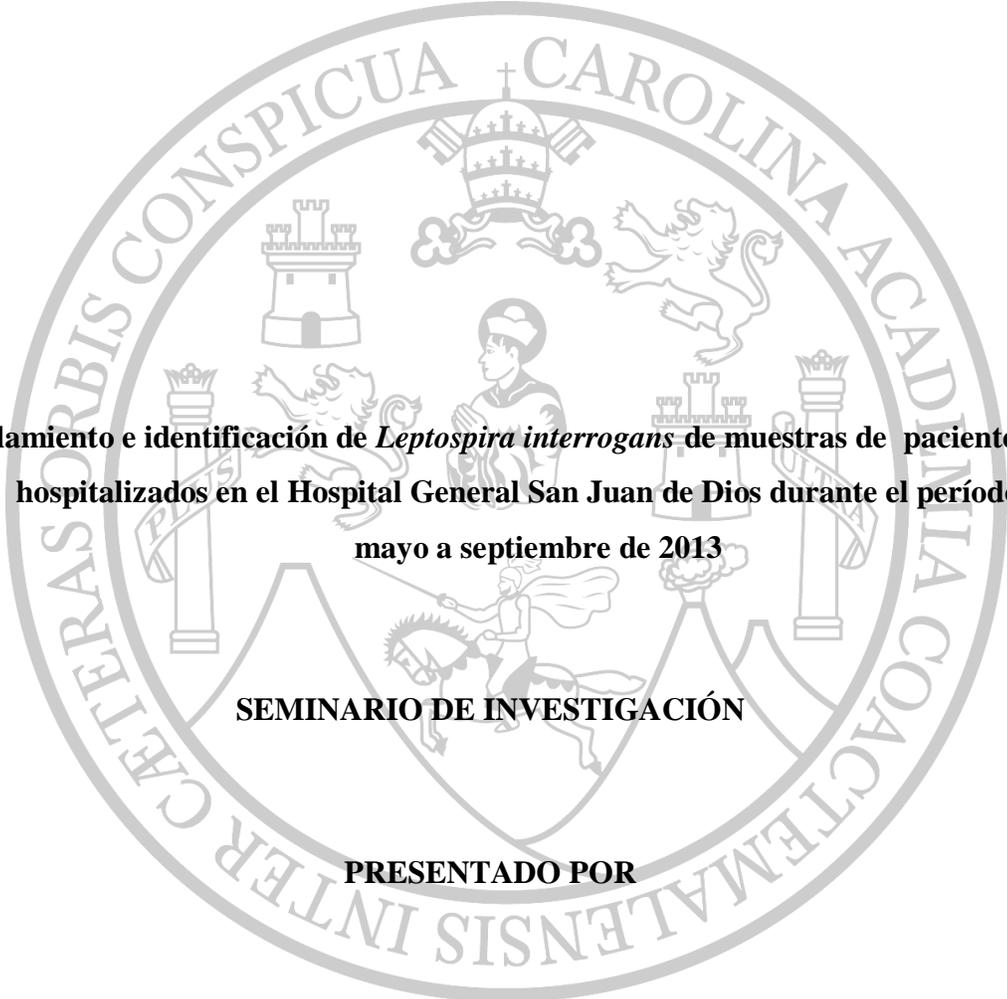


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a figure on horseback, surrounded by various heraldic symbols like castles, lions, and a crown. The Latin motto "CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* de muestras de pacientes hospitalizados en el Hospital General San Juan de Dios durante el período de mayo a septiembre de 2013

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

María Gabriela Solórzano Paz

Yndira Nineth Gálvez García

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, Noviembre del 2015

JUNTA DIRECTIVA

| | |
|--|------------|
| Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda | Decano |
| Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M. A. | Secretaria |
| MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo | Vocal I |
| Dr. Juan Francisco Pérez Sabino | Vocal II |
| Br. Michael Javier Mó Leal | Vocal IV |
| Br. Blanqui Eunice Flores De León | Vocal V |

AGRADECIMIENTOS

A Dios principalmente por ser nuestro guía y darnos la fortaleza, sabiduría y perseverancia para culminar con éxito una de nuestras metas.

A nuestros Padres por su apoyo incondicional en todos los aspectos de nuestra vida y por cada uno de los consejos que nos ayudaron a ser personas de bien.

A cada miembro de nuestra familia que con su apoyo moral fueron motivo de inspiración para lograr tan anhelada meta.

A nuestra casa de estudios que durante años nos brindó la formación académica que hoy estamos culminando y en la que tuvimos la oportunidad de encontrar valiosas amistades.

A nuestros asesores y revisora por su apoyo y conocimiento brindado durante la realización de este proyecto.

A las instituciones que nos abrieron las puertas y al personal de cada una de ellas que colaboraron para que se llevara a cabo el proyecto.

ÍNDICE

| | | |
|--------------|--|-----------|
| I. | RESUMEN..... | 3 |
| II. | ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN..... | 5 |
| III. | ANTECEDENTES..... | 6 |
| | A. Generalidades..... | 6 |
| | B. Transmisión de la leptospirosis..... | 8 |
| | C. Patogenia | 8 |
| | D. Cuadro clínico..... | 13 |
| | E. Estudios realizados en Guatemala..... | 16 |
| | F. Diagnóstico clínico..... | 20 |
| | G. Diagnóstico de laboratorio..... | 23 |
| | H. Muestras clínicas..... | 30 |
| | I. Medios de cultivo..... | 33 |
| | J. Aislamiento de leptospiras..... | 37 |
| | K. Identificación..... | 40 |
| | L. Métodos complementarios de apoyo para la reproducción, conservación, purificación y recuperación de cepas de leptospira..... | 44 |
| | M. Tratamiento..... | 45 |
| | N. Medidas de prevención..... | 46 |
| IV. | JUSTIFICACION..... | 49 |
| V. | OBJETIVOS..... | 50 |
| VI. | HIPÓTESIS..... | 51 |
| VII. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 52 |
| VIII. | RESULTADOS..... | 70 |
| IX. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 74 |
| X. | CONCLUSIONES..... | 81 |
| XI. | RECOMENDACIONES..... | 82 |
| XII. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |
| XIII. | ANEXOS..... | 91 |

I. RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad transmisible de los animales y humanos causada por cualquiera de los miembros patógenos del género *Leptospira*, considerándose como la zoonosis bacteriana más difundida en el mundo. Debido a la diversidad de manifestaciones clínicas que se presentan y por su similitud con otras patologías, es esencial contar con un conjunto de datos clínicos relevantes y con el apoyo de pruebas de laboratorio que permitan conducir hacia el diagnóstico definitivo.

En la actualidad en nuestro país no se cuentan con estudios enfocados hacia el aislamiento e identificación de *Leptospira* spp, por lo que el principal objetivo de este estudio fue demostrar la presencia de *Leptospira interrogans* en muestras de sangre de pacientes hospitalizados en el Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD) de la ciudad capital, a través de su aislamiento e identificación, así como también establecer las serovariedades responsables de la infección mediante la prueba de MAT.

Durante el estudio se incluyeron un total de 41 pacientes ingresados y hospitalizados en el HGSJDD, constituido por 15 pacientes de sexo femenino y 26 de sexo masculino con edades comprendidas entre los 0 a 79 años, siendo el grupo más afectado de 20 a 29 años con un 55.56%. Las ocupaciones más frecuentes fueron amas de casa y estudiantes, con predominio del sexo femenino.

De los 41 pacientes muestreados 24 (58.54%) eran procedentes de la ciudad capital y los 17 restantes procedían de otros departamentos. Entre los factores de riesgo asociados al desarrollo de la infección por leptospiras predominó el contacto con animales (66.67%) principalmente con roedores y perros.

Los signos y síntomas más frecuentes encontrados en los pacientes reactivos a anticuerpos anti-leptospira fueron: fiebre (88.89%), vómitos (77.78%), cefalea (55.56%), ictericia (44.44%) y náuseas (44.44%).

Mediante la prueba de ELISA IgM se obtuvieron 9 sueros reactivos (21.95%), los mismos fueron positivos con la prueba de MAT. El título más bajo obtenido por MAT fue de 1:80 y el más alto de 1:640. Se identificaron los serovares, *Tarassovi* como el más frecuente

(22.22%), seguido de *Pomona*, *Serjoe*, *Autumnales*, *Canicola* y *Australis* con un 11.11% para cada uno.

De los 9 pacientes positivos con ELISA IgM y la prueba de MAT, se logró el aislamiento de cuatro cepas de *Leptospira* spp, que representa el 9.76%, las cuales fueron almacenadas para estudios posteriores de identificación y caracterización, mediante pruebas moleculares y fenotípicas.

Derivado de ello, es importante resaltar la necesidad de continuar con este tipo de estudios que abarquen los principales centros hospitalarios, además de las áreas consideradas hiperendémicas para obtener datos representativos que permitan establecer la epidemiología de la leptospirosis en el país.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial y forma parte del grupo de enfermedades zoonóticas. El hombre es hospedero accidental que se infecta directamente con orina, tejidos, semen y secreciones vaginales de animales infectados, e indirectamente con el agua de lagunas, acequias, ríos, charcos y otros como suelo húmedo y vegetación contaminada con orina infectada (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002, p. IV).

Según los informes disponibles en la actualidad las incidencias van desde 0.1-1% por cada 100,000 habitantes por año en climas templados y de 10-100% por 100,000 en trópicos húmedos. La Organización Mundial de la Salud (OMS), indica que existen múltiples factores que intervienen en el mantenimiento, emergencia y reemergencia de la leptospirosis, como el cambio climático, el crecimiento demográfico, el comportamiento humano, la urbanización descontrolada a zonas periféricas sin saneamiento, agua potable y crisis económica (OMS, 2008).

