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.
- D. **Asesor del Seminario:** Licda. María Luisa García de López.
- E. **Co-Asesor del Seminario:** Licda. Shirley Sikahall Prado.
- F. **Ubicación dentro del proyecto macro:** Estandarización de medios de cultivo, pruebas de diferenciación fenotípica e identificación por antisueros policlonales.
- G. **Duración del proyecto:** 4 meses
- H. **Unidad académica responsable:** Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

II. RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis producida principalmente por *Leptospira interrogans* y es una enfermedad considerada como reemergente. Se distribuye a nivel mundial, con predominio en países tropicales en donde se conjugan factores de riesgo ecológico basados fundamentalmente en la ausencia o deficiencia en el sistema de abastecimiento y almacenamiento de agua para consumo humano, la existencia de reservorios domésticos ya que existen patrones de vida que propician la convivencia íntima e inadecuada con animales y factores socio-económicos y culturales de las poblaciones.

Las epidemias de leptospirosis son frecuentes en determinadas épocas del año principalmente en época lluviosa y son las aguas contaminadas uno de los factores que más contribuyen a la diseminación de las leptospirosis. En Guatemala no existen estudios epidemiológicos que indiquen el comportamiento ni la magnitud de dicha enfermedad.

El objetivo principal del presente estudio fue aislar e identificar *Leptospira interrogans* en fuentes de agua de la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, basado en un estudio realizado en dicha aldea (2008), en el cual se determinó que existe una alta seroprevalencia de leptospirosis tanto en la población humana (52%) como en la población animal (54.9%), especialmente alta en la especie canina.

Se procesaron un total de 29 muestras de agua, utilizando los medios EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5 fluoracilo y Fletcher para el aislamiento de *Leptospiras* spp. En estos medios se obtuvo un 55.17% de crecimiento presuntivo en el primero y un 50% de crecimiento en el segundo.

Del total de muestras se logró aislar dos cepas de *Leptospiras* spp, las cuales fueron identificadas a través de la prueba fenotípica de crecimiento en presencia de 8-Azaguanina, útil para diferenciar *Leptospira biflexa* (saprobica) de *Leptospira interrogans* (patógena) y se determinó que ambas cepas son

Leptospira biflexa, confirmándose con la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

No se logró aislar *Leptospira interrogans*, pero el aislamiento de una cepa de leptospira no patógena, permite inferir que están dadas las condiciones para que cepas patógenas puedan estar presentes.

Por lo que resaltamos la importancia de realizar más estudios de este tipo y en poblaciones como ésta, que presenta las condiciones ideales para la sobrevivencia de leptospiros, haciendo énfasis en que el agua es uno de los principales vehículos por los que se puede diseminar la leptospirosis y además que las condiciones socioeconómicas y la forma de vida de los habitantes los hace susceptibles a adquirir dicha enfermedad.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa de reconocimiento reciente cuya importancia va en aumento, como lo demuestran los grandes brotes registrados hace poco tiempo en Asia, América Central, América del Sur y Estados Unidos. Es una zoonosis de distribución mundial producida por leptospiras patógenas del género *Leptospira* que se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde una infección inaparente hasta una enfermedad fulminante y fatal. La leptospirosis leve puede presentar síntomas inespecíficos, como cefalalgias y mialgias. La leptospirosis grave se conoce también como síndrome de Weil y se caracteriza por ictericia, alteraciones de la función renal y diátesis hemorrágica (1, 2).

Los países tropicales y sub tropicales son los más afectados, pues las condiciones climáticas como: precipitación pluvial, temperatura, humedad relativa así como el pH, estructura y la composición del suelo favorecen su presencia (2).

La leptospirosis es considerada una zoonosis, por los efectos sobre la producción animal, se le añade un importante aspecto sanitario donde en el ser humano está considerada una infección accidental (2, 3).

B. Agente etiológico

Las leptospiras pertenecen al género *Leptospira*, a la familia Leptospiraceae, orden Spirochaetales. El género *Leptospira* consiste en un grupo de leptospiras patógenas *L. interrogans* sensu lato y leptospiras no patógenas, *L. biflexa* sensu lato.

Los métodos de análisis genéticos han sido utilizados para identificar y clasificar especies de leptospiras. La secuencia del gen *rrs*, codificado por 16S rRNA, es comúnmente la más utilizada y aceptada para estudios de relación genética. Entre los géneros la especie es definida mediante el uso cuantitativo de la hibridación de DNA-DNA para medir el grado de relación del DNA entre

las cepas de leptospira, es el método de referencia para asignar las cepas a las especies. En el presente cerca de 300 cepas han sido clasificadas en base a estudios de DNA homólogos (3, 4).

Se han identificado 16 especies genómicas de Leptospiras patógenas por su similitud en DNA, pero desde el punto de vista clínico y epidemiológico es más práctico utilizar una clasificación basada en diferencias serológicas. Las leptospiras patógenas se dividen en variedades serológicas (serovariedades) según su composición antigénica. Más de 250 serovariedades integran 25 grupos serológicos (serogrupos) (1). Dentro de las especies patógenas se encuentran *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. weilii* y en las especies saprófitas, *L. biflexa*, *L. genomospecies*, *L. wolbachii*, *L. parva* y *Leptonema illini* (2).

Las leptospiras son microorganismos espirales, finos y dotados de gran movilidad con extremos en forma de gancho y dos flagelos periplasmáticos, con los cuales penetran en los tejidos. Estos microorganismos miden de 6 a 20 μm de longitud y aproximadamente 0.1 μm de ancho. Son agentes tan finos que pueden pasar filtros que retienen otras bacterias (0.2 – 0.45 μm). Se observan por microscopía de campo oscuro. Además, se pueden teñir por impregnación argéntica, generalmente no se tiñen con facilidad con los colorantes de anilina. Son organismos Gram negativo. Las leptospiras requieren medios y condiciones especiales para su proliferación. Los cultivos pueden tardar de 2 hasta 8 semanas en observarse positivos por microscopía de campo oscuro (1-3,5-6).

Las leptospiras poseen una membrana externa o envoltura constituida por lípidos, proteínas y lipopolisacáridos, la cual es de gran importancia antigénica, dos flagelos periplasmáticos (filamentos axiales) situados entre la membrana externa y la pared celular fijos en ambos extremos de la bacteria, cuyos extremos libres se extienden hacia la parte media y no se superponen, un cilindro protoplasmático de forma helicoidal con el contenido celular, material nuclear, ribosomas, mesosomas y cuerpos de inclusión celular (1-3).

Todos las leptospiras son quimioorganotróficos, son aeróbicos y utilizan a los ácidos grasos saturados de cadena larga como fuente de carbono; aunque algunas cepas patógenas tienen capacidad para utilizar ácidos grasos insaturados, a diferencia de las saprofiticas que no utilizan este tipo de ácidos, utilizan como fuente de nitrógeno las sales de amonio. Todas las leptospiras son oxidasa positiva, *L. interrogans* es catalasa positiva mientras que *L. biflexa* es negativa (2, 3).

Las leptospiras patógenas y saprofiticas no se pueden diferenciar por su morfología o por pruebas bioquímicas, sino por su patogenicidad, la presencia de enzimas, la relación G + C en el DNA, además por sus características fenotípicas, como el crecimiento a 13°C, 30°C y 37°C, crecimiento en medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris -EMJH- con suplemento de albúmina y ácidos grasos en presencia de 8-azaguanina o Sulfato de calcio, actividad de la lipasa y la aparición de formas esféricas con la presencia de NaCl 1M (2,6). Para diferenciar entre las leptospiras patógenas y no patógenas, los métodos más apropiados son: el crecimiento a diferentes temperaturas en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos y la 8-azaguanina. Las leptospiras patógenas se caracterizan por no crecer en presencia de 8-azaguanina y a temperatura de 13°C, a diferencia de las no patógenas que logran desarrollarse en estas condiciones (7, 8). (Ver anexo 3).

Para la supervivencia en el medio ambiente necesitan un porcentaje alto de humedad en el suelo, en la bibliografía consultada no se establece el rango, temperatura de 25-30°C, agua con pH neutro o ligeramente alcalino (7-8) y la presencia de materia orgánica. En suelo con todas estas condiciones y saturado de agua, pueden vivir hasta 183 días y en suelo seco 30 minutos. En agua estéril pueden vivir hasta 3 meses o más, en tierra ácida sobreviven por 7 semanas, en lodo de tierra por lo menos 3 semanas, en lagunas 22 días, viven en orina débilmente alcalina como la del cerdo, vaca y equino más de 16 días, cuando la tierra se contamina con la orina de ratas infectadas la leptospira sobrevive durante aproximadamente 2 semanas y en nitrógeno líquido sobreviven 32 meses (2,9).

C. Epidemiología y distribución

La leptospirosis es una zoonosis reemergente de distribución mundial, pero con predominio en países tropicales en donde se conjugan factores de riesgo ecológico, entre otros la existencia de reservorios domésticos, con factores socio-económicos y culturales, los primeros, basados fundamentalmente en la ausencia o deficiencia en el sistema de abastecimiento y almacenamiento de agua para consumo humano y los segundos, por la existencia de patrones de vida que propician la convivencia íntima e inadecuada con animales (10,11).

En años anteriores estaba vinculada con actividades ocupacionales, como trabajadores de arrozales, campos de caña de azúcar, granjeros, mineros, trabajadores de alcantarillados, empleados de mataderos, criadores de animales y médicos veterinarios. Actualmente este concepto ha cambiado ya que la enfermedad se ha observado en personas ajenas a este grupo como los niños, amas de casa, estudiantes, profesionales y turistas. También representa un peligro para bañistas, deportistas y personas que acampan en zonas infectadas al estar en contacto con aguas contaminadas (4,11-13).

D. Incidencia y Prevalencia

La Organización Mundial de la Salud –OMS- ha estimado una tasa de incidencia en humanos aproximadamente de 0.1 – 1 personas por 100,000 personas al año en climas templados y de 10 – 100 personas por 100,000 personas en países que van desde climas húmedos a tropicales (4).

En el continente americano, ha sido publicado la prevalencia en algunos países como México 14.1%; Argentina 38%; Brasil 9.8%; Cuba 12%; El Salvador 17.5% y Colombia 18.5%. La seroprevalencia se determinó en una población sana sin tomar en cuenta el grupo de alto riesgo (riesgo ocupacional) (2).

Las epidemias de leptospirosis son frecuentes en determinadas épocas del año principalmente en época de lluvia y son las aguas contaminadas uno de los factores que más contribuyen a la diseminación de las leptospiras (8, 11, 14).

En la mayoría de los países centroamericanos se registran pocos casos, excepto en Nicaragua, país donde la leptospirosis se reconoce como un problema de salud pública desde la epidemia del año 1995, momento en que se notifican alrededor de 2,000 casos y más de 50 defunciones. Durante 1998 Centroamérica sufrió inundaciones provocadas por las lluvias constantes que trajo consigo el huracán Mitch, circunstancias que condujeron al desarrollo de brotes de leptospirosis siendo Honduras uno de los países más afectados (14).

E. Estudios realizados en Guatemala

El primer caso de Leptospirosis humana fue detectado por Torres M. en 1980. El diagnóstico microbiológico se realizó durante la etapa aguda de la enfermedad por medio de la observación directa de leptospirosas en campo oscuro del plasma heparinizado y en sedimento urinario, el aislamiento del agente etiológico en varios hemocultivos y la demostración en el suero del paciente de inmunoglobulinas anti-leptospira por medio de pruebas de aglutinación. El suero del paciente fue enviado al Centro de Control de Enfermedades de Atlanta –CDC- confirmándose por la Técnica de Aglutinación Microscópica en placa -MAT- el serogrupo correspondiente a *L. interrogans*, serovariedad copenagheni (15).

En el año 2003 Orantes J. realizó una comparación entre los métodos de campo oscuro y aglutinación en látex comparado con la técnica de Ensayo Inmunoenzimático –ELISA- para el diagnóstico de Leptospirosis en pacientes que asistieron a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios durante el período de mayo a octubre del año 2002. Con las técnicas utilizadas se estableció que la sensibilidad y especificidad de la aglutinación en látex y campo oscuro eran muy bajas, por lo que se consideró que ambos métodos no son adecuados para el diagnóstico de leptospirosis humana, además determinó para este estudio que la frecuencia de leptospirosis en la emergencia de adultos de dicho hospital la cual fue de 73.33%, en 90 pacientes que presentaron cuadro clínico sugestivo de leptospirosis (16).

En nuestro país, durante la época lluviosa, anualmente ocurren inundaciones en zonas como el departamento de Escuintla. En el año 2003 se reportó en el Área de Salud de Escuintla la muerte de una persona del sexo femenino de 28 años de edad, promotora de salud del equipo básico del municipio de Masagua, presentando cuadro febril hemorrágico, siendo atendida en el Instituto Guatemalteco de Seguridad Social –IGSS- de ese departamento, con posible diagnóstico de dengue clásico con manifestaciones hemorrágicas. Debido a lo inespecífico de la causa de muerte se efectúa necropsia médico legal, obteniendo muestras de tejido: cerebral, hepático y pulmonar las que fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Salud -LNS- del Ministerio de Salud Pública, no pudiendo obtenerse los resultados . “De acuerdo a la información indagada inicialmente por esta área reporta que el día 23 del mismo mes, la aldea El Milagro, Masagua, fue inundada por aguas del río Escalante. Debido a esta situación emergente el equipo multidisciplinario de reacción inmediata de la Dirección de Salud de Escuintla se hizo presente para realizar la evaluación epidemiológica del área afectada. El día 6 de julio del mismo año la Dirección de Área reporta la presencia de casos febriles en las personas que cubrieron la emergencia en las zonas de inundación en los municipios de Masagua, Puerto de San José y la Gomera”, se entrevistaron 30 personas miembros del equipo de reacción inmediata que cubrió la emergencia de inundación, obteniéndose 6 casos confirmados de leptospirosis por ELISA IgM (17).

En agosto del 2004 Estrada realizó un trabajo de tesis con el objetivo de establecer el diagnóstico diferencial de leptospirosis humana y dengue en pacientes con enfermedad febril referidos al Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica –LVE- del área de salud de Escuintla. De 84 muestras obtenidas de pacientes con enfermedad febril, 14 fueron positivas para dengue y se detectaron 8 casos positivos de leptospirosis humana, con la prueba de ELISA IgM, los que posteriormente fueron confirmados con la técnica MAT. Determinando que *Leptospira interrogans* estuvo presente en los 8 casos positivos por la prueba ELISA, así como el serogrupo Icterohaemorrhagiae. El estudio demostró que los habitantes de Escuintla son vulnerables a presentar dengue y leptospirosis humana, por lo que se debe realizar el diagnóstico diferencial de estas patologías a pacientes con enfermedad febril referidos al

LVE con el fin de asegurar el diagnóstico temprano de la enfermedad, el adecuado tratamiento y el seguimiento de los casos, además en el caso de leptospirosis, lograr establecer los serogrupos que circulan en las diferentes regiones de Escuintla (18).