Un estudio reciente sobre leptospirosis realizado en los asentamientos Santo Domingo y Manuel Colom Argueta ubicados en la ciudad capital de Guatemala, han demostrado una seroprevalencia del 74.4% y 77.78% respectivamente (García *et al.*, 2013), ambas comparables con las reportadas en áreas hiperendémicas en otros países (Zunino, E. y Pizarro R., 2007), sin embargo, no se han realizado esfuerzos por aislar las cepas de las diferentes serovariedades circulantes en el país.

Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como principal objetivo demostrar la presencia de *Leptospira* spp. en muestras clínicas de sangre de pacientes hospitalizados en el HGSJDD y se logró el aislamiento de cuatro cepas de muestras recolectadas en un periodo de cinco meses. Se identificaron los serogrupos y serovares implicados mediante la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT).

Este estudio formó parte del proyecto macro del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica sobre Leptospirosis Humana.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades

La leptospirosis es una zoonosis de diseminación mundial causada por leptospiras patógenas que pueden infectar a una gran variedad de animales domésticos, salvajes y al ser humano, cuya incidencia es mayor que la reportada (Carrada, T., 2005).

En 1887, Goldschmidt fue el primero en usar el término de “enfermedad de Weil”, para designar la ictericia infecciosa que Adolfo Weil había establecido como una entidad separada en 1886 (Rodríguez, B., 2000). La primera leptospira patógena fue observada por Stimson en New Orleans, en el año de 1907, en cortes de riñón de humano que se creía había muerto de fiebre amarilla, el organismo descubierto lo llamó *Spirochaeta interrogans* (Figuroa, M., 1984).

1. Agente etiológico

El género de *Leptospira* comprende dos especies: *L. interrogans* y *L. biflexa*, cada una de las cuales incluye un gran número de tipos serológicos, denominados serovares (Carrada, T., 2005).

Estudios más recientes de ADN, aún en desarrollo han establecido algunos cambios taxonómicos con respecto a esta clasificación, de modo que el género *Leptospira* comprende tres especies no patógenas: *L. biflexa*, *L. meyerii*, *L. wolbachii*, y las siguientes siete especies patógenas: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii*; distribuidas en 28 serogrupos y más de 200 serovares (Farr, W., 1995) (Levett, P., 2001) (Zamora, J). Plank y Dean incluyen *L. alexanderi* y *L. fainei*. Levett incorpora *L. parva* como no patógena y otras cuatro geno-especies.

Estas bacterias son espiroquetas muy finas, con longitud de 0.15 µm, la estructura consta de protoplasma helicoidal con espiras apretadas y extremidades en forma de gancho. La membrana externa multiestratificada es rica en lípidos (20%) y el peptidoglicano es de ácido α, ε-diaminopimélico (Myers, D., 1985).

No se visualizan con los procedimientos de tinción habituales y se observan en fresco, con microscopía de campo oscuro en la cual se distinguen “cordeles” muy finos, brillantes dotados de movimientos de rotación y flexión activos. Consta de 18 hélices por célula, conformación dextrógira. Sin embargo también pueden visualizarse mediante microscopía de inmunofluorescencia o bien teñidas con técnicas de impregnación argénica. En la microscopía electrónica se puede apreciar un cilindro protoplasmático enrollado alrededor de un filamento axial recubierto por la membrana externa (Carrada, T., 2005).

2. Componentes antigénicos

La clasificación de la leptospira se fundamenta en sus características antigénicas, debido a que presentan una composición antigénica compleja. Existen diferentes tipos de antígenos presentes:

a. Antígeno proteínico

Proteína que se encuentra en los filamentos axiales cuya composición química es semejante a la de los flagelos bacterianos. Los anticuerpos dirigidos contra estos filamentos no inmovilizan a la célula, sin embargo los anticuerpos contra la cubierta externa si la inmovilizan (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

b. Antígeno somático

Complejo molecular que se encuentra en la pared celular con propiedades fisicoquímicas similares a la de los antígenos de las bacterias gram negativa. A partir de ese complejo se ha logrado separar tres fracciones:

Fracción A-I: compuesta por proteínas, ácidos y azúcares.

Fracción A-II: constituida por carbohidratos de bajo peso molecular.

Fracción A-III: es una mezcla de A-I y A-II.

c. Antígeno de superficie

Complejo antigénico formado por proteínas, carbohidratos y lípidos que se encuentra en la envoltura externa de la célula, relacionado con el serotipo y reacciona con el anticuerpo IgM e IgG (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

Los antígenos superficiales localizados en la membrana externa facilitan la clasificación de serotipos (serovares). *L. interrogans* se subdivide según su composición antigénica en más de 200 serovarietades. Los anticuerpos generados frente a los lipopolisacáridos de la pared celular son determinantes del serotipo y tienen carácter protector, mientras que aquellos formados frente a los antígenos profundos no son protectores ni específicos (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

B. Transmisión de la leptospirosis

Las infecciones humanas con leptospiras resultan ante todo de la exposición directa o indirecta a la orina de animales infectados aunque hay otras formas de transmisión de la infección, tales como manipulación de tejidos de animales infectados y la ingestión de alimentos o agua contaminada, son también posibles. El agente infeccioso es transmitido de un animal portador a otro, mediante contacto directo o indirecto con orina u otros fluidos infecciosos que contengan leptospiras viables. Existen también otras formas de transmisión de la infección entre animales de granja como la infección por vía congénita o neonatal. También ha sido reportada la transmisión sexual de leptospiras en el apareamiento de animales como ratas, vacas, cerdos y perros (OMS., 2008).

C. Patogenia

En la actualidad no se conoce con exactitud el mecanismo de la acción patógena, pero se ha demostrado la producción de lipopolisacárido tóxico en los cultivos. En las infecciones con células *in vitro*, se ha comprobado la existencia de hemolisinas y la capacidad de adherencia de ciertas cepas y de diversos serotipos a los fibroblastos de ratón; esta propiedad es superior cuando se trata de cepas virulentas. Así mismo se ha demostrado *in vitro* que las leptospiras tienen la capacidad de penetración intracelular en células

endoteliales humanas; aunque tal propiedad invasora no ha podido demostrarse *in vivo* (Carrada, T., 2005).

La gran movilidad y el diámetro de la leptospira facilita la invasión al Sistema Nervioso Central (SNC) (meningitis aséptica) y al ojo, produciendo cuadros de conjuntivitis, uveítis, iridocitis y la demostración del parásito en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o en humor acuoso del ojo (Carrada, T., 2005).

Después de la penetración por lesiones en la piel, la leptospira patógena, invade el torrente sanguíneo y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el SNC y el humor acuoso. Sin embargo se cree que existe tropismo por algunos órganos como el hígado, riñones, corazón y músculo esquelético. La patogenicidad de este microorganismo estaría ligada a su presencia física en las lesiones, esto ha sido observado en procesos patogénicos provocados experimentalmente. El período de incubación comprende entre la primera y tercera semana, con un promedio de 10 días (Barbosa, W., 1972).

La penetración también se puede producir por las mucosas sobre todo la ocular y nasal, excepcionalmente la piel íntegra puede servir como puerta de entrada, salvo que la exposición al agua sea prolongada. La movilidad que el microorganismo posee y la hialuronidasa lo capacitan para penetrar en los tejidos, al igual que las toxinas y enzimas producidas por la leptospiras contribuyen a su patogenicidad (Laguna, V., 2000).

1. Fisiopatología de la enfermedad

La fisiopatología de la enfermedad es poco conocida y es probable que se deba a la acción directa del microorganismo, a las toxinas producidas o liberadas después de su lisis ó secundaria a la lesión capilar seguida de anoxia tisular (ver anexo 1). El poder invasivo de la leptospira puede estar relacionado a su constitución, estructura química y antigénica (Laguna, V., 2000).

a. Fisiopatología renal

La afección renal ocurre frecuentemente, pero es un tipo de insuficiencia con particularidades bien definidas donde no ha sido posible correlacionar estrechamente los hallazgos estructurales obtenidos por biopsia y los disturbios funcionales. Aunque formas

oligúricas de insuficiencia renal aguda (IRA) pueden estar presentes en pacientes con leptospirosis, cerca de la mitad de los pacientes presentan formas no oligúricas lo cual constituye un porcentaje alto si se consideran todas las causas de IRA. Se ha sugerido que un tipo de resistencia a la acción de la vasopresina pudiera ser el factor responsable de estas formas no oligúricas que tienen un mejor pronóstico y que están asociadas a menor grado de lesión renal. Otra observación reportada es la alta frecuencia de hipocalemia relacionada con una relativa integridad de los segmentos distales de la nefrona y con lesiones funcionales proximales que conducen a disminución de la reabsorción de sodio y agua con incremento de la liberación de éstos donde la aldosterona y el cortisol favorecen la pérdida de potasio (Pecchini, F., Borghi, M., Bodini, B., et al., 1992).

b. Fisiopatología hepática

La ictericia es la manifestación principal de las alteraciones hepáticas, ocurre en los casos más graves y se debe primariamente a la disfunción hepatocelular, habitualmente sin necrosis, el daño hepático en apariencia es subcelular y las leptospirosis rara vez se observan en el hígado. La ictericia resulta de la agresión hepática aunque la necrosis no sea prominente, concordando con los valores poco elevados de las transaminasas séricas. En los casos graves la ictericia puede presentar una coloración anaranjada por lo que se denomina cúprica o rubínica, se produce por la asociación entre la impregnación bilirrubínica, amarilla y la dilatación e hiperpermeabilidad vascular que resulta en congestión y hemorragia (Laguna, V., 2000).

1) Fenómenos hemorrágicos

Es conocida la presencia de fenómenos hemorrágicos en la enfermedad que en raros casos causa una verdadera diátesis hemorrágica. Esto se debe a alteraciones vasculares por daño endotelial (Nicodemo, A., Del Negro, G., y Amato, V., 1990).

Según (Guerrant, R., 2002) el compromiso endotelial puede iniciar la adhesión y la agregación plaquetaria, activando los mecanismos de coagulación y fibrinólisis. Según estudios realizados se alerta sobre la posible participación de la “reacción de Jarisch-Herxheimer” (que se caracteriza por una fiebre repentina y transitoria con lesiones cutáneas asociada a la administración de antibióticos para el tratamiento de la leptospira, como uno

de los mecanismos fisiopatológicos relacionados con las formas graves de la enfermedad, atribuyendo a la presencia de una sustancia llamada “endotoxin-like” en la espiroqueta que estimularía la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral (FNT) cuyo papel es decisivo en la mediación de la respuesta inflamatoria induciendo la producción de otras citocinas de importancia tales como interleucina 1 y 6 (IL-1 e IL-6) (Laguna, V., 2000).

c. Fisiopatología cardiovascular

Pueden aparecer manifestaciones tan simples como alteraciones en el trazado electrocardiográfico o hasta graves complicaciones clínicas seguidas de muerte. Varios factores son incriminados como responsables por la agresión miocárdica, entre ellos la acción directa de las leptospiras o sus productos tóxicos, las alteraciones inmunopatológicas y metabólicas (Laguna, V., 2000).

Se establece compromiso cardíaco con miocarditis, pericarditis, trastornos del ritmo y de la conducción (Watt, G., Padre, L., Triazon, M., y Calubaquib, C., 1990).

d. Fisiopatología pulmonar

Los cambios pulmonares derivados de la enfermedad son frecuentes, se reportan en el 20 al 70 % de los casos, sin embargo los síntomas suelen ser ligeros y a veces subestimados por la afección de otros órganos. Destaca la hemorragia focal producida por el daño del capilar endotelial ocasionado por mecanismos inmunes. Las formas severas con daño pulmonar son raras pero constituye en muchos casos la principal causa de muerte, han sido reportados casos de falla respiratoria por hemorragia pulmonar masiva y progresos fatales a síndrome de distres respiratorio del adulto (Hidou, M., 1991).

Se manifiesta en su forma más grave por un cuadro de neumonía hemorrágica, relacionada a la acción directa de una toxina sobre la pared capilar. Las lesiones son observadas con mayor frecuencia en la periferia y bases pulmonares como consecuencia de la abundancia de capilares y mayor vigor de los movimientos respiratorios de esas áreas (Laguna, V., 2000).

2. Anatomía patológica

a. Patología renal

El cuadro renal es predominante en la leptospirosis y hasta hace poco tiempo la causa principal de la mortalidad. Las lesiones anatomopatológicas básicas son la necrosis tubular aguda y la nefritis intersticial algunas veces con la presencia del microorganismo en el parénquima (Laguna, V., 2000).

Las alteraciones renales incluyen aumento del nitrógeno de urea, creatinina, leucocituria, hematuria, cilindruria y proteinuria. Las características histológicas incluyen edema intersticial con filtrado inflamatorio mononuclear, con pocos eosinófilos. A nivel glomerular la lesión es moderada con proliferación mesangial, depósitos de C3, ocasionalmente IgM y un daño tubular en el cual en ocasiones puede llegar a ser prominente la pérdida de bicarbonato. La patogenia corresponde a la suma de diversos mecanismos coexistentes como la asociación de hipovolemia e hipotensión (Saad, C., 2006).

En la histología se demuestra una combinación de nefritis intersticial focal y necrosis tubular aguda. Los glomérulos presentan moderada hiper celularidad a predominio de las células axiales y en algunos espacios urinarios se observan depósitos hialinos reticulados, interpretados como de origen protéico. La nefritis intersticial se presenta como acúmulos de mononucleares, particularmente linfocitos, histiocitos y eosinófilos acompañados de intenso edema, vasodilatación con congestión y tumefacción endotelial. La necrosis tubular se presenta por grupos de túbulos principalmente distales, dilatados y revestidos por células epiteliales bajas y de citoplasma basofílico, varios estudios experimentales han demostrado las principales alteraciones en el órgano, para algunos la nefritis intersticial representa la lesión más precoz y principal (Laguna, V., 2000).

b. Patología hepática

En la microscopia óptica se observa la colestasis con trombos biliares, dilatación, tortuosidad del árbol biliar y lesiones hepáticas, alteraciones que tienen una localización centrolobular predominante. Así mismo se presenta regeneración hepatocitaria, alteración de la estructura sinusoidal y proliferación kupfferiana. Las lesiones del hepatocito son

evidenciales a la ultramicroscopía y son de carácter inespecífico, se asemejan a las encontradas en la hepatitis viral y en la colestasis medicamentosa, lesionando diversas organelas hepáticas como microvellosidades de los polos biliar y sinusoidal, membrana celular, capilar biliar, retículo endoplásmico y mitocondrias (Laguna, V., 2000).

El cuadro hepático raramente llega a la necrosis, el compromiso hepatocelular parece ser sobretodo en la función de la excreción biliar, las células de Kupffer se presentan aumentadas de volumen e hiperplásicas fagocitando pigmento biliar, el perfil histopatológico y clínico señala la existencia de un cuadro obstructivo intra-hepático con la participación de componente parenquimatoso el cual es demostrado con la microscopía óptica y electrónica (Laguna, V., 2000).

D. Cuadro clínico

La leptospirosis presenta cuadros clínicos diversos, conforme al tropismo del agente, intensidad de la infección y posiblemente de las condiciones inmunitarias del hospedero. La leptospirosis es una enfermedad bifásica, este comportamiento se desarrolla en: la forma anictérica y la segunda más grave la forma ictérica (Levett, P., 2001).

El período de incubación es de 5-14 días (máximo de 2 a 30 días) (OMS., 2008). Lo cual se ha podido estudiar después de la exposición accidental o el tiempo transcurrido después de una inmersión (Laguna, V., 2000).

1. Fase séptica

Es la primera fase de la enfermedad, dura alrededor de 4 a 7 días, en esta fase las características principales pueden ser gripales, y es la fase donde se puede aislar a las leptospiras de la sangre, el LCR y la mayoría de los tejidos. Posteriormente aparece una etapa intercalar donde en algunas veces el paciente se presenta afebril por 1 o 2 días (Sanford, J., 1991).

2. Fase inmune

Considerada la segunda fase donde característicamente las leptospiras desaparecen de la sangre y LCR siendo posible hallarlas en el riñón, orina y humor acuoso, dura de 4 a 30

días en esta fase se desarrollan los anticuerpos circulantes presentándose la afección renal, hepática, meningitis, uveítis. Algunas veces puede aislarse a las leptospiras hasta 24 horas después de aparecida la ictericia (forma ictérica) (Sanford, J., 1991).

Entre los pacientes con leptospirosis el 90% presenta la forma más leve de la enfermedad (forma anictérica), mientras que entre el 5-10% presentan la forma grave (forma ictérica). Esta última es llamada enfermedad de Weil o Síndrome de Weil. Se admite que el 60-70% de los pacientes presentan manifestaciones diagnosticadas como gripe o resfriado y solo se identifican mediante estudios serológicos. Se han encontrado evidencia serológica de infección en aproximadamente 15% de las personas que trabajan en mataderos y veterinarias (Farrar, E., 1995).

3. Leptospiriosis anictérica

Ocurre en la fase séptica, se caracteriza por ser de inicio súbito con fiebre remitente alta, cefalea persistente, mialgias intensas, dolor abdominal, malestar general y astenia. Los signos y síntomas se mantienen por 47 días, puede suceder que no pase a la fase inmune. Los pacientes en esta fase se muestran agudamente enfermos, febriles, con bradicardia relativa y normodensos (Levett, 2001).

La cefalea es intensa, la presencia y severidad puede anunciar que se inicia la meningitis, suele ser frontal, ocasionalmente bitemporal y occipital. Lo más frecuente en la fase séptica es la sensibilidad muscular y las manifestaciones oculares como hemorragias conjuntivales, fotofobia y dolor ocular. El signo más característico podría ser el de la hiperemia conjuntival, que le da una tonalidad rojiza a todas las escleróticas y que usualmente aparece en el tercer o cuarto día de la enfermedad (Farrar, E., 1995).

En la segunda semana de la enfermedad se inicia la fase inmune, en la cual se presenta fiebre baja y dura de 1 a 3 días, en esta fase se correlaciona con la aparición de anticuerpos IgM circulantes mientras que la concentración de C3 se encuentra en el rango normal. Desde el punto de vista clínico la presencia de la meningitis aséptica es el dato más importante, en esta fase las leptospiras han desaparecido del LCR sin embargo aparecen las manifestaciones clínicas relacionadas a la aparición de anticuerpos. De esta manera el 80-

90% de los pacientes con leptospirosis anictérica (durante la fase inmune) pueden presentar pleocitosis del LCR y 50% de ellos aparecen con signos de meningitis (Laguna, V., 2000).

En caso aparezca meningitis, las manifestaciones no son específicas y el diagnóstico puede ser confundido con meningitis de etiología viral, debido a la presencia de pleocitosis mononuclear. Cuando las fases están bien definidas el clínico tiene mayor probabilidad de diagnosticar meningitis aséptica por leptospirosis. Esta manifestación neurológica dura algunos días y no es fatal sobre todo en los casos anictéricos. Al examinar LCR los mononucleares no son más que 500 células por mm³, proteinorraquia de 300 cel/100ml, glucosa normal, todos los serotipos patogénicos para el humano son probablemente capaces de causar meningitis aséptica, los serotipos con mayor prevalencia son *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* y *Pomona*. Meses después de la enfermedad aguda, puede presentarse uveítis en el 2% de los pacientes, este problema puede ser crónico o prolongado (Laguna, V., 2000).