Sikahall en el año 2006 estandarizó la prueba de aglutinación microscópica en placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana y la aplicó a 4 grupos de estudio con 30 muestras cada uno: 1) hepatitis B o C, determinado por ELISA IgM, 2) sueros reactivos para leptospirosis establecidos con ELISA IgM, 3) sueros reactivos a dengue por inmunofluorescencia y 4) donadores de sangre, como grupo control. El total de las muestras fueron analizadas por la técnica de MAT contra 10 diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans*, encontrándose que el 25% del total de las muestras fueron positivas con dicha metodología. Las serovariedades encontradas en el estudio fueron las siguientes: icterohaemorrhagiae (63.64%) canicola (24.24%), pomona (6.06%), bataviae (3.03%) y pyrogenes (3.03%) (19).

En los meses de febrero a noviembre del año 2007, Zelaya estableció la seroprevalencia de Leptospirosis en la aldea El Milagro Masagua, Escuintla, considerada una zona en riesgo de sufrir inundaciones en la época de lluvia de acuerdo al reporte del año 2,003. Se detectó la presencia de anticuerpos anti-leptospira por las técnicas MAT y ELISA IgG, en 199 muestras de sueros humanos mayores de 15 años y de 91 muestras de sueros de animales domésticos. La seroprevalencia determinada por medio del MAT en el grupo humano estudiado fue de 51.8% y la seroprevalencia encontrada en las especies animales de 54.9%; especialmente alta en la población canina 58%, en suinos de 36% y en bovinos 13.2%. Además en 9 diferentes lugares de la comunidad fueron recolectadas muestras de agua y se realizaron 4 muestreos, en los meses de abril, julio, septiembre y octubre. Para la selección de fuentes de agua, se hizo un recorrido por la aldea El Milagro en busca de las fuentes comunes. En 4 lugares las muestras fueron positivas para *Leptospira* sp, y en 3 de ellas fue detectada *Leptospira interrogans* por medio de la metodología de Reacción en cadena de la polimerasa -PCR- por el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri -IPK- (20).

En el año 2008 Galindo realizó un estudio que demostró la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en donadores de sangre del Hospital General San Juan de Dios y demostró la circulación y frecuencia de los diferentes serogrupos de *Leptospira* por medio de la técnica de MAT. De 140 sueros analizados, 18 (12.86%) fueron reactivos frente a 1 o más de los diez serogrupos de *Leptospira interrogans*. Los serogrupos encontrados pertenecen a *L. interrogans* en las siguientes proporciones: Icterohaemorrhagiae, (27.27%) Hebdomadis, (27.27%) Sejroe, (18.18%) Canicola, (13.64%) Bataviae (13.64%). Estos resultados demuestran que *L. interrogans*, circula en el país y que esta enfermedad es más frecuente de lo que se sospecha (21).

F. Estudios realizados de aislamiento de *Leptospira* sp en fuentes de agua.

En las zonas húmedas, lluviosas y de clima templado, la leptospirosis puede adquirir un carácter endémico, en especial si la agricultura y la ganadería se desarrollan en países con climas tropicales, abundantes ríos y lagos y temperaturas promedio de 30°C. Las leptospiras crecen favorablemente siendo los animales los más afectados junto con los pobladores de estas áreas. Los cambios climatológicos también son importantes, por ejemplo las lluvias torrenciales que son causa del desbordamiento de ríos, presas y lagos, pueden dar lugar a brotes de leptospirosis (6).

En marzo-abril de 1998 Vanasco identificó en un barrio de la ciudad de Santa Fe, Argentina un brote de una enfermedad aguda caracterizada por fiebre, cefaleas y mialgias intensas. Los hallazgos epidemiológicos, serológicos y clínicos indicaron que el agente causal fue *Leptospira interrogans*. Se estudiaron 32 individuos, 8 perros y 8 muestras de agua estancada de la zona (zanjones y alcantarillas). Se registraron 12 casos confirmados, 2 probables y 18 negativos. En 6 perros se demostró la existencia de la infección y en las muestras de agua se detectó la presencia de espiroquetas móviles en los exámenes directos y en los cultivos, sin embargo, no pudieron ser tipificadas debido a la alta carga inicial de contaminantes. Este trabajo se realizó con el propósito de identificar la fuente de infección y el modo de transmisión, como primer paso para el diseño de medidas de prevención y

control. Los resultados de este estudio resaltan la necesidad de contar con un sistema de vigilancia activa de la leptospirosis ante desastres naturales que se conocen con antelación, como en el caso de las inundaciones durante los períodos del año con lluvias abundantes. En estas condiciones se debería considerar la posibilidad de leptospirosis ante la presencia de síndromes febriles acompañados de cefaleas y mialgias (22).

En el 2,002 Trueba, en la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador investigó *in Vitro*, la capacidad adaptativa de *Leptospira interrogans* a medios acuosos carentes de nutrientes y baja osmolaridad del agua dulce. Se ha demostrado que las especies patógenas de leptospirosis pueden sobrevivir en agua o suelo húmedo por períodos prolongados de tiempo de 15 a 74 días, pero muy poco se sabe acerca de la posible capacidad de esta bacteria para multiplicarse en éstos medios. Brotes recientes han puesto en evidencia la importancia del agua dulce como fuente de infección de leptospirosis humana. Este estudio sugiere que la lluvia incrementa la posibilidad de supervivencia y posiblemente la multiplicación de leptospirosis patógenas en el medio ambiente, al diluir las sales y los metabolitos microbianos. Otros autores han encontrado que las corrientes de agua y los arroyos son mucho más peligrosos que acumulaciones de agua estática, posiblemente más ricas en bacterias ambientales y con mayores concentraciones de sales (23).

En el 2,002 De León realizó un estudio en aguas de 15 explotaciones porcinas como vehículo de la leptospira, en la zona central cafetalera de Colombia, con el objetivo de conocer la importancia del agua como foco de contaminación por *Leptospira* sp y obtener cepas que en un futuro serían utilizadas en la preparación de inmunógenos preventivos, que favorecerían no solo la salud animal sino también la humana. Las cepas obtenidas fueron sometidas a técnicas biológicas para diferenciación entre *L. biflexa* y *L. interrogans* mediante crecimiento a 13°C, en presencia de 8-azaguanina, conversión a células esféricas en NaCl 1M y crecimiento en TSB (Trypticase Soy Broth) para la diferenciación entre *Leptospira* y *leptonema* (24).

Se recolectaron 292 muestras de aguas, que se utilizan para consumo de agua y lavado. Se analizaron por visualización directa todas las muestras, de las cuales 60 fueron positivas para *Leptospira*, 20.5% (60/292). Además se recolectaron 47 muestras de aguas servidas, de las cuales 66% (31/47) fueron positivas por microscopia de campo oscuro. El orden de importancia en cuanto a tasa proporcional de contaminación fue: aguas servidas, tanque de almacenamiento, chupones bebederos y tanque de lavado. La positividad de cultivos para *Leptospira* fue: en aguas para consumo y lavado 14.2% y 9.3% en aguas servidas. La tasa proporcional más alta de contaminación por *Leptospira* sp en las aguas de consumo y lavado, lo presentaron los tanques de almacenamiento y los chupones bebederos. De las 17 cepas obtenidas de las aguas cultivadas, que se sometieron a pruebas de diferenciación entre *L. biflexa* y *L. interrogans*, se observó crecimiento a 13, 28 y 30°C, sin embargo no hubo inhibición del crecimiento con 8-azaguanina, ni conversión a células esféricas en NaCl 1M y en cultivos en TSB no se presentó crecimiento de las espiroquetas.

Adicionalmente se encontró que la mayoría de los cultivos positivos tenían un pH de 6.4 y que el mayor número de cepas se obtuvo de muestras tomadas a 20 cm. de profundidad (24).

G. Reservorio

La leptospirosis tiene como reservorios fundamentales a los roedores y animales domésticos, aunque existen también algunos animales silvestres tales como: topillo, erizo, mapache, que funcionan como tal (14).

Los reservorios de las leptospiras son animales que mantienen una relación comensal con este género de bacterias y no sufren, o sufren levemente la enfermedad; transfieren las leptospiras a sus crías en útero o el período neonatal, favoreciendo la cadena de transmisión. Los portadores son aquellos animales que mantienen las leptospiras viables y con capacidad de multiplicarse en sus riñones, excretándolas intermitentemente por la orina; sin manifestar la enfermedad, muchos de estos pueden tener serología negativa (9, 25).

Los reservorios más importantes son mamíferos pequeños que pueden transmitir la infección a los animales domésticos y a los humanos. La transmisión depende de factores como el clima, el grado de contacto entre el reservorio y los hospederos accidentales. Los roedores pueden ser reservorios de diferentes serogrupos, las ratas generalmente son reservorios de Icterohaemorrhagiae y Ballum, y los ratones son reservorios para el serogrupo Ballum (9).

Los animales domésticos también son reservorios accidentales, los cerdos albergan a los serogrupos Pomona, Tarassovi, y Bratislava; las ovejas Hardjo, y Pomona; los perros Canicola; y el ganado vacuno puede albergar serogrupos como Grippotyphosa, Pomona y Hardjo. El serogrupo Hardjo causa infección al ganado vacuno en todo el mundo y produce brotes de mastitis y abortos; también se puede encontrar en fetos abortados y en terneros prematuros. Además se ha aislado en fetos sanos, descarga vaginal y en el tracto genital, urinario y en semen de toros (2, 9).

Las distintas variaciones en los reservorios accidentales y sus serovares ocurren a lo largo del mundo. Un conocimiento de los serovares prevalentes y sus reservorios accidentales es esencial para entender la epidemiología de la enfermedad en cualquier región (9).

H. Mecanismo de infección

La infección humana es el resultado de la exposición a la orina infectada de mamíferos portadores, ya sea directamente o vía contaminación de tierra o agua. Las puertas usuales de entrada de las leptospiras son las abrasiones, cortes en la piel y por vía conjuntival; la infección también puede darse después de la inmersión prolongada en el agua. La transmisión en el agua se ha documentado en muchos brotes de leptospirosis. Se ha reportado también que por la inhalación de agua o por aerosoles y el ingreso hacia las vías respiratorias se puede producir la infección. Raramente la infección puede darse por mordeduras de animales. La transmisión directa entre los humanos ocasionalmente se ha demostrado porque el pH bajo de la orina limita la sobrevivencia de la leptospira después de la excreción (1, 2, 6, 9).

El agua constituye un importante vehículo de transmisión de leptospiras, tanto para animales como para el humano. La contaminación del agua ocurre por orina, fetos, abortos y secreciones uterinas de animales infectados por leptospirosis. Debido a su condición de zoonosis, es necesaria la identificación de leptospiras patógenas en aguas de consumo, lavado y residuales, sin embargo, estudios epidemiológicos pueden requerir muestras tomadas de aguas frescas, lagos y ríos donde *L. interrogans* y *L. biflexa* pueden coexistir (1, 2, 24, 26).

Las leptospiras en el agua, permanecen viables durante varios meses con un pH de 7.2 a 8; la supervivencia en agua de río es más corta pero es prolongada a bajas temperaturas. En aguas servidas domesticas disminuye el tiempo de supervivencia a pocas horas, en tierra ácida (pH 6.2) sobreviven por 7 semanas, y en lodo de tierra por lo menos 3 semanas. También se piensa que los rezagos de detergentes han reducido la supervivencia de las leptospiras en los desagües, pues se inhiben a concentraciones bajas de detergente. Cuando la tierra se contamina con la orina de ratas infectadas la leptospira sobrevive durante aproximadamente 2 semanas. En aguas albañales las leptospiras se mantienen de 3 a 5 días. En charcos de agua de lluvia pueden vivir hasta 18 días, se ha demostrado que *Leptospira interrogans icterohaemorrhagiae*, puede sobrevivir durante meses en aguas contaminadas (2, 9, 27).

La temperatura del agua tiene un efecto beneficioso para el desarrollo de las leptospiras. Las temperaturas bajas disminuyen la multiplicación de los microorganismos, pero el tiempo de supervivencia aumenta y las altas temperaturas favorecen la multiplicación, pero con menos tiempo de supervivencia (2).

Se han aislado serogrupos patógenos de fuentes de agua en las regiones tropicales y en los Estados Unidos se han aislado los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Dakota, Ballum, Pomona y Grippytyphosa (9).

Se ha encontrado un mayor número de casos de leptospirosis cuando los valores pluviométricos son elevados, habiendo una relación significativa entre las inundaciones y el incremento de enfermos. Los brotes epidémicos de leptospirosis pueden deberse a la exposición a agua de lluvia contaminada por la orina de animales infectados. La leptospirosis ocurre por lo general en el trópico, ya que el clima y las condiciones desfavorables de trabajo e higiene favorecen la supervivencia del agente patógeno (1, 27).

I. Hallazgos patogénicos y patológicos

Las leptospiras pueden introducirse en el organismo a través de las heridas cutáneas o incluso a través de la mucosa intacta, principalmente en la conjuntiva y la que tapiza la bucofaringe y nasofaringe. El consumo de agua contaminada puede facilitar el paso de las leptospiras a través de la boca, la faringe, o el esófago. Una vez que penetran los microorganismos se produce una leptospiremia y el patógeno se extiende por todos los órganos. La leptospira se multiplica en la sangre y en los tejidos, y puede aislarse tanto en la sangre como en el líquido cefalorraquídeo -LCR- en los primeros cuatro a diez días de la enfermedad, su movimiento en tirabuzón y la producción de hialuronidasa, pueden explicar la penetración a estos sitios. El estudio del LCR en ese lapso corrobora la presencia de pleocitosis en la mayor parte de los casos, pero solo una pequeña proporción de enfermos terminan por mostrar síntomas y signos de meningitis en ese período. Todos los tipos de leptospiras pueden lesionar la pared de los vasos sanguíneos de pequeño calibre; esta lesión da lugar a vasculitis con salida de elementos celulares y otros elementos intravasculares, incluyendo los eritrocitos. Las propiedades patógenas más importantes de las leptospiras son la adhesión a las superficies celulares y la toxicidad celular (1, 3, 9, 11).

En la primera semana, la leptospira se puede encontrar en sangre y LCR, sin ocasionar síntomas neurológicos. Los órganos más frecuentemente afectados incluyen hígado, riñón, cerebro y músculos. Dentro de las complicaciones están la disfunción hepática que se manifiesta por la disminución de la excreción de la bilirrubina como alteración más frecuente, disminución de los niveles de albúmina sérica como consecuencia de

insuficiencia renal aguda, incremento de los niveles de inmunoglobulinas y disminución en la producción de los factores dependientes de la vitamina K (3, 9, 11).

La insuficiencia renal aguda por necrosis tubular aguda, es causada por efecto directo de la leptospira sobre el tejido renal, la hipoxia o el depósito de complejos antígeno-anticuerpo-complemento en los glomérulos. La afección vascular, se debe a vasculitis grave con daño endotelial, produciendo lesión en los capilares. En los músculos las alteraciones varían desde inclusiones vacuolares en las miofibrillas e infiltrado discreto de polimorfonucleares en el tejido muscular acompañado de elevación importante de la enzima creatin-fosfokinasa (CPK) (3, 9).

J. Manifestaciones clínicas

La mayoría de pacientes con leptospirosis presenta una forma leve de la infección, consistente en un cuadro febril autolimitado y sin ictericia. Las manifestaciones clínicas características no son claras ni definidas, dependen del serovar invasor confundándose con otros procesos infecciosos de tipo viral o bacteriano. Sin embargo alrededor del 10 % sufre cuadros graves, con ictericia intensa. Los distintos serogrupos de *L. interrogans* parecen producir cuadros similares (6).

El período de incubación suele ser de unos 7 a 15 días, con un promedio de 10 días. Típicamente, la leptospirosis presenta dos fases: la aguda o leptospirémica que tiene un comienzo abrupto y duración de 4 a 9 días y la inmune o leptospiúrica, sin embargo en muchos casos las dos fases son indistinguibles, y en los casos leves no siempre se presenta la segunda fase (1, 3, 6, 9, 11).

1. Leptospirosis leve

Las formas más leves de leptospirosis consisten en un cuadro clínico gripal, que generalmente consiste en cefalea frontal intensa y fiebre. Son igualmente frecuentes el dolor muscular, especialmente en las piernas, y el dolor en el abdomen y la espalda. También suele haber náuseas y vómitos (11).

Otros síntomas que pueden aparecer son: fotofobia, dolor faríngeo, erupciones cutáneas, desorientación y tos, en ocasiones con expectoración hemoptoica (1, 2, 9, 11).

El hallazgo más característico de la exploración es la conjuntivitis, que típicamente es muy intensa y en ocasiones es hemorrágica. También puede haber adenopatías, eritema faríngeo, hepatomegalia y esplenomegalia. Las erupciones cutáneas pueden ser maculares, papulares, eritematosas, urticariformes o hemorrágicas. En algunos casos puede haber subictericia, esta fase inicial de la leptospirosis suele durar 5 días (1-3,11).

En algunos casos, 2 o 3 días después de resolverse la fase inicial, reaparecen los síntomas. El inicio de esta segunda fase de la infección coincide con la aparición de anticuerpos. La sintomatología suele ser más leve que la de la primera fase, pero es mucho más variable. En aproximadamente el 20 % de casos ocurre una meningitis aséptica, clínicamente aparente, y más frecuentemente se produce pleocitosis asintomática; estas alteraciones meníngeas son más comunes en niños que en adultos. También pueden producirse uveítis, iridociclitis y coriorretinitis. Esta segunda fase puede durar desde unos pocos días hasta varias semanas, excepto las manifestaciones oculares que pueden cronificarse y persistir años. (1- 3, 9, 11).

2. Leptospirosis grave

A las formas más graves de leptospirosis se les conoce con el nombre de síndrome de Weil, y suelen cursar con ictericia, disfunción renal y diátesis hemorrágica. El serogrupo Icterohaemorrhagiae es el principal responsable de estas formas de leptospirosis en Europa. Estas infecciones se presentan con cuadros similares a los de las leptospirosis leves. Sin embargo, alrededor de una semana después del inicio, tras producirse una disminución parcial o no de los síntomas, se desarrollan las manifestaciones que caracterizan a estas formas más graves. La ictericia suele ser intensa, aunque no suele acompañarse de necrosis hepatocelular, ni de insuficiencia hepática. A la exploración suele haber hepatomegalia dolorosa y esplenomegalia. La afección renal consiste generalmente en una insuficiencia renal avanzada,

muchas veces con anuria, que puede requerir diálisis. No obstante la función renal puede recuperarse completamente a lo largo de las semanas siguientes con el tratamiento apropiado (1, 6, 9, 11).

En algunos casos de leptospirosis predomina la afección pulmonar, consistente en tos, disnea, dolor torácico y hemoptisis, relacionados con hemorragias parenquimatosas pulmonares. En estos casos, en las radiografías de tórax suelen aparecer condensaciones alveolares, generalmente debidas a hemorragias pulmonares; estos infiltrados son más frecuentes en las zonas periféricas de los lóbulos inferiores (1,6).

También son frecuentes la epistaxis y la púrpura, mientras que otras modalidades de sangrado, como la hemorragia digestiva o la hemorragia subaracnoidea son menos frecuentes. Otras manifestaciones más raras son: hemólisis, miocarditis, pericarditis, colecistitis alitiásica, pancreatitis aguda, síndrome del distrés respiratorio del adulto, shock, coagulación intravascular diseminada y fracaso multiorgánico (1, 6, 9, 11).

K. Diagnóstico

El diagnóstico clínico, tiene un carácter presuntivo y se realiza fundamentalmente a través de los signos y síntomas que se presenten en los casos sospechosos, siendo la historia de exposición a la enfermedad un importante dato a tener en cuenta cuando se plantea el posible diagnóstico de leptospirosis (2,11).

El diagnóstico de laboratorio de leptospirosis se basa en la identificación del microorganismo en cultivo por medio de técnicas bacteriológicas que son las más complejas, pero brindan resultados muy importantes tales como: la observación, el aislamiento y la identificación del microorganismo, y en la seroconversión o el incremento de cuatro veces en el título de anticuerpos en la prueba de MAT (1-2, 6).

1. Pruebas generales de laboratorio

Debido a que las manifestaciones clínicas de la leptospirosis varían en tipo y gravedad tanto en los hombres como en animales, es difícil su diagnóstico clínico, haciéndose necesaria la confirmación de los casos mediante pruebas específicas como el cultivo o el incremento del título de anticuerpos, sin embargo; existen pruebas que sin ser específicas para la enfermedad pueden orientar al clínico hacia el diagnóstico de leptospirosis (3,6).

En los análisis de sangre suele aparecer elevación de la velocidad de sedimentación globular, leucocitosis con desviación a la izquierda o en rango normal (a diferencia del dengue en que tienden a la leucopenia), y trombocitopenia ligera. En cuadros prolongados puede aparecer también anemia. La bilirrubina, la fosfatasa alcalina y la gamma-glutamyl-transpeptidasa suelen estar claramente elevadas, mientras que las transaminasas sólo suelen elevarse ligeramente. En los casos más graves todas estas alteraciones analíticas son más marcadas, y también pueden aparecer trastornos de la coagulación (3,11).

Son prácticamente constantes las alteraciones de la función renal, entre las que figuran la proteinuria y la aparición de leucocitos, hematíes y cilindros hialinos y granulados en el sedimento urinario. En los casos graves también se produce elevación de los niveles de creatinina y urea en la sangre. Es igualmente común la elevación de los niveles de las enzimas musculares, como la creatín-fosfoquinasa (CPK MM) (3, 6, 9, 11).

Las proteínas del líquido cefalorraquídeo (LCR) pueden ser normales o ligeramente elevadas, y la glucosa del LCR es generalmente normal. El examen inicial del LCR puede revelar el predominio de polimorfonucleares o de linfocitos que es seguido por preponderancia de los linfocitos (1, 3).

La clínica con los hallazgos de laboratorio mencionados pueden sugerir un caso probable de leptospirosis pero no es específico, por lo que es necesaria la confirmación del caso por pruebas microbiológicas, serológicas o moleculares específicas (9).

El diagnóstico debe basarse en el conocimiento de la patogenia del microorganismo, así como de sus propiedades. Estos métodos se pueden dividir en: técnicas indirectas, que detectan anticuerpos frente a las leptospiras y técnicas directas encaminadas a la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos y/o fluidos corporales (9, 11).

2. Técnicas Indirectas

Los métodos serológicos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos anti-leptospirales (IgM e IgG), son las pruebas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico de la leptospirosis. Además se han utilizado técnicas como: Prueba de aglutinación microscópica MAT, Prueba de Microaglutinación Microscópica con antígeno muerto (MSAT), Prueba de Hemaglutinación (HA), Fijación de complemento (FC), y ELISA (2).

a. MAT

Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos anti-leptospiras en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad. Es el método de referencia para el diagnóstico serológico de la leptospirosis debido a su alta sensibilidad y especificidad, además puede identificar el serovar o serogrupo de leptospira comprometida en la infección, siendo ésta la prueba estándar de referencia para la diagnóstico serológico de leptospirosis (1,9).

El MAT detecta los anticuerpos aglutinantes en suero, para ello se incuban los sueros de los pacientes y se usa como antígeno los diferentes serovares de *Leptospira*. Los sueros se enfrentan en diluciones seriadas con igual volumen de una suspensión de $1.5 - 2 \times 10^8$ leptospiras (antígeno) para luego observarse en el microscopio de campo oscuro para estimar el 50% de aglutinación como el punto final de la reacción antígeno-anticuerpo y posteriormente determinar el título de la muestra. Los anticuerpos IgM contra *Leptospira* sp llegan a ser perceptibles durante la primera semana de enfermedad (1-4, 9).

Para que el antígeno sea óptimo para la prueba tiene que observarse en el microscopio de campo oscuro entre 150 a 200 leptospiras por campo o hasta lograr una turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland (7).

El MAT es una prueba compleja y de difícil realización e interpretación, una desventaja de ésta prueba es que requiere de personal con experiencia, además es necesario sub cultivar semanalmente las cepas utilizadas como antígenos, por lo que se debe tomar en cuenta que esto representa un peligro para el personal de laboratorio por la continua manipulación de bacterias vivas (2, 6-7).

La interpretación del MAT es complicada por el alto grado de reacción cruzada entre diversos serogrupos, especialmente de las muestras en fase aguda, que se puede explicar por la presencia de varios antígenos comunes entre leptospiras; por lo que se deben realizar más diluciones del suero que presenten esta reacción. Además se ha demostrado que la serología por MAT en muestras con muy pocos días de enfermedad a veces puede dar resultados negativos, por lo que se debe extraer la muestra en un período de 4 a 10 días del inicio de los síntomas. Es importante obtener una segunda muestra después de 1 a 3 semanas para ver el incremento del título de anticuerpos, lo cual confirma el diagnóstico (3, 7).

Debido a estas limitaciones es necesario tener muestras de suero pareadas para confirmar el diagnóstico con certeza, por lo que para considerar un caso positivo se necesita un incremento de cuatro veces el título en los sueros pareados sin importar el intervalo entre las muestras; o una conversión del seronegativo a un título de 1/100 (9).

La batería que se usa en la técnica MAT como antígeno está representada por los serovares más prevalentes del área. Sin embargo, en aquellas regiones en donde no se conoce los serovares circulantes, la OMS recomienda por lo menos una cepa de referencia de los serogrupos más representativos de las especies más frecuentes (6, 9, 28).

3. Técnicas Directas

a. Observación en microscopio de campo oscuro

Este método se utiliza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos, siendo difícil debido al gran número de artefactos que, por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión, requiere de destreza y experiencia, debido a su mínima concentración en estas muestras. El examen directo al microscopio de campo oscuro no debe ser usado como único procedimiento de diagnóstico (2, 7).

b. Cultivo

El aislamiento de leptospira por cultivo es una técnica muy sensible, constituye una prueba irrefutable de la etiología de la enfermedad ya que permite conocer con certeza el serogrupo y el serotipo del microorganismo y se considera un método para evaluar otras pruebas de diagnóstico directo (11).

Las leptospiras se pueden aislar de sangre en los primeros 7 a 10 días de enfermedad. Otras muestras de las cuales se puede aislar, son el líquido cefalorraquídeo durante los primeros 10 días de enfermedad y de la orina a partir de la 2 a 4 semana de enfermedad. La supervivencia de las leptospiras en la orina humana es limitada, debido a que no resisten la acidez de la misma, por tanto esta se debe procesar inmediatamente o hasta un máximo de tiempo de 2 horas después de tomada la muestra (1, 3, 7, 9).

Todos los cultivos provenientes de fluidos corporales deben ser incubados entre 28 y 30°C por varias semanas puesto que esta bacteria crece lentamente y los cultivos se pueden reportar como negativos solamente después de un mínimo de 10 semanas o a veces después de tres meses de observación ya que existen algunas cepas de crecimiento fastidioso con requerimientos nutricionales más exigentes (3).

b.1 Características de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo pueden presentarse de tres formas, líquido, semi-sólido y sólido, los medios que pueden utilizarse son: Fletcher, Stuart, Korthof,

Schuffner, Ellinghausen – McCullough – Jonson – Harris (EMJH) y el medio de albúmina bovina polisorbato (Tween 80), sin embargo los más utilizados son EMJH y Fletcher (6).

El medio semisólido Fletcher resulta adecuado para el aislamiento y mantenimiento de cepas de referencia hasta 3 meses. Los medios líquidos como EMJH permiten el desarrollo de las leptospiras en forma abundante y son habitualmente utilizados para el desarrollo de cepas utilizadas en las pruebas serológicas (2,6).

Las leptospiras se desarrollan en medios de cultivo muy enriquecidos, como EMJH modificado que contienen como fuente de carbono y energía Tween 80, como fuente de nitrógeno NH_4Cl , fuente de hierro FeSO_4 y factores de crecimiento: Vitamina B_1 , B_{12} , glicerol, piruvato de sodio, además de suero de conejo al 10% o con la fracción V de albúmina bovina, en un rango de pH 7.2 – 7.6 (3, 6, 30).

Existen cepas patógenas de leptospiras de crecimiento fastidioso, con requerimientos nutricionales más exigentes que otras cepas, por lo que se ha evaluado la influencia de diferentes compuestos nutricionales a diferentes concentraciones del medio EMJH. En Cuba se estudió un nuevo medio de cultivo factible para la producción de vacunas de células enteras para uso humano utilizando el serogrupo Ballum ya que esta cepa es de crecimiento fastidioso, esta variante consiste en un aumento de la concentración de Tween 80 hasta 2.75 mg/mL, la incorporación de acetato de sodio a una concentración de 0.2 mg/mL y de extracto de carne a una concentración de 8 mg/mL manteniendo constante las concentraciones del resto de los componentes del medio EMJH, esta variante de medio permitió triplicar los rendimientos de biomasa comúnmente alcanzados, no se observó disminución de la virulencia de la cepa y tampoco se alteró la expresión de los principales antígenos inmunorrelevantes (30).