4. Leptospirosis icterica

La leptospirosis que en su forma más grave es conocida como síndrome de Weil. Descrita originalmente con la especie *Icterohaemorrhagiae* sin embargo se observa en la mayoría de las leptospiras. Tiene como principal característica la disfunción renal y hepática con fenómenos hemorrágicos colapso vascular, alteraciones graves de conciencia y mortalidad que llega al 5-10% de los pacientes (Sanford, J., 1991; Agudelo, P., 2007).

Las manifestaciones aparecen entre el tercero y sexto día de enfermedad pero la identificación plena se da en la segunda semana. Entre las manifestaciones se incluyen dolor gastroentérico en el cuadrante derecho, aumento de las transaminasas hasta 5 veces el valor normal. Hiperbilirrubinemia conjugada, bloqueo intracelular hepático que impide la excreción de bilirrubina, hepatomegalia en el 70% de los casos, existen complicaciones raras como la colecistitis aguda de tratamiento quirúrgico que se asocia con la infección de *L. autumnalis*. En los niños se puede presentar hipertensión, coleliscistitis acalculosa, pancreatitis y vasculitis necrotizante periférica (Laguna, V., 2000).

5. Fiebre pretibial de Fort Bragg

Caracterizada por lesiones eritematosas pretibiales, sobreelevadas de 1-5cm, relacionada a infecciones por *Leptospira* del serotipo *autumnalis*, y en algunos casos con el serotipo *Pomona*. Esta enfermedad fue observada en el verano de 1942 y su fase inicial era similar a la fase séptica, llamando la atención por la presencia de lesiones pretibiales simétricas alrededor del cuarto día (Laguna, V., 2000).

Debido a que no existe ningún cuadro clínico característico de la leptospirosis es importante considerar algunas enfermedades como diagnóstico diferencial de la leptospirosis entre las que se encuentran: influenza, dengue, malaria, hepatitis virales (OMS., 2008).

E. Estudios realizados en Guatemala

En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) existen trabajos de tesis sobre leptospirosis dirigidos al estudio histopatológico, el comportamiento epidemiológico, la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. en la especie porcina, canina y bovina principalmente. En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC se han realizado estudios con el objetivo de aislar *Leptospira interrogans* de fuentes de agua. Sin embargo no se ha trabajado en el aislamiento de *Leptospira* spp. ni se ha determinado la importancia de estas especies en la transmisión de esta espiroqueta a humanos.

En 1980 Torres M. confirmó el primer caso de leptospirosis humana en Guatemala. Se detectó en un paciente de sexo masculino que residía en La Democracia, Escuintla. El diagnóstico microbiológico se realizó durante la etapa aguda por medio de la observación directa de leptospiras en campo oscuro en plasma heparinizado y sedimento urinario. Se realizó el aislamiento del agente etiológico en varios hemocultivos y se demostró la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*, por medio de Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). El diagnóstico fue confirmado en el Centro de Control de enfermedades de Atlanta (CDC) usando MAT, dando como resultado un título de 1:200 con serogrupo *L. interrogans* serovariedad *copenaghensi*.

En el 2003 Orantes J. realizó una comparación entre los métodos de microscopía de campo oscuro y aglutinación en látex comparado con el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) IgM para el diagnóstico de leptospirosis. El estudio se realizó en el servicio de la emergencia del HGSJDD. Se estudiaron 90 pacientes que presentaron sintomatología compatible con leptospirosis. Los datos clínicos que se pueden relacionar con leptospirosis fueron trombocitopenia (42.42%), la cual puede estar asociada a coagulación intravascular diseminada; valores fuera de los límites de referencia de: bilirrubina directa (59.09%), alaninaaminotransferasa (ALAT) (34.85%), aspartatoaminotransferasa (ASAT) (45.45%); niveles de nitrógeno de urea (BUN) arriba de los 100mg/dL (3.33%), la creatinina arriba de 8mg/dL (2.22%). La sensibilidad para campo oscuro fue de 38% y 33% para aglutinación en látex y especificidades de 43 y 49% respectivamente, por lo tanto ambos métodos no son adecuados para el diagnóstico de leptospirosis. El principal síntoma clínico que presentaron los pacientes asociado a la leptospirosis fue la ictericia. La segunda entidad nosológica fue citomegalovirus (14.4%), seguida de mononucleosis infecciosa, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C y dengue con el 6.66% restante. La incidencia de leptospirosis determinada con ELISA IgM fue del 73.3%, la que se considera elevada, tomando en cuenta que las pruebas que sean positivas con dicho método deben ser confirmadas con MAT, que es el estándar internacional para el diagnóstico de la leptospirosis (OMS, 2008), debido a que la especificidad de ELISA IgM se ve afectada en presencia de enfermedades febriles, como fue el caso de este estudio, en el cual no se confirmaron con dicha prueba (Terpstra, T., 2008).

En el 2004 Estrada P. realizó un estudio con 84 muestras de suero de pacientes con enfermedad febril referidas al Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica (LVE) del Área de Salud de Escuintla, provenientes de 12 distritos de Escuintla durante el año 2003. Los objetivos fueron establecer el diagnóstico diferencial de leptospirosis humana y dengue, por medio de pruebas de ELISA IgM y demostrar que en dicho departamento la enfermedad febril de los casos referidos al LVE puede ser causada por leptospirosis además del virus del dengue, además que es importante incluir pruebas específicas para leptospirosis en la rutina del LVE. La mayoría de pacientes investigados se encontraba en edades mayores a 35 años, con predominio del sexo femenino. De las 84 muestras analizadas para detectar anticuerpos IgM por ELISA, 14 fueron positivas para dengue y 8 muestras fueron reactivas

a leptospirosis. Los 8 casos positivos fueron confirmados por medio de la prueba MAT, realizada en la Facultad de Medicina Veterinaria de la USAC. El 100% de muestras presentaron anticuerpos contra el serogrupo de *L. interrogans*, serovar *icterohaemorrhagiae*, además 6 de las muestras reaccionaron contra 2 y 3 serovares diferentes. Con lo anterior se logró demostrar que en el departamento de Escuintla la enfermedad febril es causada por *Leptospira* spp. además del virus del dengue.

En el año 2006 Sikahall S. realizó la estandarización de la prueba MAT para el diagnóstico de leptospirosis humana, el estudio estuvo constituido por muestras con anticuerpos tipo IgM anti-*Leptospira* detectados con la prueba ELISA, el Grupo 1: fue positivo para leptospirosis, el Grupo 2: positivos a dengue, el Grupo 3: positivos para hepatitis B o C, y el Grupo 4: muestras de donantes de sangre, como grupo control. El total de muestras fueron analizadas por la técnica MAT contra diez diferentes serovariedades de *L. interrogans* utilizándose los criterios establecidos por la OMS. El 25% del total de las muestras presentaron anticuerpos anti-*Leptospira* spp. La distribución de las serovariedades encontradas en el estudio fue la siguiente: *Icterohemorrhagiae* (63.64%), *Canicola* (24.24%), *Pomona* (6.06%), *Bataviae* (3.03%) y *Pyrogenes* (3.03%) concordando con estudios realizados en otros países. Además 3 muestras fueron positivas a más de una serovariedad. Se encontró que en el grupo control (donadores de sangre) en el 10% de los mismos se les detectaron la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*, con lo que se demostró que la leptospirosis en Guatemala es una zoonosis más frecuente de lo esperado.

En el año 2007 Zelaya B. et al. evaluaron la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* spp. en 199 pobladores de la aldea El Milagro, Masagua Escuintla. Se analizaron muestras de sangre por las técnicas de MAT y ELISA IgG. Se muestrearon también especies animales (caninos, bovinos y suinos) propiedad de los investigados y fueron procesadas por MAT. La seroprevalencia estimada en personas mayores de 15 años, fue de 51.8%, utilizando una dilución inicial de 1:20 y en las especies animales, fue de 54.9%, especialmente alta en la población canina con un 63%. En este estudio se consideró que todos los factores explorados (sexo, ocupación, edad, almacenamiento de agua y de alimentos, tenencia de animales e inundación de la vivienda), mostraron ser estadísticamente importantes en el

riesgo de producir alta seroprevalencia de infección por *Leptospira interrogans*, en los habitantes mayores de 15 años de dicha aldea.

En el año 2008 Galindo S. realizó un estudio para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en donadores de sangre del HGSJDD, así como demostrar la circulación y frecuencia de los diferentes serogrupos de *Leptospira* spp. por medio de MAT. Para ello se analizaron 140 muestras de suero, de las cuales 18 (12.86%) fueron reactivas. El grupo de edad más afectado fue el de personas de 20 a 40 años (88.89%). Los serogrupos de *L. interrogans* que se encontraron circulando dentro de la población en estudio son *Icterohaemorrhagiae* (27.27%), *Hebdomadis* (27.27%), *Serjoe* (18.18%), *Canicola* (13.64%) y *Bataviae* (13.64%). Algunas muestras reaccionaron frente a dos o más serogrupos. Los resultados obtenidos demostraron que *L. interrogans* se encuentra circulando en el país.