En otro estudio realizado en Cuba se evaluó la influencia de concentraciones crecientes de Tween 80 en el medio sintético EMJH sobre el

crecimiento, la virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok, para incrementar los rendimientos y aprovechar al máximo la capacidad destoxicante de la albúmina sérica bovina, obteniendo como resultado que el incremento de la concentración de Tween 80 hasta 3.25 mg/mL determina una aceleración del metabolismo bacteriano, que logra duplicar los rendimientos celulares con un consumo total de la fuente de carbono, sin afectación de la virulencia y antigenicidad durante numerosos sub cultivos sucesivos (31).

i. Medio selectivo

Debido a que los medios para el aislamiento de leptospiros son muy enriquecidos es necesario controlar la proliferación de otros microorganismos, esto se puede lograr añadiendo 5-fluoracilo que a concentración de 200 µg/mL inhibe el desarrollo de otras bacterias, pero no para las leptospiros, ya que éstas no utilizan fuentes externas de bases pirimídicas para incorporar en el ADN o ARN, por lo que son resistentes a la actividad de antibacterianos análogos a la pirimidina. La neomicina a concentración de 300 µg/mL no impide el crecimiento de treponemas y se utiliza con frecuencia para la purificación de cultivos (3, 32).

ii. Medio diferencial

Este medio se utiliza para la diferenciación de especies por sus características fenotípicas, está compuesto por EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8 azaguanina, ya que éste compuesto (8-AZ) es una purina que se incorpora al medio de cultivo y se utiliza como inhibidor del crecimiento. La cepa patógena *Leptospira interrogans* no crece en presencia de 8-azaguanina y la cepa no patógena *Leptospira biflexa* ha demostrado resistencia a la acción bacteriostática, por lo que ésta especie si crece en éste medio diferencial (3, 32).

iii. Factores que afectan la viabilidad de las Leptospiras

Existen factores externos que deben tomarse en cuenta debido a que afectan la supervivencia de las leptospiras in vitro.

- Cristalería lavada inadecuadamente.
- Medios de cultivo inapropiados.
- Sustancias inhibidoras.
- Tratamiento con antibióticos.
- Contaminación.
- Temperatura de incubación (28-30°C)
- pH del medio (7.2-7.4) (3)

c. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este método aun no está disponible para su empleo rutinario, pero es el que ofrece mayor eficiencia. Es una técnica costosa pero altamente específica que se puede usar en cualquier muestra clínica. Su utilidad en el diagnóstico es crítica ya que permite demostrar el agente en los primeros 8 días de la enfermedad, mientras que los anticuerpos aparecen en forma significativa hasta después de los 15 días. La técnica de PCR tiene una gran sensibilidad, puede detectar la presencia de dos o tres copias de la secuencia buscada, así como también especificidad ya que puede reconocer género, especie y variedad de un microorganismo en menos de 3 horas (4, 6).

Se utiliza para ampliar un segmento del DNA que se encuentra flanqueado por dos regiones de secuencia conocida. Este proceso está basado en el hecho de que las enzimas que realizan la síntesis del DNA requieren la presencia de una iniciador o primer para copiar la cadena que les sirve de molde y en que la capacidad del DNA de formar híbridos es dependiente de la temperatura (6, 29).

L. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

La leptospirosis se debe distinguir de otras enfermedades febriles que pueden cursar con una sintomatología similar a la de la leptospirosis. Entre ellas destacan varias infecciones, como la fiebre tifoidea, paludismo, hepatitis vírica, dengue hemorrágico, influenza, neumonía, meningitis, infecciones por Hantavirus y enfermedades causadas por rickettsias (1, 9, 11).

M. TRATAMIENTO

El tratamiento se basa principalmente en la terapia de soporte, control del desequilibrio electrolítico y ácido base. La antibioticoterapia debe iniciarse lo más temprano posible para evitar lesiones en los tejidos. El manejo de casos moderados a graves debe ser en forma hospitalaria. Todo paciente con diagnóstico presuntivo de leptospirosis debe ser hospitalizado cuando presenta los siguientes síntomas de alarma: fiebre elevada que no cede a antipiréticos (39°C), vómitos persistentes, dolor abdominal intenso que puede llegar al abdomen agudo, ictericia, manifestaciones hemorrágicas (gingivorragia, hemoptisis, melena, petequias generalizadas), dificultad respiratoria, trastornos hemodinámicos (shock), oliguria y signos meníngeos (3,9).

Existe controversia sobre la eficacia del tratamiento antimicrobiano en la leptospirosis leve y febril, por lo que los cuadros más leves de leptospirosis probablemente no requieren tratamiento alguno. En los casos más graves es fundamental administrar los antibióticos adecuados lo más pronto posible. Entre los antibióticos efectivos figuran la Penicilina G a la dosis de 1.5 millones de unidades cada 6 horas por vía parenteral, Ceftriaxona a la dosis de 1 g al día por vía parenteral, doxicilina a la dosis de 100 mg cada 12 horas por vía oral o amoxicilina a la dosis de 500 mg cada 6 horas por vía oral. Todos ellos deben administrarse durante una semana. Después de la primera semana de la enfermedad, una vez se inicia la fase inmune, el tratamiento es probablemente mucho menos eficaz.

En los casos graves también es fundamental el tratamiento de soporte de las distintas manifestaciones y complicaciones que pueden ocurrir, como la diálisis en casos de insuficiencia renal avanzada, transfusiones en casos de anemia severa, etc.

El tratamiento antibiótico puede ocasionar una reacción de Jarisch-Herxheimer, aunque este cuadro no es tan frecuente en la leptospirosis como en otras espiroquetosis. Este proceso, si es intenso, puede tratarse con glucocorticoides (1, 3,11).

Para grupos de personas que ingresen a zonas endémicas en forma temporal (personal militar, practicantes de deportes de aventura, brigadistas y otros), se recomienda aplicar, en adultos, doxicilina 200 mg vía oral una vez por semana o amoxicilina 500 mg vía oral una vez por semana; en niños amoxicilina 250 mg vía oral una vez por semana. El tratamiento quimioproláctico está recomendado mientras dure la estadía (9).

N. MEDIDAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN

Entre las medidas para prevenir el contagio por *L. interrogans* destacan: evitar la exposición a la orina y a los tejidos de los animales infectados y evitar el contacto con aguas que puedan estar contaminadas. Otras medidas adecuadas son la eliminación de roedores y la vacunación de los animales, aunque esta última solo posee una eficacia parcial. En casos de exposiciones transitorias puede ser razonable el empleo de quimioprofilaxis con doxicilina a la dosis de 200 mg cada semana (1, 2,11).

En los seres humanos las vacunas se aplican de modo más restrictivo, a las poblaciones de alto riesgo y/o en zonas endémicas. En China La inmunización en humanos casi siempre utiliza vacunas polivalentes en trabajadores de arrozales, cañeros, etc. En Cuba se utiliza una vacuna trivalente de *Pomona*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. En los últimos años en Cuba, se utiliza la vacuna Vax-Spiral en dos dosis de intervalo de 6 semanas (2).

Las medidas preventivas recomendadas por la Oficina Panamericana de Salud -OPS- son:

- Identificar las aguas y los suelos que puedan estar contaminados y cuando sea posible, proceder al drenaje de éstas aguas,
- Educar a la población respecto de los modos de transmisión como: evitar nadar en aguas que puedan estar contaminadas y utilizar medios de protección adecuados, si el trabajo obliga a la exposición.
- Realizar el control de roedores en las viviendas, especialmente en áreas rurales y las que se usan con fines recreativos.
- Proteger por medio de botas, guantes y delantales, a los trabajadores expuestos por su ocupación.
- La inmunización de los animales de granja y doméstica evita la enfermedad, pero no la infección, ni la eliminación de los microorganismos por la orina. La vacuna debe estar preparada con las especies de leptospiras que predominan en la localidad (4).

Algunas de las medidas principales recomendadas por varios autores son:

- Higiene personal y del ambiente doméstico, se debe impedir el ingreso de animales al interior de los domicilios, así como a los galpones de producción o almacenamiento de alimento.
- Se debe prohibir tanto a la población humana como animal beber o bañarse en agua de ríos, charcos y lagunas posiblemente contaminados con el agente.
- Control ecológico de la población animal salvaje.
- Aislamiento de los animales domésticos.
- Realizar estudios epidemiológicos para tener noción sobre prevalencia de la enfermedad en las especies así como para saber que serogrupo o serovar está circulando.
- Realizar informe anual sobre la situación de la enfermedad en el territorio (2).

IV. JUSTIFICACION

La leptospirosis es una zoonosis que se encuentra distribuida en todo el mundo, presentándose con mayor frecuencia en los países subdesarrollados con clima sub tropical o tropical húmedo. Es una enfermedad reemergente que muestra un comportamiento endémico y ocasionalmente epidémico, la cual tiene una letalidad del 10% que puede alcanzar hasta el 30% en países endémicos. Según estudios realizados en otros países se ha observado un incremento de casos de leptospirosis en los meses de mayor precipitación pluvial y después de inundaciones en las cuales se producen arrastres y con ésto se favorece a que las leptospiras se encuentren en mayor concentración.

Leptospira interrogans y *Leptospira biflexa*, pueden coexistir en aguas de lagos y ríos, siendo la primera patógena para el hombre y los animales. Sabiendo que el agua constituye un importante vehículo de transmisión de leptospiras es importante diferenciarlas, haciendo necesario estandarizar e implementar técnicas biológicas para diferenciar estas especies como primer paso en el aislamiento y la identificación. El aislamiento de *L. interrogans* en fuentes de agua es importante para establecer los serogrupos circulantes en el país y obtener cepas que en el futuro podrían usarse en la preparación de vacunas.

En nuestro país hay pocos estudios sobre esta enfermedad y no existe ninguno relacionado con la presencia de leptospiras patógenas en uno de los más importantes vehículos de transmisión como es el agua. Por lo que es importante desarrollar este campo, ya que la leptospirosis es una enfermedad que pasa por alto debido al diagnóstico clínico difícil y la falta de laboratorios especializados para su diagnóstico.

La presente investigación se realizó en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, ya que presenta condiciones sociales, biológicas y culturales (ver anexo 1 y 2) que ayudan a la propagación de leptospirosis. Por otro lado, en el año 2,007 se realizó un estudio para determinar la seroprevalencia de leptospirosis en esta aldea, obteniéndose un 51.8% de positividad en humanos y 54.9% en animales.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Aislar e identificar *Leptospira interrogans* en fuentes de agua, en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

B. ESPECÍFICOS

1. Estandarizar las pruebas de diferenciación en medio EMJH con suplemento albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina y crecimiento a 13°C.
2. Establecer la presencia de *Leptospira* sp en fuentes de agua.
3. Diferenciar *Leptospira biflexa* de *Leptospira interrogans* fenotípicamente
4. Identificar los serogrupos de *Leptospira interrogans*, por medio de antisueros policlonales.

V. HIPOTESIS

Por las características de este tipo de investigación, siendo un estudio descriptivo no se hace necesario plantear una hipótesis.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Fuentes de agua del Río Escalante y Guacalate (permanentes), pozos, depósitos de almacenamiento de agua y toma de agua (río intermitente), en la Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

1. Muestra

Se recolectaron 29 muestras de 5 tipos principales de abastecimiento de agua que existen en la aldea, los cuales fueron chorro de uso exclusivo, depósito de almacenaje en hogar, ríos Escalante y Guacalate, lavaderos públicos (río Escalante), pozo, depósito público.

B. Recursos

1. Humanos

Investigadoras: Br. Selene Rosario del Carmen González Velásquez
Br. Claudia Antonieta Orozco y Orozco de Joachín

Asesoras: Licda. María Luisa García de López
Licda. Shirley Sikahall (Co-asesora)

2. Institucionales

- Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio Microbiológico de Referencia, LAMIR. Escuela de Química Biológica.

- Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria, Medicina y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio Nacional de Salud –LNS-

3. Materiales y equipo

1. Materiales

a. Cepas de *Leptospira*

- 29 cepas de *Leptospira* sp que incluyen varios serogrupos y serovariedades de leptospiros que forman parte del cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Ver Anexo 4).

b. Antisueros policlonales

- 1mL de antisueros de los siguientes serogrupos: Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Pomona, Bataviae, Hebdomadis, Pyrogenes, Serjoe, Canicola. Donados por el Instituto Pedro Kouri, Habana, Cuba

c. Medios de cultivo

- Fletcher con suero de conejo al 10% (DIFCO)
- EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos
- EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo a una concentración final de 200µg/mL
- EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina a una concentración final de 225mg/mL (Anexo 5)

d. Suplementos

- Vitamina B1 y B12
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , Tween 80, glicerol.
- Seroalbúmina bovina
- Suero de conejo
- 5- fluoracilo
- 8-azaguanina

e. Reactivos

- Solución de amonio cuaternario
- Alcohol etílico al 70%
- Fenol 5%
- Extrán neutro
- Cloro al 10%
- Agua destilada
- Alcohol para quemar
- Buffer fosfato salino PBS 0.025M pH 7.4

f. Otros

- Puntas plásticas para pipetas
- Filtros de membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm
- Filtros de membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm
- Frascos estériles
- Tubos de 16 x 150 ml con tapa de rosca
- Guantes descartables
- Láminas portaobjetos
- Cubreobjetos
- Probeta
- Pipetas Pasteur punta larga (9 pulgadas)
- Bulbos
- Pipeteador
- Pipetas de 1, 5, 10 mL

- Hielera
- Baterías para hielera
- Papel absorbente
- Contenedor para material contaminado
- Bolsas rojas
- Algodón
- Papel indicador pH
- Papel Kraft
- Parafilm
- Cinta testigo
- Gradillas de metal
- Gradillas plásticas
- Tubos para centrífuga
- Placas de poliestireno con pozos de capacidad mínima de 300 μ L. Fondo en "U".
- Canoas plásticas descartables

2. Equipo

- Equipo de filtración Millipore
- Bomba de vacío
- Kitazato
- Rotador
- Magneto
- Cabina de bioseguridad Clase II
- Congelador a -20°C
- Incubadora a 30°C y 13°C
- Microscopio de campo oscuro
- Estufa simple
- Mechero de gas
- Incinerador
- Pipetas semiautomáticas de volumen variable
- Centrífuga

- Reloj
- Termómetro
- Autoclave
- Baño de María
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Refrigeradora

C. Métodos

1. Preparación de medios de cultivo

a. Medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos (medio líquido de propagación de cepas)

- Medio basal, se preparó según las indicaciones del medio de cultivo (anexo 5).
- Se esterilizó a 121⁰C y 15 libras de presión por 30 minutos, dejándose enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregó asépticamente el suplemento (anexo 5).
- Se mezcló manualmente y se midió el pH del medio con potenciómetro (7.4 – 7.6).
- Se filtró con membranas de acetato de celulosa de porosidad 0.45µm.
- Se distribuyó en volúmenes de 5 mL, en tubos de 16 x 150 mm con tapa de rosca, en cabina de bioseguridad clase II.
- Se realizó control de esterilidad a temperatura ambiente (2 semanas), 30°C (7 días) y 37°C (7 días), además control de crecimiento inoculando una cepa patógena y una saprofítica de *Leptospira*.
- Se conservó en refrigeración (4⁰C) hasta su uso por períodos no mayores de 6 meses.

b. Medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo

- Se preparó según las indicaciones del medio de cultivo (anexo 5).
- Se esterilizó a 121⁰C por 30 minutos, dejándose enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregó asépticamente el suplemento (anexo 5) y se mezcló manualmente.
- Se agregó 5-fluoracilo a una concentración final de 200 µg/mL y se mezcló.
- Se midió el pH del medio con potenciómetro (7.4 – 7.6).
- Se filtró con membranas de acetato de celulosa de porosidad 0.45µm.
- Se distribuyó en volúmenes de 5 mL, en tubos 16 x 150 mm con tapa de rosca, en cabina de bioseguridad clase II.
- Se realizó control de esterilidad a temperatura ambiente (2 semanas), 30°C (7 días) y 37°C (7 días), además control de crecimiento inoculando una cepa patógena y una saprofitica de *Leptospira*.
- Se conservó en refrigeración (4⁰C) hasta su uso por períodos no mayores de 6 meses.

c. Medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina

- Se preparó según las indicaciones del medio de cultivo (anexo 5).
- Se esterilizó a 121⁰C por 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregó asépticamente el enriquecimiento leptospira (anexo 5) y se mezcló de forma manual.
- Se midió el pH del medio con potenciómetro (7.4 – 7.6).
- Se filtró con membranas de acetato de celulosa de porosidad 0.45µm.