En el año 2010 Barrios J. realizó un estudio para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en muestras serológicas de pacientes con sintomatología sugestiva de dengue, de los hospitales Roosevelt y San Juan de Dios, referidos al LNS en el año 2005 y que fueron negativos con la prueba de inmunoensayo enzimático sobre fase sólida de captura para IgM (MAC-ELISA) para anticuerpos anti-dengue IgM, así como demostrar la circulación y frecuencia de los diferentes serogrupos de *Leptospira* con MAT y establecer los síntomas y signos más frecuentes en los casos de pacientes con serología positiva a *L. interrogans*. De las 48 muestras, 18 (38.5%) presentaron anticuerpos anti-*Leptospira*, los serogrupos identificados fueron *Pyrogenes* (38.89%), *Canicola* (22.22%), *Hebdomadis* (16.67%), *Icterohaemorrhagiae* (11.11%) y *Serjoe* (11.11%). Los datos obtenidos de las fichas demostraron que los pacientes sospechosos a dengue refirieron como principales síntomas y signos comunes a ambas enfermedades: fiebre (83.3%), escalofríos (72.2%), dolor de cuerpo (55.6%) y dolor de cabeza (55.6%).

En el año 2010 González S. y Orozco C, realizaron un estudio con el objetivo de aislar e identificar *L. interrogans* en fuentes de agua de la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla, basado en un estudio realizado en dicha aldea en el año 2008 (Zelaya, B., *et al.*, 2007). 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 *Leptospira*

spp.,. En medio de EMJH se obtuvo un 55.17% de crecimiento y en el medio de Fletcher 50%. Del total de muestras se logró aislar dos cepas de *Leptospira* spp., que se diferenciaron a través de la prueba fenotípica de crecimiento en presencia de 8-azaguanina, útil para diferenciar *L. biflexa* (saprobia) de *L. interrogans* (patógena). Se determinó que ambas cepas eran *L. biflexa*. La especie aislada fue confirmada con la técnica de PCR en el LNS. No se logró aislar *L. interrogans*, pero el aislamiento de una cepa de *Leptospira* no patógena, permite inferir que están dadas las condiciones para que las patógenas puedan desarrollarse. El estudio permitió estandarizar la prueba de diferenciación fenotípica de crecimiento en EMJH con suplemento de albúmina y ácidos grasos + 8 azaguanina, así también se estandarizó la metodología para el aislamiento e identificación de *Leptospira* spp.

En el año 2011 Herrera y Pérez, realizaron un estudio en el asentamiento 15 de Enero cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en los habitantes de este asentamiento mediante las pruebas de MAT y ELISA IgG. De igual forma se determinaron los serovares de *Leptospira* circulantes en esta población y los factores asociados que contribuyen a la exposición con la bacteria en poblaciones similares. Se incluyeron 119 pobladores con edades comprendidas entre los 6- 85 años. Se determinó que el 30.3% de las personas muestreadas presentaron anticuerpos anti-*Leptospira* con MAT, siendo la prevalencia de 22.2- 39.3% y la concordancia entre las pruebas de ELISA y MAT de 72.3%. Los títulos obtenidos con MAT estuvieron en un rango de 1:40 a 1:640, siendo el más frecuente de 1:80. Se identificaron los serovares Australis y Lanka como los más frecuentes (11.1%), seguidos por Icterohaemorrhagiae, Pomona y Javanica con 8.3% cada uno. No se encontró asociación entre la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* y las características encontradas en la población del asentamiento.

F. Diagnóstico clínico

La leptospirosis en humanos puede mostrar una amplia variedad de síntomas y signos que incluyen: fiebre, dolor de cabeza severo, dolores musculares, inyección conjuntival, ictericia, malestar general, rigidez en la nuca, escalofríos, dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, oliguria/anuria, hemorragias, erupciones en la piel, fotofobia, tos, arritmia cardiaca, hipotensión, confusión mental, psicosis, delirio (Terpstra, J., 2008).

El diagnóstico de la leptospirosis debe ser considerado en cualquier paciente que presente fiebre súbita, escalofríos, inyección conjuntival, dolor de cabeza, mialgia e ictericia. El diagnóstico es más difícil cuando los pacientes presentan síntomas tales como tos, disnea, náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, artralgias y erupción en la piel. La inyección de la conjuntiva y el dolor muscular, más notable en las áreas lumbares y pantorrillas, son los hallazgos clínicos más distintivos (OMS, 2008).

La sospecha se incrementará si hay historia de exposición ocupacional o recreacional a animales infectados o a un ambiente potencialmente contaminado con orina animal. Debido a que hay un número grande de fuentes potenciales de infección y muchas formas para la transmisión, los grupos de riesgo pueden diferir de un área a otra. Su distribución es estacional, incrementándose con el aumento de lluvias y temperatura, sin embargo la enfermedad puede ocurrir a lo largo de todo el año. Las epidemias pueden estar asociadas con cambios en el comportamiento humano, contaminación del agua con animales o aguas residuales, cambios en la densidad de los reservorios animales, o a partir de un desastre natural como ciclones o inundaciones. Una vez que se haya considerado la posibilidad de la leptospirosis se deben aplicar pruebas apropiadas de diagnóstico y manejo clínico (OMS, 2008).

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son muy variables, típicamente la enfermedad presenta cuatro categorías clínicas amplias:

- una enfermedad leve de tipo pseudo gripal
- síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis
- meningitis/meningo encefalitis
- hemorragia pulmonar con falla respiratoria.

Por lo tanto, el diagnóstico clínico es difícil por esta presentación variada y no específica; su confusión con otras enfermedades (dengue y otras fiebres hemorrágicas) es particularmente común en los trópicos, además, las presentaciones clínicas se pueden superponer en la medida en que la infección progresa. Además de confundirse con otras enfermedades, la leptospirosis se puede presentar de forma leve y no ser investigada en el laboratorio (Terpstra, J., 2008).

El estudio de muestras de pacientes hospitalizados ha revelado varias anormalidades no diagnósticas incluyendo tasas elevadas de sedimentación eritrocitaria, trombocitopenia, leucocitosis, hiperbilirrubinemia y niveles elevados de creatinina sérica, creatinina quinasa y amilasa sérica (Terpstra, J., 2008).

No existe ningún cuadro clínico de la leptospirosis que sea característico de la enfermedad, por lo que siempre la sospecha clínica de la enfermedad debe ser confirmada mediante pruebas de laboratorio (Terpstra, J., 2008).

Las siguientes enfermedades deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial de la leptospirosis:

- Influenza
- Dengue clásico y dengue hemorrágico
- Infecciones por hantavirus, incluyendo el síndrome pulmonar por hantavirus u otros síndromes de dificultad respiratoria
- Fiebre amarilla y otras fiebres hemorrágicas de origen viral
- Rickettsiosis
- Borreliosis
- Malaria
- Pielonefritis
- Meningitis aséptica
- Envenenamiento por químicos
- Envenenamiento por alimentos
- Fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas
- Hepatitis virales
- Fiebre de origen desconocido (FOD)
- Seroconversión primaria por virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
- Enfermedades de los legionarios
- Toxoplasmosis
- Mononucleosis infecciosa y Faringitis

(Terpstra, J., 2008).

G. Diagnóstico de laboratorio

Debido a que la leptospirosis no presenta síntomas patognomónicos el diagnóstico definitivo se lleva a cabo por el laboratorio mediante diversas pruebas directas o bacteriológicas e indirectas (serológicas) (Caballero, A., y Romero, J., 1997, p. 22).

La leptospirosis es una enfermedad sumamente contagiosa, por lo que el personal que trabaja en el laboratorio debe tomar todas las medidas necesarias para evitar la infección (Terpstra, J., 2008).

Las pruebas se dividen de acuerdo al método de identificación en bacteriológicas y serológicas.

1. Bacteriológico

a. Muestra de sangre (hemocultivo), LCR, orina, órganos

Estas muestras se trabaja en cabina de bioseguridad tipo II o cercana del mechero de Bunsen. Se controlan los cultivos cada 5-7 días observando en microscopio de campo oscuro. Si se observa presencia de leptospiras tanto en medio líquido como semisólido se realiza el subcultivo en nuevo medio para la conservación de la cepa e identificación posterior. Se incuban por 7 días a 28°C-30°C. Si los hemocultivos son negativos, se incuban y se hace control cada 7 días, hasta completar 4-8 semanas antes de descartar como negativa la muestra (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

La presencia de leptospiras indica la positividad del caso. Generalmente, el aislamiento de otras bacterias indica que la muestra se contaminó durante el procedimiento de toma de muestra o siembra de los medios. El no aislamiento de leptospiras posterior a las ocho semanas de realizada la siembra, indica que el paciente no estuvo con leptospirosis o la muestra fue tomada en un período no adecuado posterior a la leptospiremia. El crecimiento de leptospiras en un medio semisólido, es usualmente característico por la aparición de un disco visible, conocido como anillo o disco de Dinger (Ver anexo 2). La presencia de sedimento o turbidez indica que el cultivo está contaminado (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

b. Examen directo de leptospiras

Se pueden observar en muestras clínicas como sangre, orina, LCR y fluidos dializados, en microscopía de campo oscuro e inmunofluorescencia directa; pero su sensibilidad es muy baja debido a que sólo se pueden detectar cuando la concentración de leptospiras está entre 100-200/mL. La microscopía en muestras de sangre es válida sólo en los primeros días después de la enfermedad (fase leptospirémica) (Céspedes, M., 2005).

Se realiza colocando una gota de muestra sobre una lámina en la cual se buscan leptospiras en aproximadamente en 50 campos del microscopio de campo oscuro. La evaluación consiste en observar leptospiras y ver sus características morfológicas y de motilidad (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

La presencia de leptospiras en cualquiera de la muestras indica la positividad del caso. La orina puede contener algunas bacterias, pero la presencia de microorganismos en LCR, sangre y tejidos indica la contaminación durante el procedimiento de la toma de muestra o transporte de la misma. En el examen de muestras de sangre al microscopio de campo oscuro, se debe diferenciar las leptospiras móviles de elementos como fibrillas, que poseen movimiento browniano. La concentración de leptospiras en sangre y LCR es mínima. Sin embargo, no observar espiroquetas no significa que en la muestra completa no estén presentes. En el machacado de órganos como riñón e hígado es posible observar mayor número de leptospiras. El diagnóstico presuntivo por observación directa al microscopio de campo oscuro debe ser necesariamente confirmado y correlacionado con los hallazgos en el cultivo y los resultados serológicos (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

c. Tinciones

Debido a que las leptospiras son muy delgadas y se colorean muy pobremente con los colorantes habituales, como para ser observadas bajo un microscopio de campo claro convencional. Las leptospiras se destacan como hebras de plata sobre el fondo oscuro. Es esencial usar un microscopio de campo oscuro de buena calidad (OMS, 2008).

Los métodos de coloración incluyen:

- Coloración de plata

- Coloración por inmunofluorescencia directa utilizando anticuerpos monoclonales de conejo marcados con fluoresceína o ratón
- Coloración con inmunoperoxidasa
- Hibridación *in situ* usando sondas de ADN
- Coloración con Rojo Congo

(OMS, 2008).

d. Técnica de inmunofluorescencia

La técnica de anticuerpos fluorescentes se ha adaptado para identificar serovares de leptospiras en tejidos y líquidos corporales, y puede emplearse como método tamiz para identificar a los animales que eliminan los microorganismos en la orina cuando un cultivo es imposible o exige demasiado tiempo (Silva, R., 2007).

También es de gran utilidad para diagnosticar la infección en material patológico, que no es adecuado para realizar un cultivo o cuando se requiere un diagnóstico rápido; el éxito de esta técnica depende del número de organismos presentes, por lo tanto, es menos útil para el diagnóstico del estado de portador crónico, donde el número de organismos puede ser bajo o encontrarse muy localizado en una zona en particular dentro del órgano afectado.

Mediante la inmunofluorescencia se puede investigar tanto la presencia de leptospiras en muestra de material sospechoso (método directo), como detectar anticuerpos en el suero de animales infectado (método indirecto). El método directo es específico y de gran utilidad pudiéndose utilizar para tejidos frescos o en autólisis; con este objeto se procede a hacer un homogenizado de la muestra en estudio, siendo preferible en el primer caso usar el sobrenadante donde se detectará mayor número de leptospiras y, en el segundo es más conveniente emplear el sedimento apareciendo estos microorganismos desintegrados o fragmentados con fluoresceína típica, siendo este método superior a la impregnación argéntica (Silva, R., 2007).

2. Serológicas

El diagnóstico presuntivo precoz, tanto de la forma leve de tipo catarral o de la forma icterica severa es esencial para evitar los daños patológicos subsecuentes en el paciente. La

selección y uso de las pruebas convenientes para el diagnóstico de laboratorio dependen del conocimiento del curso de la enfermedad. El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento de la espiroqueta de muestras de sangre, LCR y orina; aunque debido al desarrollo lento y las pocas posibilidades de aislamiento (del 1-3%), inicialmente se emplean métodos serológicos, complementándose con el diagnóstico bacteriológico (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

En la leptospirosis los anticuerpos son detectados a partir de 5-10 días de iniciado los síntomas de la enfermedad. Cuando la primera muestra es tomada en la primera semana de la enfermedad, es importante obtener una segunda muestra después de 1-3 semanas para determinar incremento del título de anticuerpos. La seroconversión indica que es una infección producida por leptospiras (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

Los anticuerpos que predominan inicialmente en la leptospirosis son de tipo IgM y luego IgG, estos pueden ser detectados por diferentes métodos: fijación de complemento y hemoaglutinación. Estas pruebas usan antígenos género-específico obtenidos por diferentes métodos. Otros métodos actuales son las prueba de ELISA, pero todo resultado positivo por esta prueba necesariamente debe confirmarse con la prueba de MAT (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

a. Prueba de macro aglutinación

En la prueba de aglutinación macroscópica para el diagnóstico de leptospirosis, el antígeno que se usa es una suspensión densa de leptospiras, preparada a partir de un serovar patógeno y que ha sido tratado por métodos físicos con la finalidad que exprese la mayor cantidad de sitios antigénicos de la bacteria y pierda la especificidad del serogrupo. Esta prueba ha sido elaborada y estandarizada y se usa como tamizaje para el diagnóstico serológico de la leptospirosis en humanos y animales (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

b. Prueba de micro aglutinación (MAT)

La prueba MAT determina los anticuerpos aglutinantes en el suero de un paciente mediante la mezcla de varias diluciones de éste con leptospiras vivas o muertas (formalinizadas). Los anticuerpos anti-*Leptospiras* presentes en el suero hacen que las leptospiras se adhieran

unas a otras formando grupos. Este proceso de agrupamiento es llamado aglutinación y es observado usando microscopía de campo oscuro. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG (Terpstra, J., 2008).

Es el método de diagnóstico estándar de referencia internacional para la confirmación serológica de una infección reciente y pasada de leptospiras. Usa antígenos vivos y es de alta sensibilidad y especificidad al serovar infectante.

La batería que se usa 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 serovares más representativos de las especies más frecuentes (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

La prueba se basa en enfrentar diluciones seriadas de suero con igual volumen de una suspensión de leptospiras (antígenos) para luego observarse en microscopio de campo oscuro para estimar el 50% de aglutinación como el punto final de la reacción antígeno-anticuerpo (Terpstra, T., 2008).

La lectura se realiza con microscopio de campo oscuro mediante la observación del grado de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control según la escala (ver anexo 3). El título final estará dado por la dilución del suero que presente 50% de aglutinación, y se reporta como cruces de aglutinación (de 1+ a 4+). Cuando una muestra es negativa, no se presenta aglutinación, observándose la muestra de suero igual al antígeno control (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

El suero se considera positivo cuando se observa una aglutinación de 2+ en una dilución de suero igual o mayor a 1:100. El suero se considera negativo cuando no se observa aglutinación con ningún serovar en una dilución de suero menor a 1:100 (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

Entre las ventajas se mencionan su alta especificidad. Sin embargo, una desventaja importante es la necesidad de facilidades para el cultivo y mantenimiento de paneles de leptospiras vivas. La prueba es técnicamente exigente y consume mucho tiempo, especialmente cuando el panel es grande. Un obvio pero definitivo defecto, es que los anticuerpos no pueden ser detectados cuando la cepa causante no está representada en el

panel o solamente un título bajo es encontrado con un serovar que antigénicamente se parece al serovar ausente, causante de la enfermedad. No encontrar títulos o un bajo título en la MAT no excluye la leptospirosis en estas circunstancias. Nunca es posible estar seguro que el panel esté completo ya que nuevas leptospiras no identificadas pueden causar la enfermedad. Por esta razón es aconsejable incluir una prueba de tamizado género específica tal como el ELISA usando un antígeno ampliamente reactivo (Terpstra, J., 2008).

c. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

1) Anticuerpos IgM

El método de ELISA es usado como una prueba adicional o como una alternativa a la prueba de MAT. Es el método más usado para detectar leptospirosis precoz. Los anticuerpos de tipo IgM son los que se presentan en una reciente infección y éstas se pueden detectar específicamente por ELISA. Se han desarrollado una gran variedad de ELISA y comparándolos con la prueba MAT mostraron una concordancia muy alta. Usando un solo antígeno o pool de antígenos en la prueba de ELISA se pueden determinar anticuerpos IgM frente a varios serovares antigénicamente relacionados. Los sueros positivos deben ser confirmados por MAT (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

Los anticuerpos contra leptospira en el suero, se combinan con el antígeno de leptospira (antígeno total) fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. El suero residual es removido por medio de lavados y luego es añadido el conjugado anti-humano IgM ligado a una enzima (peroxidasa). Posterior a la incubación, los micropocillos son lavados y se añade el sustrato (peróxido de hidrógeno) más un cromógeno. El sustrato es hidrolizado por la enzima y el cromógeno varía de color, la reacción se detiene por la adición de una solución de pare. La intensidad del color se relaciona con la concentración de anticuerpos contra leptospiras presentes en la muestra (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002, p. 27).

2) Anticuerpos IgG

El método ELISA IgG es utilizado para estudios epidemiológicos como una prueba adicional a la prueba MAT. Los anticuerpos IgG son los que se presentan posterior a la presencia de anticuerpos de tipo IgM (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002, p. 31).

Esta prueba se usa como tamizaje para el diagnóstico serológico y epidemiológico de la leptospirosis humana. Cuando los anticuerpos IgG contra leptospira están presentes en el suero, se combinan con el antígeno de leptospira (antígeno total) fijado a la superficie de los micropocillos de poliestireno. El suero residual es removido por medio del lavado, añadiéndole el conjugado anti-humano IgG ligado a una enzima (peroxidasa). Los micropocillos son lavados y coloreados por un substrato (peróxido de hidrógeno) más un cromógeno. El substrato es hidrolizado por la enzima y el cromógeno varía de color, la reacción se detiene por la adición de una solución de pare. La intensidad de color está directamente relacionado a la concentración de anticuerpos contra leptospiras presentes en la muestra (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

d. Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

La inhibición de la aglutinación de los eritrocitos recubiertos con antígeno homólogo es un método sensible y específico para la identificación de pequeñas cantidades de antígeno soluble en la sangre o en otros líquidos de los tejidos (Aguilar, V., 2004).