- Se preparó una solución de 225 mg de 8-azaguanina en 100 mL de agua destilada, se agitó haciendo uso de un agitador magnético hasta disolverse lo más posible, se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos.
- Se agregó asépticamente 1 parte de la solución de 8-azaguanina en 9 partes de medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos.
- Se distribuyó en volúmenes de 5 mL, en tubos 16 x 150 mm con tapa de rosca, en cabina de bioseguridad clase II.
- Se realizó control de esterilidad a temperatura ambiente (2 semanas), 30°C (7 días) y 37°C (7 días), además control de crecimiento inoculando una cepa patógena y una saprofítica de *Leptospira*.
- Se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso por períodos no mayores de 6 meses.

d. Fletcher (medio semisólido de mantenimiento de cepas)

- Se preparó según las indicaciones del medio de cultivo (anexo 5).
- Se esterilizó a 121°C por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se agregó asépticamente suero de conejo estéril para llegar a una concentración final del 10%.
- Se mezcló bien y se midió el pH del medio con potenciómetro (7.4 – 7.6).
- Se distribuyó en volúmenes de 8mL, en tubos 16 x 150 mm con tapa de rosca.
- Se realizó una tindalización a 56°C por 30 minutos con el objetivo de descomplementar el suero.
- Se realizó control de crecimiento cultivando una cepa patógena y una saprofítica de *Leptospira* y control de esterilidad a temperatura ambiente, 30°C y 37°C.
- Se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso por períodos no mayores de 6 meses.

2. Inoculación en medios de cultivo (Mantenimiento de cepario)

- Se utilizó cabina de bioseguridad II para el cultivo de las cepas.
- Del cepario de leptospiras del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia que se encontraban en el medio de cultivo Fletcher, se tomó con una pipeta Pasteur de punta larga aproximadamente 0.5 mL del “anillo de Dinger” que se encontraba entre el centro y la superficie del medio. Teniendo cuidado de no aspirar agar al momento de tomar la muestra.
- Se inocularon 5 gotas del contenido de la pipeta resbalando por las paredes del tubo, en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos, sin tocar el medio para no causar contaminación.
- Se incubó el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos a 30°C por 5-7 días, manteniendo el control de la temperatura, para un mejor desarrollo de la cepa.
- Se observó a los 5 días crecimiento por microscopía de campo oscuro con objetivo 10X.
- Al observarse un óptimo crecimiento se sub-cultivaron en medio Fletcher a 30°C por 15 días.

3. Estandarización de las pruebas de Diferenciación

a. 8- Azaguanina

- La estandarización se realizó con cepas conocidas que pertenecen al cepario del Departamento de Microbiología. Se utilizaron 3 cepas patógenas de *Leptospira* sp, y 1 cepa de *leptospira saprobia*, esta última se cultivó por duplicado.
- Las cepas que se utilizaron para estandarizar tenían 5-7 días de desarrollo incubadas a 30°C en medio EMJH con suplemento albúmina y ácidos grasos.
- Se tomaron 50µL de la superficie de cada cultivo y se sub cultivaron en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8 azaguanina a una concentración final de 225 mg/L.

- Se incubaron a 30°C por 5-7 días.
- Se observó el crecimiento por microscopía de campo oscuro con el objetivo 10X.

b. Crecimiento a 13°C

- La estandarización se realizó con cepas conocidas que pertenecen al cepario del Departamento de Microbiología. Se utilizaron 3 cepas patógenas de *Leptospira* sp, y 1 cepa de *leptospira saprobia*, esta última se cultivó por duplicado.
- Las cepas que se utilizaron para estandarizar tenían de 5-7 días de desarrollo incubadas a 30°C en medio EMJH con suplemento albúmina y ácidos grasos.
- Se tomaron 50µL de cada cultivo y se sub-cultivaron en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos.
- Se incubó a 13°C por 5-7 días.
- Se observó el crecimiento por microscopía de campo oscuro con el objetivo 10X.

4. Recolección de muestras

- Se midió el pH con papel indicador de pH y la temperatura en los lugares seleccionados para la recolección de muestras.
- Se recolectaron aproximadamente 100 mL de agua en frascos estériles a 20cm de profundidad.
- Se transportaron las muestras al laboratorio en cadena en frío.

5. Preparación y cultivo de muestras

- Se midió el pH con potenciómetro.
- Se realizó examen directo por microscopía de campo oscuro con objetivo 10X, usando láminas portaobjetos previamente lavadas

con extrán neutro, para eliminar partículas que se puedan confundir con leptospiras.

- Se centrifugó durante 10 minutos a 2,500 rpm.
- Se filtró el sobrenadante obtenido de las muestras primero con membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm y luego con membrana de 0.22 μm .
- Se añadieron de 3 – 5 gotas con pipetas Pasteur estériles del filtrado al medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos con 5-fluoracilo, se incubó a una temperatura de 30 °C.
- Se observaron a los 5 días de incubación por microscopía de campo oscuro con el objetivo 10 X.
- Al observar contaminación se realizó un nuevo sub-cultivo en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo.
- Se observó crecimiento por microscopía de campo oscuro con objetivo 10X.
- Los cultivos positivos se sub-cultivaron en medio Fletcher.

6. Pruebas de diferenciación fenotípica

a. 8-Azaguanina

- De los cultivos positivos por microscopía de campo oscuro se inocularon 50 μL al medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina.
- Se incubaron a 30°C por 5-7 días.
- Se observó el crecimiento desde el cuarto día por microscopía de campo oscuro con objetivo 10X diariamente.
- Controles: Cepa patógena y saprofítica en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina. Cepa patógena y saprofítica en medio EMJH Suplemento de albúmina y ácidos grasos.

b. Crecimiento a 13°C

- Se inocularon 50 µL del cultivo positivo por microscopía de campo oscuro en 5 mL de medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos.
- Se incubaron a 13°C por 5-7 días.
- Se observó el crecimiento por microscopía de campo oscuro con el objetivo 10X.
- Controles: Cepa patógena y saprofítica en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos a 13°C. Cepa patógena y saprofítica en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos a 30°C.

7. Identificación por antisueros policlonales con la prueba de Aglutinación Microscópica -MAT-

- Los cultivos positivos para leptospiras patógenas identificados por pruebas fenotípicas: crecimiento a 13°C y 8-azaguanina, deben tener 5 a 7 días de desarrollo en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos con un crecimiento de $2-4 \times 10^8$ leptospiras.
- Se eligen los cultivos que tengan buen crecimiento con la concentración adecuada, descrita en el inciso anterior y que no muestren evidencia microscópica de auto aglutinación, además no debe observarse evidencia de contaminación (para cultivos muy densos se debe diluir con buffer fosfato salino, PBS, pH 7.2 – 7.4).
- Para que el antígeno sea óptimo para la prueba tienen que observarse en el microscopio de campo oscuro entre 150-200 leptospiras por campo.
- A 245 µL de PBS adicionar 5 µL de los antisueros policlonales, para obtener una dilución 1:50.
- Agregar 50µL de PBS en el pocillo 1 y del 3 en adelante.

- En el pocillo 2 y 3 adicionar 50 μ L de la dilución 1:50 del antisuero policlonal.
- A partir del pocillo 3 (donde habían 50 μ L de PBS) homogenizar y tomar 50 μ L, realizar diluciones seriadas hasta una dilución 1:51,200 descartar los últimos 50 μ L.
- Adicionar 50 μ L de la cepa a identificar a todos los pocillos.
- Incubar 37⁰C por 1 hora.
- Leer en campo oscuro comparando las lecturas con el control negativo que es el pocillo 1, donde solo hay PBS y cepa.

8. Diseño de la Investigación

a. Estandarización: Ensayo y error

- Se realizó para los medios de cultivos y pruebas de diferenciación con cepas conocidas.

b. Aislamiento y diferenciación

- **Tipo de estudio:** Descriptivo y transversal
- **Tipo de muestreo:** Dirigido por conveniencia
- **Tamaño de la muestra:** Se tomaron 29 muestras por conveniencia. Tomando en cuenta que existen 7 fuentes principales de abastecimiento de agua (chorro uso exclusivo que pertenece a una sola familia, chorro para varios hogares, chorro público, pozos, camión o tonel, río, otro tipo) (Ver anexo 6). Se realizaron 3 muestreos de cada fuente con un intervalo de tiempo de 15 días entre cada muestreo.

c. Criterios de Inclusión

- pH en un rango de 6 – 8.
- Temperatura: 25 a 30°C
- Profundidad 20 cms.

- Lugar de la localización: Que sea considerada una fuente de abastecimiento principal de agua de las que existen en la aldea.

8.1 Análisis de los datos:

Se realizaron en forma descriptiva en lo que se refiere a la estandarización de los métodos de aislamiento y los métodos de diferenciación de *L. interrogans* y *L. biflexa*.

Se elaboraron cuadros en los que se incluyen los datos de los lugares muestreados (localización), presencia o ausencia de espiroquetas por campo oscuro en las muestras tomadas, temperatura, pH y si el aislamiento de *Leptospira* spp fue positivo (presencia) o negativo (ausencia).

En relación a las pruebas de diferenciación se realizaron cuadros indicando como positivo (crecimiento) o negativo (ausencia) en el medio EMJH con suplemento albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina, así como positivo si hubo crecimiento a 13°C, estableciéndose la presencia de *L. interrogans* ó *L. biflexa* en las fuentes de agua muestreadas.

Si se aísla *L. interrogans* se identifica con los antisueros policlonales, estableciéndose el serogrupo al que pertenecen, los resultados se presentan en forma descriptiva.

VII. RESULTADOS

De acuerdo al Registro nacional de estadística (Anexo No. 6), en la Aldea El Milagro existen 7 fuentes de abastecimiento de agua, de las cuales se muestrearon cinco y se realizaron tres muestreos con intervalos de dos semanas entre cada uno. En el primer muestreo (11 de septiembre) se recolectaron 9 muestras, pero debido a que en el Río Escalante se observaron condiciones favorables para el desarrollo de leptospiras, especialmente en las áreas donde el agua se estanca, se obtuvo una muestra más para aumentar la posibilidad de aislarlas, por lo que en el segundo (3 de octubre) y tercer muestreo (29 de octubre) fueron 10 muestras recolectadas en total.

Tabla No.1 Fuentes de agua muestreadas. Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008

No. de muestra	Lugar de recolección	Tipo de fuente de abastecimiento
1	Casa particular	Chorro
2	Casa particular	Recipiente de almacenaje de agua
3	Río Escalante	Río (agua estancada)
4	Río Escalante	Río (agua fluida)
5	Río Escalante	Río (lavaderos)
6	Casa particular	Agua de pozo
7	Depósito Público	Tanque elevado
8	Río Guacalate	Río (agua estancada)
9	Río Guacalate	Río (agua fluida)
10	Río Escalante	Río abajo (agua estancada)

Fuente: Datos experimentales

Los criterios de inclusión para la toma de muestras fueron: pH de 6-7, temperatura de 28-30 °C y a una profundidad ideal de 20cms.

**Tabla No.2 Parámetros determinados en las fuentes de agua.
Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008**

Parámetros	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo
Rango de Temperatura (°C)	28 – 31	26 – 30	24 - 28
Rango de pH*	7	6 - 7	7
Profundidad (cm)	20	20	20

Fuente: Datos experimentales *pH determinado con papel pH en el lugar de la toma de muestra.

En una sola muestra del primer muestreo la temperatura medida fue de 31°C, se tomó en cuenta este lugar ya que pertenece al único pozo al que se tuvo acceso, el cual es considerado como fuente de abastecimiento de agua en 184 hogares de la aldea.

Las condiciones observadas en las fuentes muestreadas no mostraron variaciones considerables entre cada muestreo.

En las tablas 3, 4 y 5 se describen los parámetros tomados en cuenta al momento de procesar las muestras, los valores de pH fueron medidos en el laboratorio haciendo uso de un potenciómetro. La presencia de espiroquetas se observó por microscopía de campo oscuro.

**Tabla No. 3 Presencia de espiroquetas por microscopía de campo oscuro.
Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008**

Primer muestreo: 11-09-08

No. de muestra	Turbidez	pH	Presencia de espiroquetas
1	+	7.37	+
2	-	7.12	-
3	++	7.20	-
4	++	7.16	-
5	+	7.37	-
6	-	6.92	-
7	-	7.54	-
8	+++	7.46	+
9	+++	7.45	-

Fuente: Datos experimentales: (-) = Ausencia (+) = Presencia

**Tabla No. 4 Presencia de espiroquetas por microscopía de campo oscuro.
Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008**

Segundo muestreo: 03-10-08

No. de muestra	Turbidez	pH	Presencia de espiroquetas
1	++	7.12	-
2	-	7.85	-
3	+	7.52	+
4	+	7.60	+
5	+	7.69	-
6	-	7.70	-
7	-	7.56	-
8	+++	7.63	-
9	+++	7.68	-
10	+	7.54	+

Fuente: Datos experimentales: (-) = Ausencia (+) = Presencia

**Tabla No. 5 Presencia de espiroquetas por microscopía de campo oscuro.
Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008**

Tercer muestreo: 29-10-08

No. de muestra	Turbidez	pH	Presencia de espiroquetas
1	++	7.68	-
2	+	7.76	-
3	++	7.82	-
4	+	7.88	-
5	+	7.81	+
6	-	7.76	-
7	-	7.85	-
8	++	8.12	-
9	++	8.08	-
10	+	7.93	-

Fuente: Datos experimentales: (-) = Ausencia (+) = Presencia

**Tabla No. 6 Crecimiento presuntivo de *Leptospira* spp en medio EMJH
con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo.
Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008**

Crecimiento de <i>Leptospira</i> spp	Primer muestreo	%	Segundo muestreo	%	Tercer muestreo	%
Presencia	3	33.3	8	80.0	5	50.0
Ausencia	6	66.7	2	20.0	5	50.0
Total de muestra	9	100.0	10	100.0	10	100.0

Fuente: Datos experimentales.