Se utilizan antígenos preparados a partir de cepas de leptospira para sensibilizar glóbulos rojos fijados previamente con aldehído pirúvico, los glóbulos sensibilizados se agregan a diferentes diluciones del suero del paciente. Cuando la muestra es negativa se observa un botón de glóbulos en el fondo de los pocillos. Aunque este método solo detecta anticuerpos de la clase IgM, característicos de pacientes con infección reciente, es una técnica sencilla, no requiere instrumental complejo y los resultados se obtienen en 4 horas o menos, por lo que se emplea ampliamente, especialmente en lugares que no cuentan con las condiciones e infraestructura necesarias para llevar a cabo el diagnóstico microbiológico. Esta prueba es bastante sensible 97.50 %, específica 98.75% y de gran utilidad para el diagnóstico temprano de la infección por leptospira, pero es laboriosa y no sustituye a la prueba de MAT (Obregón, A., 2004) (López, E., 2005).

e. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El desarrollo de técnicas de biología molecular juega un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco de ADN de leptospiras en muestras clínicas (Cardona, M., *et.al.*, 2008).

Este método presenta la ventaja que se puede confirmar rápidamente el diagnóstico en la fase temprana de la enfermedad antes que los títulos de los anticuerpos alcancen niveles detectables. Entre las desventajas, la PCR requiere de equipos especiales y dedicación de un espacio de laboratorio, al igual que personal altamente calificado, puede dar resultados falsos positivos por la presencia de mínimas cantidades de ADN extraño que puede contaminar el área de trabajo. También puede dar resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores en los materiales clínicos que están siendo examinados (Terpstra, T., 2008).

H. Muestras clínicas

Se pueden utilizar distintos tipos de muestra para realizar el aislamiento de leptospiras. Tanto la obtención, el transporte como la conservación deben ser realizados correctamente, ya que estos procedimientos son de mucha importancia para que el laboratorio contribuya eficientemente en el diagnóstico bacteriológico y serológico de la enfermedad (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

El tipo de muestra clínica depende de la fase de infección; las leptospira usualmente circulan en la sangre del paciente por aproximadamente 10 días después de la aparición de la enfermedad. También aparecen en otros fluidos corporales, tales como la orina y LCR. Después de éste período penetran a órganos internos. Títulos detectables de anticuerpos aparecen en la sangre 5-10 días después de la aparición de la enfermedad aunque algunas veces pueden tardar más, especialmente si se implementó tratamiento con antibióticos (ver anexo 4) (Terpstra, J., 2008).

1. Tipos de Muestras

a. Sangre con heparina

Se utiliza heparina para evitar la coagulación y para cultivo en los primeros 10 días. El cultivo de la sangre después de los 10 días de la aparición de la enfermedad no es recomendado, ya que las leptospiras han desaparecido en su mayoría de la sangre y los anticuerpos habrán comenzando a ser detectables en el suero permitiendo el serodiagnóstico. Muestras para cultivo debe ser guardadas y transportadas a temperatura

ambiente, debido a que las bajas temperaturas son perjudiciales para las leptospiras patógenas (Terpstra, J., 2008).

La muestra para el hemocultivo debe obtenerse durante el período febril agudo de la fase septicémica (entre el primer y séptimo día), antes del inicio de la terapia antibiótica (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

b. Sangre coagulada o suero para serología

Deben obtenerse preferiblemente dos muestras con un intervalo de varios días en base a la fecha de aparición o inicio de la enfermedad y el tiempo probable de seroconversión. El análisis de muestras pareadas es necesario para detectar un incremento en los títulos entre ambas muestras o la seroconversión y por tanto para confirmar el diagnóstico de la leptospirosis. Un resultado serológico negativo en la fase aguda de la enfermedad no excluye la leptospirosis (Terpstra, J., 2008).

c. Orina para cultivo

Las leptospiras mueren rápidamente en la orina por lo que el uso de orina para cultivo puede ser valioso solamente cuando es posible obtener una muestra limpia que pueda ser inoculada en un medio de cultivo apropiado en no más de 2 horas después de haber sido recolectada. La supervivencia de las leptospira en la orina ácida puede incrementarse neutralizando la orina (Terpstra, J., 2008).

La leptospiruria es debido a la colonización de los túbulos renales y se presenta a partir de los 14 a 28 días después de la infección. En pacientes con dieta alcalina y tratados con antibióticos en este estado es limitado. Se debe tomar la muestra de orina asépticamente, por colección del chorro medio o catéter (en pacientes hospitalizados). Para la alcalinización de la orina, el paciente debe beber la noche anterior un vaso de agua con una cucharadita de aproximadamente 1 g de bicarbonato de sodio. Una alternativa es tomar una pastilla de acetazolamida en el desayuno del día anterior a la toma de muestra. La orina es un líquido biológico donde proliferan muy fácilmente las bacterias contaminantes, por lo cual la muestra debe ser procesada dentro de las 2 horas después de haber sido obtenida. Es necesario protegerla de la luz y mantenerla a temperatura ambiente. Se puede refrigerar a

4°C hasta su procesamiento, (máximo hasta 6 horas) pero no es lo adecuado (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

d. LCR y dializado para cultivo.

En pacientes con compromiso meníngeo se puede observar y aislar leptospiras de LCR entre los 4 a 10 días después de iniciada la enfermedad. El LCR es de fácil contaminación bacteriana, por ello debe procesarse inmediatamente, como máximo a los 4 días de colectada la muestra. La obtención de la muestra la debe realizar el médico de acuerdo a los procedimientos normativos de la institución (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

e. Muestras postmortem

Es importante coleccionar muestras del mayor número de órganos posibles, incluyendo cerebro, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, pulmones, riñones, hígado, páncreas y corazón, y si es posible, sangre del corazón, para serología. Los especímenes coleccionados dependerán de los recursos disponibles y de las restricciones culturales que puedan existir en la sociedad. Las muestras postmortem deben ser obtenidos asépticamente y tan pronto como sea posible después de la muerte; deben ser inoculadas en el medio de cultivo lo más rápido que se pueda. Las muestras deben ser guardadas y transportadas a + 4 °C, previniendo la autólisis de las células a 4 °C y una consecuente disminución del pH, lo que compensará la reducción en la viabilidad de las leptospiras patógenas a bajas temperaturas. Tejidos frescos o fijados pueden ser también examinados para la presencia de leptospiras usando anticuerpos marcados con marcadores de fluorescencia. Además, otros métodos como tinción con plata, inmunotinción e inmunohistoquímica pueden ser de utilidad pero son técnicamente demandantes y requieren de una experiencia considerable para su correcta interpretación. Se debe realizar la toma de la muestra de órganos (riñón, hígado y cerebro) en pacientes fallecidos con sospecha de leptospirosis. Los órganos, son excelente medio de cultivo para la proliferación bacteriana. Por ello, la muestra debe ser procesada dentro de las 4 horas de su obtención, manteniéndola protegida de la luz y a temperatura ambiente o en refrigeración a 4-8°C (máximo 6 horas) hasta su procesamiento (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002; Terpstra, J., 2008).

2. Envío y transporte de la muestra

a. Condiciones específicas

Las muestras deben ser mantenidas y conservadas con sus características lo más cercanas a su estado originario, debiendo evitarse temperaturas extremas, pH extremos o desecamientos excesivos. Todas las muestras deben ser enviadas al laboratorio lo más pronto posible (ver anexo 5).

En caso sea necesario transferir las muestras a otros laboratorios, los responsables de su envío deben elegir el sistema de embalaje apropiado para la conservación de las muestras durante el tiempo que demanda el transporte hasta llegar al laboratorio (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

b. Procedimiento

Para transportar las muestras al laboratorio deben colocarse en un envase secundario, de material resistente a roturas o filtraciones.

I. Medios de cultivo

Las leptospiras son bacterias aerobias estrictas, poseen oxidasa, catalasa y peroxidasa. Los requerimientos para el crecimiento de las leptospiras son particulares pero no exigentes. Los únicos compuestos orgánicos que se conocen como nutrientes esenciales y que ayudan a la multiplicación y crecimiento de leptospiras *in vitro* son las vitaminas B1 (tiamina) y B12 (cobalamina) y ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga (>C15) constituyen tanto la fuente de energía como de carbono y son requeridos como fuente de lípidos celulares debido a que las leptospiras no pueden sintetizar ácidos grasos desde el principio. Los ácidos grasos libres, debido a su toxicidad inherente, deben ofrecerse a las leptospiras como un compuesto con albúmina. Los carbohidratos no son fuentes adecuadas de energía ni de carbono. Si bien los aminoácidos se utilizan en forma limitada, los mismos no puede satisfacer los requerimientos de nitrógeno de estos organismos (Terpstra, J., 2008).

El piruvato, nutriente no esencial, ayuda al inicio del crecimiento de leptospiras de difícil desarrollo. En contraste con la mayoría de bacterias; las leptospiras no usan fuentes

externas de bases de pirimidina para incorporarlas dentro de su ADN o ARN. Por este motivo, son resistentes a la actividad antibacteriana del 5-fluoracilo, análogo de la pirimidina. En consecuencia, este compuesto es usado en medios selectivos, para aislar las leptospiras a partir de fuentes contaminadas (Terpstra, J., 2008).

1. Tipos de medios de cultivo

III. Medio tradicional conteniendo aproximadamente de 8 a 10% de suero de conejo (Stuart, Korhof, Fletcher, Vervoort, Schüffner). El suero de conejo contiene la más alta concentración de vitamina B12 ligada, la cual es esencial para la multiplicación de las leptospiras. El título de aglutininas anti *Leptospira* en suero de conejo es usualmente bajo comparado con el encontrado en otros animales pero, igualmente, los sueros deben ser revisados para determinar presencia de anticuerpos. Los medios de Schüffner y Korhof tienen la desventaja de contener fosfato el cual puede precipitar, lo que no es deseable en la prueba de MAT (Terpstra, 2008).