En la tabla No. 6 se describen las muestras con crecimiento presuntivo en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo. En el primer muestreo se sembraron por duplicado, en el segundo y tercer muestreo se sembraron por triplicado (Ver anexo 7, 8, 9) obteniéndose el

mayor porcentaje de crecimiento en el segundo muestreo que corresponde a 80.0%.

Las muestras en las que se observó crecimiento presuntivo en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo, se inocularon en el medio Fletcher. En la siguiente tabla se presenta el porcentaje de las mismas que presentaron anillo de Dinger en el medio Fletcher, lo que se interpretó como la presencia de *Leptospiras* spp.

Tabla No. 7 Aislamiento presuntivo de *Leptospira* spp en el medio Fletcher. Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008

Anillo de Dinger	1er. Muestreo	%	2do. muestreo	%	3er. muestreo	%
Presencia	3	100.0	1	12.5	0	0.0
Ausencia	0	0.0	7	87.5	5	100.0
Total de muestra	3	100.0	8	100.0	5	100.0

Fuente: Datos experimentales

En el tercer muestreo, se puede observar que de los 5 cultivos con crecimiento en EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos (tabla No.6) ninguno presentó crecimiento en el medio Fletcher. Sin embargo en este muestreo además de inocular las 10 muestras por triplicado se realizó la inoculación simultánea en el medio Fletcher, de donde se logró que 4 de las muestras procesadas formaran anillo de Dinger y estos cultivos fueron utilizados para el aislamiento, purificación y posterior identificación de leptospiras spp.

**Tabla No. 8 Estandarización crecimiento en EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8 azaguanina
Prueba de Diferenciación I**

No.	Cepa	Crecimiento
1	<i>Leptospira interrogans</i> Bataviae bataviae Swart	-
2	<i>Leptospira interrogans</i> Icterohaemorrhagia copenhageni M20	-
3	<i>Leptospira interrogans</i> Icterohaemorrhagia Icterohaemorrhagia RGA	-
4	<i>Leptospira biflexa</i> Samaranga patoc Patoc I	+
5	<i>Leptospira biflexa</i> Samaranga patoc Patoc I	+

Fuente: Datos experimentales (-) = Ausencia (+) = Presencia

Se realizaron cuatro estandarizaciones y de acuerdo a lo esperado, en todas se obtuvo un crecimiento óptimo de *Leptospira biflexa* en presencia de 8-azaguanina (Tabla No.8).

**Tabla No. 9 Estandarización crecimiento a 13°C
Prueba de Diferenciación II**

No.	Cepa	Crecimiento
1	<i>L. interrogans</i> Bataviae bataviae Swart	+
2	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagia copenhageni M20	+
3	<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagia icterohaemorrhagia RGA	+
4	<i>L.biflexa</i> Samaranga patoc Patoc I	+
5	<i>L.biflexa</i> Samaranga patoc Patoc I	+

Fuente: Datos experimentales (-) = Ausencia (+) = Presencia

Se realizaron cuatro estandarizaciones de la prueba no obteniéndose los resultados esperados, ya que se observó crecimiento con todas las cepas utilizadas en la estandarización y la literatura dice que debe obtenerse un óptimo crecimiento de las cepas saprobias y la inhibición del crecimiento de las patógenas. (32).

**Tabla No. 10 Identificación fenotípica de las cepas aisladas.
Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, 2008**

No. De Muestreo	No. de Muestra	Crecimiento	Cepa aislada
3	5	+	<i>Leptospira biflexa</i>
3	10	+	<i>Leptospira biflexa</i>

Fuente: Datos experimentales (-) = Ausencia (+) = Presencia

De los ocho cultivos descritos en la Tabla No. 7, solamente dos cepas se lograron aislar en forma pura y fueron identificadas por la prueba de diferenciación fenotípica de crecimiento en presencia de 8-azaguanina, las cuales corresponden a *Leptospira biflexa*, por tal razón la identificación con antisueros policlonales no se realizó porque ésta se utiliza para identificar leptospiros patógenas (*Leptospira interrogans*).

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

La aldea El Milagro, Masagua departamento de Escuintla presenta un clima húmedo, sub tropical, bajas condiciones económicas de la población que favorecen la transmisión de leptospirosis, además la frecuencia de inundaciones en esta aldea ha sido reportada previamente como un factor que favorece el apareamiento de enfermedades transmitidas por el agua, ya que esta localidad está ubicada entre dos ríos, Guacalate y Escalante.

Según el estudio "Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla" realizado en el año 2,007, se estableció en dicha aldea una seroprevalencia de 52% en la población humana y en la población animal por especie, presentando los caninos un 63% (29/46), bovinos 50% ((6/12) y suinos 45%, (15/33) de seropositividad. De igual manera se establecieron en este estudio factores de riesgo tales como bajas condiciones económicas de la población, la convivencia íntima con animales domésticos, así como la presencia de roedores en las viviendas, el agua entubada con apariencia turbia y con contaminación fecal (presencia de *Escherichia coli*), condición que obliga a las amas de casa a lavar los utensilios de cocina y ropa en el río Escalante (lavaderos), permaneciendo por largos períodos sumergidas en el agua, circunstancias que favorecen la diseminación y trasmisión de la leptospirosis en dicha aldea.

El principal objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar *L. interrogans* de fuentes de agua de consumo humano, lo cual es de gran ayuda para establecer las serovariedades que circulan en dicho lugar y entender la epidemiología de la enfermedad (20).

Ya que el muestreo fue de tipo dirigido por conveniencia, los lugares fueron seleccionaron por conveniencia, tomando en cuenta los hallazgos reportados por Zelaya e investigadores, quienes aislaron *L. interrogans* en el río Guacalate y Escalante, los muestreos se llevaron a cabo en lugares en donde se creía viable la presencia de leptospiras y que cumplieran con los criterios de inclusión establecidos, o en donde hubiese mayor fuente de contaminación por la presencia de animales. Aunque esta población cuenta con

agua entubada, ésta no es suficiente y llega con un aspecto turbio y sucio por lo que los pobladores utilizan el agua de los ríos para bañarse o para lavar. Además almacenan agua en recipientes que se dejan al alcance de los animales siendo factible la contaminación con orina de éstos, por lo que a pesar de no ser considerada como fuente de abastecimiento en la aldea se decidió tomarla como tal. Los tres muestreos se realizaron en época lluviosa, de acuerdo a estudios realizados se observa que en dicha época se produce una mayor movilización de leptospiras presentes en el suelo contaminado con orina de los animales silvestres y domésticos al agua, como es el caso de los ríos, encontrándose en mayor concentración (20, 26-27).

Los criterios de inclusión tomados en cuenta para la recolección de muestras fueron: que sea considerada fuente de abastecimiento principal de agua y presente condiciones que favorecen la supervivencia de las leptospiras, tales como temperatura del agua 25-30°C, pH 6-8 y una profundidad de 20 cms. según estudios realizados a ésta profundidad las leptospiras encuentran un ambiente propicio para desarrollarse, ya que a mayor profundidad no logran tener el oxígeno y las condiciones necesarias para su supervivencia (24).

En las tablas 3, 4 y 5 se puede observar que la mayoría de muestras recolectadas presentaban turbidez probablemente debido a la alta contaminación ambiental y bacteriana, lo cual disminuyó la posibilidad de aislar leptospiras a pesar de haber filtrado las muestras con filtros de membrana de acetato de celulosa con diámetro de poro 0.45µm y luego con filtros 0.22µm. Ya que el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos es altamente enriquecido y las leptospiras son de crecimiento lento se añadió al medio 5-fluoracilo (antibiótico) para eliminar microorganismos contaminantes. También podemos observar que de las 29 muestras recolectadas en los tres muestreos, en 6 (20.69%) se observaron inicialmente espiroquetas por microscopía de campo oscuro, aunque este hallazgo no asegura que se lograra el aislamiento, sí orienta el estudio (2).

En el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5 fluoracilo el crecimiento presuntivo de *Leptospiras* spp fue de 55.17% y el

porcentaje más alto (80%) se obtuvo en el segundo muestreo. Sin embargo se observó que la presencia de *Leptospiras* spp en el presente estudio fue constante durante los tres muestreos, lo que demuestra que existe un ambiente propicio para su desarrollo y supervivencia en dichas fuentes (6, 26, 27,33).

De las 29 muestras inoculadas en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo no se observó crecimiento en 13 de ellas lo que corresponde al 44.83%, esto posiblemente se deba a la alta contaminación de las fuentes de agua (ríos) con materia orgánica, lo cual contamina los medios de cultivo disminuyendo la viabilidad de las leptospiras e inhibiendo su óptimo crecimiento, lo que no permite la obtención de cepas puras para su posterior identificación. Además de utilizar el 5-fluoracilo como inhibidor de contaminantes se ha reportado en la literatura que las leptospiras son resistentes al ácido nalidíxico, propiedad que puede utilizarse en la elaboración de medios de cultivo para controlar la proliferación de otros microorganismos sin afectar el crecimiento de leptospiras (2,24).

Dentro de los objetivos se buscaba estandarizar el aislamiento de *Leptospiras* spp para su posterior identificación, por lo que en el tercer muestreo se procedió a sembrar las muestras de agua tanto en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5-fluoracilo como en el medio Fletcher, lográndose que de un total de 10 muestras cultivadas en Fletcher, en cuatro (40%) de los cultivos se formara el anillo de Dinger, lo que posibilitó su posterior identificación a través de las pruebas fenotípicas. Con el resultado anterior se puede sugerir para investigaciones futuras dicha metodología, ya que aumenta la posibilidad de aislamiento de leptospiras (6).

Del total de muestras inoculadas en los tres muestreos en el medio Fletcher (26), en 8 se observó la formación del anillo de Dinger, pero solamente en 2 las leptospiras se lograron aislar y purificar, para determinar si eran saprobias o patógenas. Es importante hacer énfasis en que a pesar de haber inoculado en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5 fluoracilo (antibiótico) y realizar descontaminaciones constantes, por el método de filtración a todos los cultivos, no se logró un mayor porcentaje de

aislamiento, ya que la contaminación provocó inhibición en el desarrollo de los cultivos con crecimiento presuntivo. Coincide con los resultados obtenidos por diferentes investigadores, que reportan que uno de los principales problemas que existen para lograr el crecimiento y conservación de los cultivos de leptospiras es mantenerlos libres de contaminantes, ya que éstos acidifican el medio de cultivo y provocan la muerte de éstas (6, 7, 24).

De acuerdo a la literatura consultada, los métodos que más se recomiendan para la diferenciación fenotípica de leptospiras saprobias y patógenas son el crecimiento en EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos a 13°C y crecimiento en EMJH + 8-azaguanina. De acuerdo a los mismos, las leptospiras patógenas no pueden sobrevivir a una temperatura de 13°C, ni crecen en la presencia de 8-azaguanina, pero las saprobias si crecen bajo estas condiciones (2,7).

En lo que corresponde a la fase de estandarización de dichos métodos, en 8-azaguanina se observó crecimiento solamente de la especie saprobia, lo que coincide con lo esperado, no así en la prueba de crecimiento a 13°C, ya que tanto la especie patógena como la saprobia crecieron, resultado que no es el esperado, pero que concuerda con los resultados obtenidos por De León e investigadores quienes sometieron las cepas que aislaron a pruebas de diferenciación entre *L. biflexa* y *L. interrogans* obteniendo crecimiento de ambas a 13°C, a 28°C y a 30°C. Por este motivo en la diferenciación de las cepas aisladas solo se utilizó la prueba de crecimiento en 8-azaguanina (24).

Las dos cepas aisladas corresponden a las muestras No.5 (lavaderos ubicados en el Río Escalante) y No.10 (agua estancada Río Escalante) (Anexo 2) y fueron identificadas como *Leptospira biflexa* con la prueba de diferenciación fenotípica de crecimiento en EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina. La cepa aislada de la muestra No. 5, se logró confirmar a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la colaboración de Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud y Asistencia Social (ver Anexo 10), lo cual confirmó que la prueba de

diferenciación fenotípica con 8-azaguanina permite diferenciar *Leptospira biflexa* de *Leptospira interrogans*.

Dentro de la metodología, se estableció que de lograr el aislamiento de *L. interrogans* se pretendía identificar el serogrupo por medio de antisueros policlonales con la prueba de aglutinación microscópica MAT, pero debido a que las cepas aisladas fueron identificadas como *L. biflexa* no se realizó este procedimiento.

Por otro lado, el aislamiento de leptospirosas saprobias: *Leptospira biflexa* de acuerdo a la literatura revisada, es un indicio de la presencia de la especie patógena (*L. interrogans*). La aldea El Milagro reúne las condiciones necesarias para el desarrollo de cualquiera de las dos especies, sumando a ello la presencia de animales domésticos que deambulan por las calles, como perros y cerdos que contaminan constantemente el suelo y las fuentes de agua, lo que favorece la transmisión de la leptospirosis (34-35).

Debido a lo anterior las personas que lavan en los lavaderos públicos del río Escalante y los niños que se bañan y juegan en el mismo, están expuestos a adquirir y desarrollar la leptospirosis, ya que el tiempo que pasan en contacto con el agua, provoca reblandecimiento de la piel, lo que favorece la penetración de las leptospirosas por esta vía. Haciendo énfasis en que el agua es uno de los principales vehículos por los que se puede diseminar la leptospirosis y que las condiciones socioeconómicas y la forma de vida de los pobladores los hace susceptibles a adquirir dicha enfermedad (33).

IX. CONCLUSIONES

1. No se aisló *Leptospira interrogans* en fuentes de agua de la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.
2. Se estandarizó la metodología para el aislamiento e identificación de *Leptospira* spp. utilizando los medios de cultivo EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 5 fluoracilo y Fletcher.
3. Al sembrar simultáneamente en el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos y en el medio Fletcher, se aumenta la posibilidad de aislamiento.
4. Se estandarizó la prueba de diferenciación fenotípica crecimiento en EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8-azaguanina.
5. Del total de muestras cultivadas en medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos, se observó crecimiento presuntivo de *Leptospira* spp en un 55.17%
6. De las 29 muestras recolectadas, se identificó un 6.9% a través de el método de diferenciación fenotípica de crecimiento con 8-azaguanina.
7. Se estableció la presencia de *Leptospira biflexa* en fuentes de agua de la aldea el Milagro, Masagua, Escuintla.
8. Se identificó *L. biflexa* fenotípicamente, confirmándose a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

X. RECOMENDACIONES

Realizar estudios similares en los cuales se pueda:

1. Detectar focos de contaminación o vías de transmisión de esta enfermedad.
2. Disponer de un espacio específico en el Departamento de Microbiología destinado al trabajo con leptospira ya que el medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos es muy enriquecido y fácilmente se contamina.
3. Contar con el equipo necesario, como un potenciómetro portátil para obtener mediciones más exactas en los lugares de muestreo.
4. Al momento de procesar las muestras se recomienda sembrar tanto en Medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos como en el medio Fletcher, ya que en éste último es más evidente la presencia de leptospiras y se aumenta la posibilidad de aislamiento.
5. Adicionarle a la composición del medio Fletcher 5-fluoracilo.
6. Realizar resiembras constantes para evitar que los contaminantes utilicen los nutrientes del medio e impidan el desarrollo de leptospiras, tomando todas las medidas asépticas para evitar contaminaciones externas.
7. Investigar el uso de nuevas metodologías para la purificación de cultivos, así como la elaboración de medios de cultivo con ácido nalidíxico para disminuir la contaminación bacteriana durante el aislamiento sin inhibir el crecimiento de leptospiras.
8. Mejorar la distribución y la potabilización de agua para consumo humano y evitar que los vecinos de dicha aldea, usen los ríos para cubrir sus necesidades.
9. Realizar más estudios con el objetivo de aislar leptospiras patògenas y conocer los serogrupos circulantes en poblaciones que presentan las condiciones ideales para la sobrevivencia de leptospiras
10. Implementar proyectos multidisciplinarios con la participación de la comunidad para controlar la diseminación y prevenir la leptospirosis, dando solución a los problemas de abastecimiento de agua, control de roedores y educando a los pobladores sobre la convivencia con los animales domésticos.

XI. REFERENCIAS

1. Kasper D. Principios de Medicina Interna. 16 ed. México. Mc Graw Hill, 2,006. (p.1,100-1,1103)
2. Sandow K, Ramirez W. Leptospirosis REDVET 2005;Vol.VI, No.6:1-28
3. Faine S. et al, *Leptospira and leptospirosis*. 2 ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1,999. 272p.
4. Human Leptospirosis Guide for diagnosis, Surveillance and control. Washington DC: OPS; ILS, 2,003
5. Jawetz, Melrick y Adelburg. Microbiología Médica. 15 ed. México El Manual Moderno, SA de CV, 1,996 (p. 344-346).
6. Caballeros A, Romero J. Manual de procedimientos de laboratorio del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia epidemiológica (INDRE) México 1,997; p41.
7. Céspedes M, Araujo M. Manual de procedimientos bacteriológicos y serológicos para el Diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud. Do. Tec. No. 34 2,002; 53 pág. 33-40
8. Victoria B, et al. Identificación de aislamientos de *Leptospira* por métodos serológicos y genéticos. REV CUBANA MED TROP 2,002; 54(1): 48-51.
9. Céspedes M. Leptospirosis. Enfermedad zoonótica emergente. Rev. Perú. med. exp. salud publica 2,005;v.22 n.4: 4-5, 9,15
10. Zavala JE. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. Rev BIOMED 1,998;9: 78-83

11. Roca B. Leptospirosis. Rev MED UNI NAVARRA, 2,006;Vol 50 No. 2:3-6
12. Gavaldan D, et al. La importancia de la leptospirosis humana en México. Detección de anticuerpos anti-leptospira en una población de donadores de sangre. 1,995 131(3) 289-292
13. Suarez M, et al. Leptospirosis en niños de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. Rev.Soc.Bras.Med.Trop Uberaba Brasil, 1,999;v 32 n.2
14. Naranjo M, et al. Confirmación microbiológica de un brote de Leptospirosis en Honduras tras el paso del Huracán Mitch y potencialidad profiláctica de vax-SPIRAL. Vacci Monitor 2,007;Año 16 No. 3:13-18
15. Torres M, et al. Leptospirosis humana en Guatemala. Primer caso confirmado. Guatemala; Universidad de San Carlos de Guatemala;Vol 33 1,982 p16.
16. 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) 2,003, 40p.
17. Cifuentes J. Informe final del estudio de Brote de leptospirosis, Municipio Masagua, Escuintla Área de Salud, Escuintla <http://desastres.cies.edu.ni/digitaliza/tesis/t294/secciona6.pdf>
18. Estrada P. 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) 2,004, 97 p.

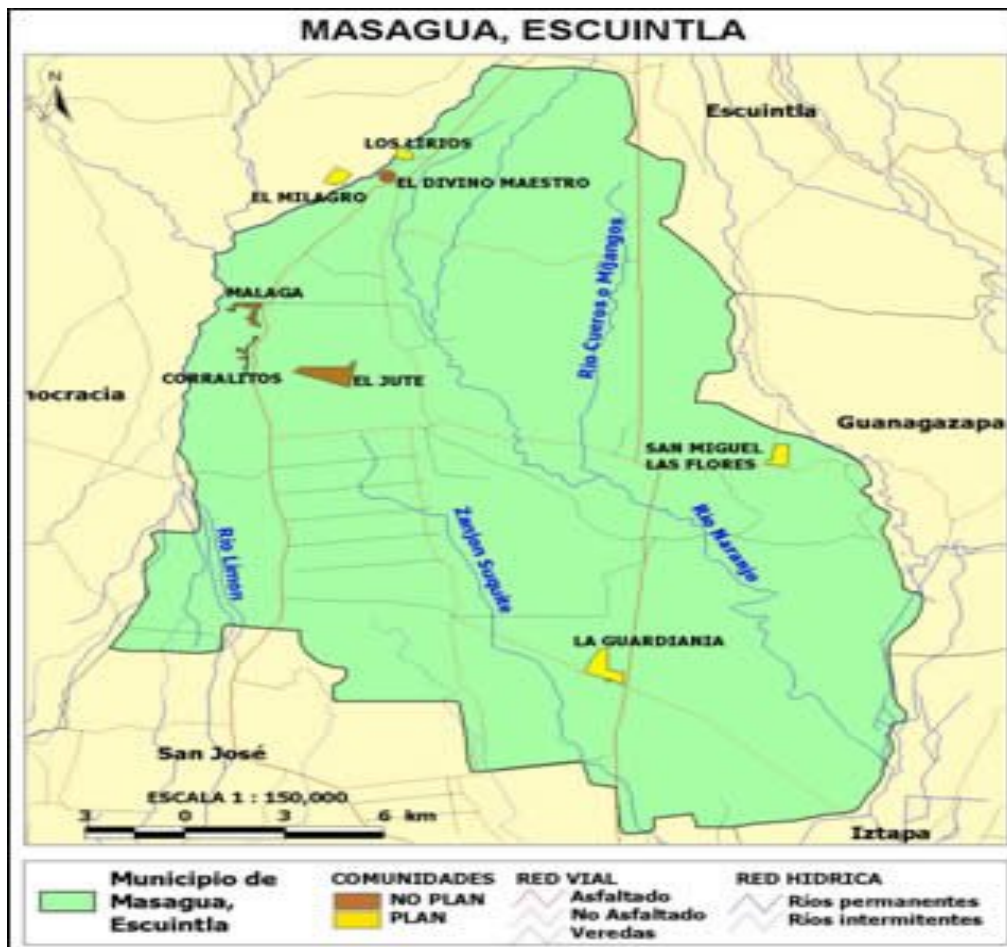
19. Sikahall SV. Estandarización de la prueba de Aglutinación Microscópica en Placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2,006, 53p.
20. Zelaya B, et al. Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua Escuintla. Proyecto FODECYT No. 091-06, Mayo 2,008 Guatemala, 71p.
21. Galindo S. Determinación de anticuerpos anti leptospira en donadores de sangre del Hospital General San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2,008, 60p.
22. Vanasco NB, et al. Descripción de un brote leptospirosis en la ciudad de Santa Fe Argentina, marzo-abril 1,998. Rev. Panam Salud pública Washington 2,000;v 7 n.1
23. Trueba G. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. Rev Cubana Med Trop 2,002;vol 54 (1): 1-5
24. De León G, et al. Leptospirosis. Las aguas de la explotación porcina como vehículo de la Leptospira, en la zona central cafetera de Colombia. Arch. Med. Vet. 2,002;v.34 n.1: 1-11
25. Montesino C, Arocha E. Comportamiento de la leptospira humana Rev Cubana Enferm 2,001;v.17 n.3
26. Berdasquera D, et al- Brote de Leptospirosis humana en la Provincia de Guantanamo. Rev Cubana Med Trop 2,007;v 59 n.1
27. Alvarez V, Suárez M. Estudio epidemiológico de un brote de leptospirosis vinculado a intensas precipitaciones en un poblado del área sur de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. Kasmera 1,998;v.26 n1:1-2

28. Perret C, et al. Prevalencia y presencia de factores de riesgo de leptospirosis en una población de riesgo de la región Metropolitana. Rev.med.Chile, 2,005;v.133 n.4:427-428
29. Monografía. Leptospirosis. http://lepto/leptospira_interrogans_com.htm
30. Gonzáles A, et al. Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. Rev Argentina de Micro 2,006;v 38 61-68
31. González A, et al. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar Mozdok en medio EMJH modificado. Rev Cubana Med Trop 2,002;v 54 (1):32-36
32. Hartskeerl R, A. Internacional course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. 5 th ed. Ámsterdam, Do. Tec 2,006 p 86
33. Vinetz Joseph, et al. Beyond Disciplinary Boundaries: Leptospirosis as a Model of incorporating Transdisciplinary Approaches to Understand Infectious Disease Emergence. EcoHealth Journal Consortium 2,005;EcoHealth 2, 291-306.
34. Gatti M, et al. Investigación de Leptospiras en aguas de lagos del Zoológico de La Plata, Argentina. Rev Analecta Vet 2004; 24 (1): 18-20
35. Levett P. Leptospirosis. Rev. CMR, April 2001, v 14, No.2. p. 296-326

XII. ANEXOS

Anexo No. 1

Localización geográfica de la Aldea El Milagro Masagua, Escuintla



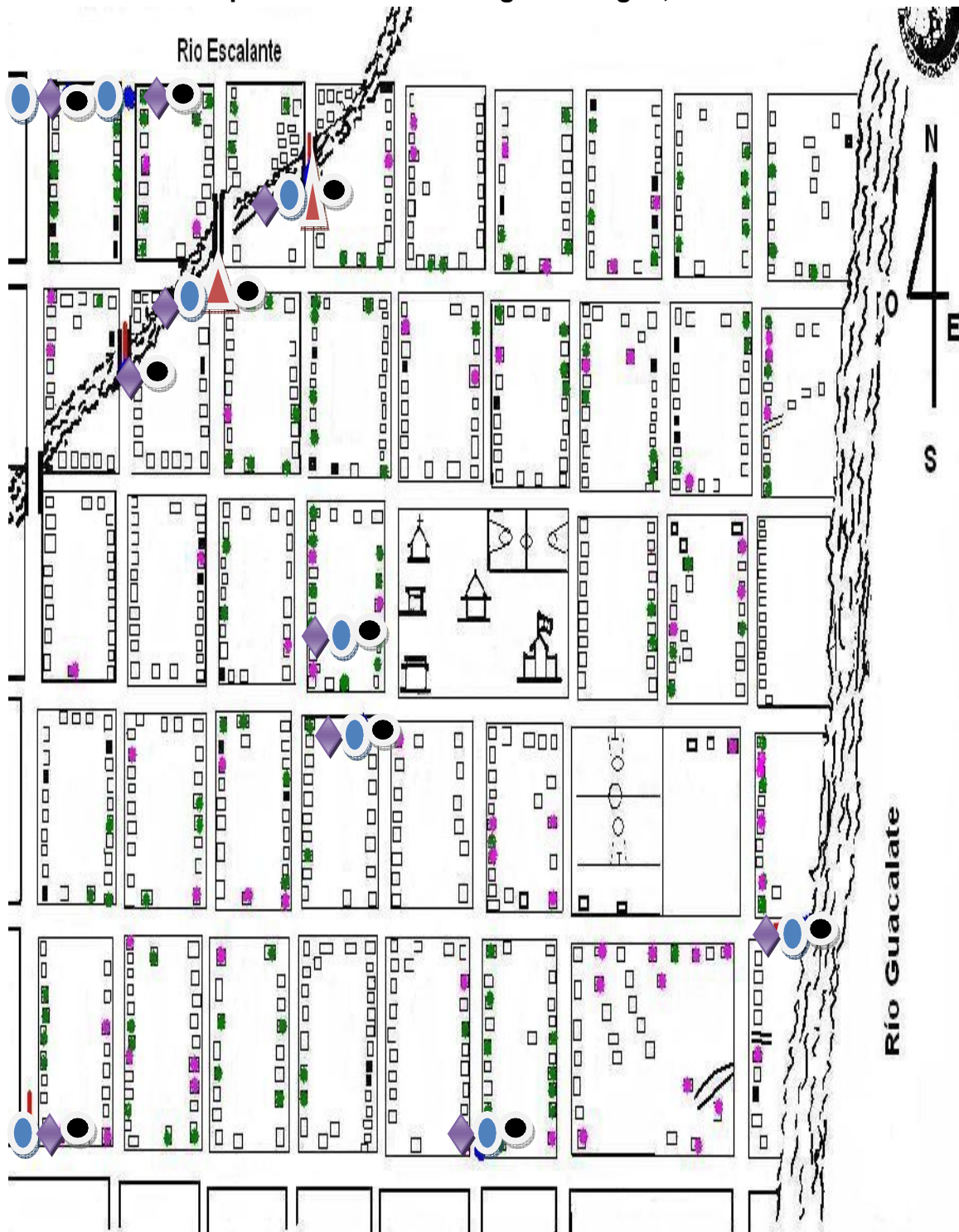
Localización geográfica de la Aldea El Milagro Masagua, Escuintla

- En el norte de Masagua se localiza la Aldea El Milagro.
- Esta aldea fue creada por disposición gubernamental el 1 de mayo de 1830.
- Extensión territorial: 473 Km. Cuadrados.
- Altura: 100 metros sobre el nivel del mar.
- Longitud: 90°51'34''.
- Latitud: 14°12'05''
- Clima: Cálido

- Accidentes Geográficos: rodeada por montañas; La Campana, La Laguna Blanca
- La riegan los ríos Guacalate y Escalante.
- Producción Agropecuaria: caña de Azúcar, granos y legumbres.
- Fincas de ganado.

Anexo No.2

Mapa de la Aldea El Milagro Masagua, Escuintla



Lugares donde se aisló *L. biflexa*



Fuente: Datos experimentales:
Segundo muestreo



Primer muestreo



Tercer muestreo

Anexo No. 3

Tabla No. 1 Características diferenciales entre las especies de *Leptospira*

Características diferenciales	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Leptospira biflexa</i>	<i>Leptospira illini</i>
Patogenicidad	Sí	No	No
Crecimiento a 13°C	No	Sí	Sí
Inhibición del crecimiento por 8-azaguanina(225µg/mL)	Sí	No	No
Conversión de las células a formas esféricas por NaCl 1M	Sí	No	No
Actividad lipasa	¿?	Sí	Sí
% de G-C en ADN	35,3-39,9	38,0-41,0	53
Crecimiento en caldo soya-tripticosa	No	No	Sí
Tubulos citoplasmáticos	No	No	Sí

Fuente: Sando K. Leptospirosis Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. VI, No. 6
Junio 2005

Anexo No. 4

CEPARIO COMPLETO (Nicaragua, 2008 *y Honduras, 2007 **)

No	ESPECIE	SEROGRUPO	SEROVAR	STRAIN
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	australis	Ballico*
2	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	wolffi	3705 **
3	<i>L. interrogans</i>	Autumnales	autumnalis	Akiyami A*
4	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	castelloni	Castellon*
5	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	bataviae	Swart*
6	<i>L. interrogans</i>	Canicola	canicola	Hond Utrech IV*
7	<i>L. weilii</i>	Celledoni	celledoni	Celledoni*
8	<i>L. idrschneri</i>	Cynopteri	cynopteri	3522C*
9	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	djasiman	Djasiman*
10	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	grippothyphosa	Moskva V*
11	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis*
12	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagia	icterohaemorrhagia	RGA*
13	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagia	copenhageni	M20*
14	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagia	copenhageni	Wijnberg*
15	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	javanica	Veldrat Batavia*
16	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	louisiana	LSU 1945*
17	<i>L. noguchii</i>	Panama	panama	CZ 214*
18	<i>L. interrogans</i>	Pomona	pomona	Pomona*
19	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem*
20	<i>L. interrogans</i>	Ballum	arborea	**
21	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	bataviae	**
22	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	hardjo	Hardjoprajitno*
23	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	pyrogenes	**
24	<i>L. biflexa</i>	Samaranga	patoc	Patoc I*
25	<i>L. santarosai</i>	Shermani	shermani	1342 K*
26	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	tarassovi	Perepelitsin*
27	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagia	icterohaemorrhagia	Kantarouies**
28	<i>L. interrogans</i>	Ballum	castelloni	BCA**
29	<i>L. interrogans</i>	Shermani	shermani	**

*Cepas donadas por el Ministerio de Salud Pública de la República de Nicaragua

Fecha de la donación de 26 de junio de 2008.

**Cepas provenientes de Honduras.

Existentes en el cepario del Departamento de Microbiología

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia 2,007

Anexo No. 5

1. Composición del medio EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos (Medio líquido para propagación de cepas)

Medio basal

Fórmula	
Fosfato bibásico de disodio	1.00 g
Fosfato monobásico potásico	0.30 g
Cloruro de sodio	1.00 g
Cloruro de amonio	0.25 g
Tiamina	0.005 g

Fuente: Internacional course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Amsterdam, 2006.

Preparación:

Suspender 2.56g de medio en 900mL de agua destilada y disolver completamente. Dejar el enriquecimiento *Leptospira* a temperatura ambiente y agregar asépticamente 100 mL al medio base EMJH (32).

2. Suplemento Albúmina Bovina

Fórmula	
Cloruro de Calcio	2.00mg
Sulfato de Zinc	0.80mg
Seroalbúmina bovina	2.00 gr.
Sulfato ferroso	10.00mg
Glicerol	1.00mL
Cloruro de magnesio	2.00mg
Vitamina B12	0.04mg
Polisorbato 80	2.50mL
Agua destilada	20.00mL

Fuente: Internacional course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Amsterdam, 2006.

3. Composición del Medio Fletcher (mantenimiento de cepas)

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

Fuente: Céspedes, M. Araujo, M. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Salud. Doc. Tec. No. 34, Lima, Perú. 2,002.

Suspender 2.5 gr. de medio en 920 mL de agua destilada, disolver completamente.

Se debe comprobar que cada lote de medio terminado tenga la capacidad de promover el desarrollo de varios serovares de *Leptospira* entre 4 y 7 días de incubación a 28°C cuando se siembran cantidades mínimas (32).

Anexo No.6

FUENTES DE ABASTECIMIENTO DE AGUA Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla

Fuente de abastecimiento	No. de hogares que lo utilizan
Chorro de uso exclusivo	456
Chorro para varios hogares	166
Chorro público	1
Pozo	184
Camión o tonel	1
Río, lago o manantial	6
Otro tipo	3

Fuente: Hogares por tipo de servicio de agua, promedio de cuartos por hogar y promedio de personas por dormitorio, según departamento, municipio y lugar poblado, INE 2,008.

Anexo No.7
Control de crecimiento
Primer muestreo

Medio de cultivo EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos

Temperatura de incubación: 30°C

Método: Microscopía de campo oscuro

Fecha de Cultivo: 11-09-08

Fecha de descarte: 14-11-08

No. de Muestra	Crecimiento	Movilidad	Contaminación	Observaciones
1 ^a	-	-	+	Descartar
2a	-	-	-	Descartar
3a	+	+	++	Sembrar en Fletcher
4a	-	-	-	Descartar
5a	-	-	-	Descartar
6a	-	-	+	Descartar
7a	-	-	-	Descartar
8a	-	-	-	Descartar
9a	-	-	-	Descartar
1b	-	-	+	Descartar
2b	-	-	-	Descartar
3b	+	+	+	Sembrar en Fletcher
4b	+	-	+	Sembrar en Fletcher
5b	-	-	-	Descartar
6b	+	-	+++	Sembrar en Fletcher
7b	-	-	-	Descartar
8b	-	-	+	Descartar
9b	-	-	+	Descartar

Fuente: Datos experimentales

1= Lugar de muestreo

a,b,c =series de tubos inoculados

Anexo No.8
Control de crecimiento
Segundo muestreo

Medio de cultivo EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos

Temperatura de incubación: 30°C

Método: Microscopía de campo oscuro

Fecha de Cultivo: 03-10-08

Fecha de descarte: 15-12-08

No de Muestra	Crecimiento	Movilidad	Contaminación	Observaciones
1a	+	-	+	Sembrar en Fletcher
2a	+	-	-	Sembrar en Fletcher
3a	-	-	+	Descartar
4a	-	-	-	Descartar
5a	-	-	-	Descartar
6a	+	-	-	Sembrar en Fletcher
7a	+	-	-	Sembrar en Fletcher
8a	+	-	-	Sembrar en Fletcher
9a	+	-	+	Sembrar en Fletcher
10a	-	-	++	Descartar
1b	-	-	-	Descartar
2b	-	-	+	Descartar
3b	-	-	-	Descartar
4b	-	-	-	Descartar
5b	+	-	-	Sembrar en Fletcher
6b	-	-	-	Descartar
7b	-	-	-	Descartar
8b	-	-	++	Descartar
9b	+	-	-	Sembrar en Fletcher
10b	-	-	-	Descartar
1c	+	-	-	Sembrar en Fletcher
2c	-	-	-	Descartar
3c	-	-	+	Descartar
4c	-	-	+	Descartar
5c	-	-	-	Descartar
6c	-	-	+	Descartar
7c	+	-	++	Sembrar en Fletcher
8c	-	-	++	Descartar
9c	-	-	-	Descartar
10c	+	-	++	Sembrar en Fletcher

Fuente: Datos experimentales

1= Lugar de muestreo

a,b,c =series de tubos inoculados

Anexo No.9
Control de crecimiento
Tercer muestreo

Medio de cultivo EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos

Temperatura de incubación: 30°C

Método: Microscopía de campo oscuro

Fecha de Cultivo: 29-10-08

Fecha de descarte: 15-01-09

No de Muestra	Crecimiento	Movilidad	Contaminación	Observaciones
1 ^a	-	-	+	Descartar
2a	-	-	++	Descartar
3a	-	-	++	Descartar
4a	-	-	-	Descartar
5a	-	-	-	Descartar
6a	+	-	-	Sembrar en Fletcher
7a	-	-	++	Descartar
8a	-	-	+	Descartar
9a	-	-	+	Descartar
10a	-	-	+++	Descartar
1b	-	-	-	Descartar
2b	-	-	++	Descartar
3b	-	-	++	Descartar
4b	-	-	-	Descartar
5b	-	-	-	Descartar
6b	+	-	-	Sembrar en Fletcher
7b	-	-	-	Descartar
8b	-	-	+	Descartar
9b	+	-	+	Sembrar en Fletcher
10b	+	-	-	Sembrar en Fletcher
1c	-	-	-	Descartar
2c	+	-	+	Sembrar en Fletcher
3c	+	-	-	Sembrar en Fletcher
4c	-	-	-	Descartar
5c	-	-	-	Descartar
6c	-	-	-	Descartar
7c	-	-	-	Descartar
8c	-	-	+++	Descartar
9c	-	-	+	Descartar
10c	-	-	+++	Descartar

Fuente: Datos experimentales

1= Lugar de muestreo

a,b,c =series de tubos inoculados

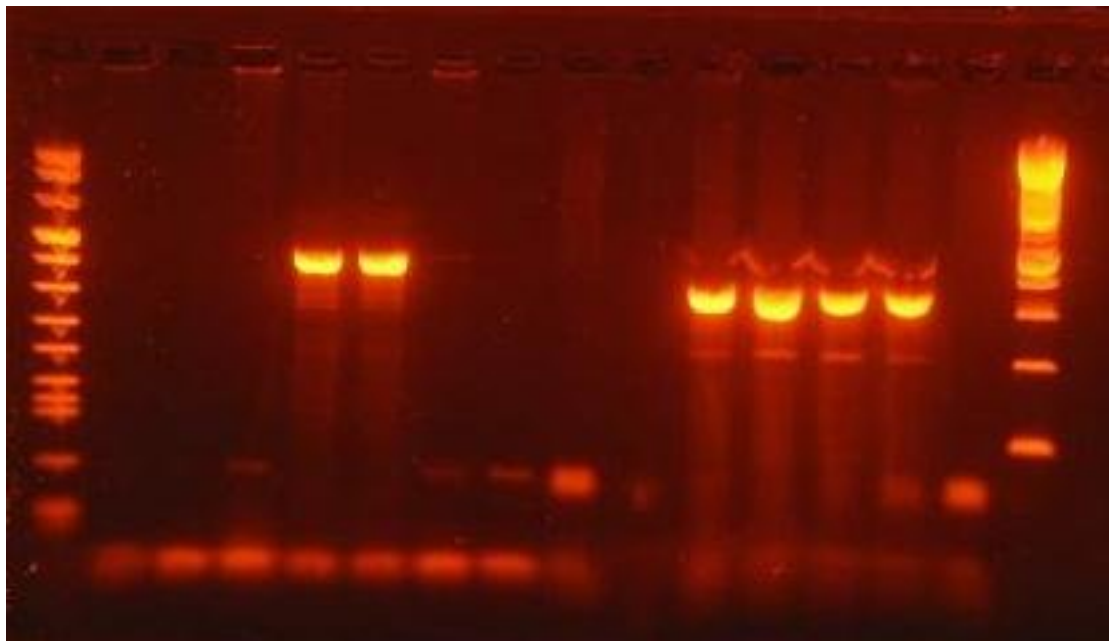
Anexo No. 10

Identificación por PCR

Laboratorio Nacional de Salud, Guatemala
TCC Leptospirosis-Ecosistema
Taller de Capacitación (2-6 de marzo de 2009)

Resultados de la Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2%

PM₁ 1.3 1.4 3.5 Can Ict Pat H₂O 1.3 1.4 3.5 Ict Can Pat H₂O PM₂



PCR LipL32 (IPK)

PCR ARNr 16S (LNS)

Leyenda:

- PM₁: marcador de peso molecular VIII (Roche)
- 1.3 ; 1.4 ; 3.5 : cepas aisladas de agua (USAC)
- Can: *L. interrogans* serogrupo Canicola
- Ict: *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae
- Pat: *L. biflexa* serogrupo Semarang serovar Patoc
- PM₂: marcador de peso molecular 100bp Ladder

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
 SEMINARIO DE INVESTIGACION

Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en fuentes de agua en la
 Aldea El Milagro, Masagua Escuintla

Medio de cultivo: _____

Fecha de Preparación: _____

Lote: _____

pH inicial: _____

pH final: _____

Temperatura de Incubación: 37°C (Observar por 7 días)

CONTROL DE CALIDAD

Fecha de Observación	No. de Tubo	Temperatura	Esterilidad	Cambio de coloración	Observaciones

Anexo No. 13
CONTROL DE CRECIMIENTO
Medios de cultivo preparados

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
 SEMINARIO DE INVESTIGACION
 Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en fuentes de agua en la
 Aldea El Milagro, Masagua Escuintla

CONTROL DE CRECIMIENTO
Medios de cultivo

Leptospira _____
 Medio de cultivo: _____
 Fecha de Preparación: _____
 Lote: _____
 Temperatura de incubación: 30°C
 Método: Microscopía de campo oscuro

Fecha de subcultivo		
Parámetros	Observaciones	Observaciones
Macroscópico		
Turbidez		
Contaminación		
Microscópico		
Crecimiento		
Movilidad		
Autoaglutinación		
Recomendación		
Fecha de observación		

Anexo No. 14**TOMA DE MUESTRA**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
 SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

“Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en fuentes de agua en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

No. Muestreo: _____

Fecha: _____

No. de muestra: _____

Lugar de recolección _____

Fuente de abastecimiento de agua: _____

Hora de recolección: _____

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	VALOR
pH	
Temperatura	
Profundidad	

Anexo No. 15

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
 SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

“Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en fuentes de agua en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Muestreo No: _____

Fecha: _____

Muestra No.	Color	Turbidez	Cantidad recolectada	pH	Presencia o ausencia de Espiroquetas por microscopia de campo oscuro

Anexo No. 16

CONTROL DE CRECIMIENTO Muestras de agua

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
SEMINARIO DE INVESTIGACION

Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en fuentes de agua de la Aldea El Milagro, Masagua Escuintla

CONTROL DE CRECIMIENTO MUESTRAS DE AGUA

Medio de cultivo: EMJH Suplemento de albúmina bovina y ácidos grasos + 5 Fluoracilo

Temperatura de incubación: 30°C

Método: Microscopía de campo oscuro

Fecha de cultivo: _____

Muestra No. _____

Fecha de subcultivo		
Parámetros	Observaciones	Observaciones
Macroscópico		
Turbidez		
Contaminación		
Microscópico		
Crecimiento		
Movilidad		
Autoaglutinación		
Recomendación		
Fecha de observación		