IV. El medio Tween80/albúmina sérica de bovino (BSA) o Ellinghausen & McCullough y su modificación por Johnson & Harris (EMJH), es considerado un medio superior a otros medios de cultivo tradicionales que contienen suero de conejo como constituyente esencial. Los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a concentraciones relativamente bajas. La albúmina permite el crecimiento de las células en mayores niveles de Tween 80 dado su carácter destoxicante y estabilizador, al ser capaz de unir a su estructura los ácidos grasos libres en el medio de cultivo y de esta forma neutralizar su actividad citolítica.

Este medio proteico es actualmente el más utilizado para el aislamiento y cultivo de cepas de leptospira, en ocasiones en grandes volúmenes durante la obtención de inóculos para la producción de antígenos vacunales en medio libre de proteínas. Sin embargo, el alto costo de sus componentes, en particular la albúmina sérica bovina, incrementa significativamente los costos de producción de vacunas y las investigaciones básicas de laboratorio (Terpstra, J., 2008).

- V. Medios enriquecidos: empleados para intensificar el crecimiento de leptospiras con requerimientos nutricionales complejos, tales como el serovar *Hardjo*. Los medios pueden enriquecerse agregando suero (p.ej. 1-4% de suero fetal bovino (FCS) y suero de conejo u otros ingredientes tales como hidrolizado de lactoalbúmina, superóxido dismutasa y piruvato. El medio EMJH es frecuentemente enriquecido agregando 1% de suero de conejo y 1% de FCS. (Terpstra, J., 2008).
- VI. Medio selectivo con 5-fluoracilo (200 µg/mL) (y/u otro antimicrobiano como neomicina (300 µg/mL), ácido nalidíxico, actidione, sulfadiazol, rifampicina, anfotericina B). Éstos aditivos pueden suprimir el crecimiento de bacterias contaminantes en muestras clínicas no estériles, sin afectar las leptospiras, pero pueden causar una reducción en el crecimiento de las leptospiras (Terpstra, J., 2008). Esto es particularmente cierto con el sulfadiazol. Por esto se emplean en los primoaislamientos a partir de muestras de orina y tejidos (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

2. Estado del medio

a. Estado líquido

Los medios líquidos son esenciales para el aislamiento de leptospiras y para cultivos que van a ser usados como antígenos en pruebas de aglutinación. Las partículas de agar presentes en el medio semisólido interfieren con la interpretación de estas pruebas. El desarrollo de las leptospiras en el medio líquido, se evidencia por la turbidez, aunque algunas veces lo sea por una apariencia granular en el fondo de los tubos los cuales están creciendo; ambas pueden verse a simple vista pero debe confirmarse por la observación en el microscopio (Terpstra, J., 2008).

i. Medio EMJH

El medio EMJH es un medio líquido que permite el desarrollo de la leptospira en forma abundante y es útil al igual que los otros medios en la obtención de antígenos (Caballero, A., y Romero, J., 1997, p.12).

Se prepara mezclando un volumen de suplemento de ácidos grasos y albúmina (SAGA) y nueve volúmenes de medio basal. Es esencial usar agua destilada estéril (autoclaveada) para el SAGA, porque éste solo puede ser esterilizado por filtración y las leptospiras, incluyendo las saprófitas contaminantes pueden pasar a través del filtro (Terpstra, J., 2008).

Se pueden cultivar en medios artificiales ricos en suero de conejo a 10%, enriquecido con ácidos grasos de cadena larga como principal requerimiento nutritivo. Se desarrollan lentamente en medio de albúmina bovina a 1% y Tween-80, no se detecta crecimiento antes de los 4 a 6 días. La temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 30° a pH 7.4. El período de incubación es de 6 a 14 días. El pase de las cepas debe realizarse cada 15 a 20 días (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

ii. Medio Korthof-Babudieri

Este es un medio líquido apropiado para el cultivo de leptospiras. Su formulación es una modificación del medio original de Korthof. Se prepara agregando suero de conejo al medio basal de Korthof-Babudieri, siendo utilizado en el Centro Nacional de Leptospirosis en Roma para mantener la colección de cepas de leptospira. Su formulación requiere Peptona Proteosa No. 3-Difco[®] (en lugar de Peptona Witte) y vitamina B3 (nicotinamida) en lugar de vitamina B1, pero no requiere CaCl₂. Es esencial usar agua destilada estéril (autoclaveada), porque la preparación final puede sólo ser filtrada y las leptospiras, incluyendo las saprófitas contaminantes, pueden pasar a través del filtro (Terpstra, J., 2008).

b. Estado semisólido

Los medios semisólidos contienen 0.1 a 0.5% de agar (p/v). Tales medios son de preferencia para el aislamiento de varias cepas y para el mantenimiento a mediano plazo (hasta varios años). El crecimiento se inicia fácilmente en estos medios y usualmente es más fácil su visualización en forma de uno o más anillos densos de crecimiento, varios milímetros debajo de la superficie del medio. La ausencia de anillos sin embargo, no necesariamente significa ausencia de leptospiras. Medios semisólidos en tubos con tapa de rosca son usados, por lo general para el mantenimiento de cultivo de reserva, que son

conservados a temperatura ambiente y preferiblemente, son transferidos cada tres meses a medios frescos (Terpstra, J., 2008).

i. Medio Fletcher®

Este es un medio semisólido, apropiado para cultivar leptospiras y mantenerlas viables por un período largo de tiempo sin subcultivar. Este medio se prepara agregando suero de conejo al medio base de Fletcher® (Terpstra, J., 2008).

c. Estado sólido

Los medios sólidos contienen 0.8 a 1.3% de agar (p/v) y son dispuestos en tubos o en placas. Cuanto más baja sea la concentración de agar, mayor será la tendencia de las leptospiras a ocupar toda la placa y crecer a través de todo el medio; con una concentración alta de agar, las colonias son más pequeñas. El crecimiento ocurre bajo la superficie. Las placas deben ser selladas para crear una cámara húmeda y prevenir así la deshidratación. Este método puede usarse para el aislamiento de cepas a partir de materiales naturalmente contaminados o cultivos contaminados, o para clonar leptospiras de cultivos mixtos de leptospira. En 1% de agar las colonias crecen bajo la superficie y son visibles después de 7 a 14 días para la mayoría de los serovares. La morfología de la colonia de una cepa móvil cambia con el tiempo. La morfología de las colonias bajo la superficie no se ha demostrado una característica útil para diferenciar entre las distintas cepas de leptospira (Terpstra, J., 2008).

Los medios de cultivo para leptospira más utilizados son los de Fletcher, Stuart, Korthof, Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) y el medio de albúmina bovina polisorbato (Tween 80) (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

J. Aislamiento de leptospiras

El aislamiento es muy importante no sólo para confirmar la presencia del agente sino también para la obtención de material que permita identificar el serovar al que pertenece la cepa implicada. Se debe llevar a cabo en las muestras donde se observó microscópicamente la presencia de leptospiras y se usan medios de cultivo sintéticos como los de EMJH, Fletcher, Korthof o Stuart (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

El aislamiento de leptospiras depende del material elegido y la etapa de la enfermedad. Durante la fase leptospirémica (desde el día 1 hasta alrededor del día 10 después de la presentación de los síntomas) el material más apropiado es la sangre (Terpstra, J., 2008).

1. Sangre

La sangre debe ser cultivada dentro de los 10 primeros días de la enfermedad y antes de que se suministren antibióticos. Se obtiene sangre venosa mediante una técnica aséptica, al lado mismo de la cama del paciente, se la inocula en botellas de cultivo para sangre en varios tubos, cada uno conteniendo 5mL de medio apropiado. Inóculos grandes pueden inhibir el crecimiento de las leptospiras. Los cultivos deben ser incubados a 30°C y revisados regularmente por un período de 4 a 6 meses (Terpstra, J., 2008).

2. LCR

Las leptospiras se deben observar con microscopio de campo oscuro y aislarse por cultivo inoculando 0.5mL de líquido cefalorraquídeo en 5mL de cultivo semisólido durante las primeras semanas de la enfermedad (Terpstra, J., 2008).

3. Orina

Durante la fase de leptospiruria, caracterizada por un incremento en la concentración de anticuerpos, (una semana después de la presentación de los síntomas) la orina y el cortex renal *post mortem* son los inóculos más apropiados para el aislamiento de leptospiras en humanos. Animales silvestres y domésticos en el estado de portadores pueden liberar leptospiras intermitentemente por muchos años o incluso por toda la vida, durante el cual las leptospiras pueden ser aisladas de su orina o tejido renal (Terpstra, J., 2008).

Se obtiene orina fresca de la mitad del chorro y se inocula inmediatamente. Una gota de orina no diluida se inocula en el primer tubo conteniendo 5mL de medio de cultivo. Alternativamente, la muestra de orina puede centrifugarse (30 min a 1600g o 1 minuto a 10000g) y el botón resuspendirse en medio, después de lo cual se realizan diluciones seriadas 10x en 1 ó 2 tubos adicionales. El cultivo se procesa igual que el hemocultivo (Terpstra, J., 2008).

Debido a que la orina es ácida, lo que decrece la viabilidad de las leptospiras, esta debe ser inoculada en el medio de cultivo dentro de las 2 horas después de ser excretada. Se ha reportado un incremento de la viabilidad en muestras de orina neutralizadas con bicarbonato de sodio y con el uso de una solución tamponada de seroalbúmina bovina fosfato (BSA) (Terpstra, J., 2008).

El medio conteniendo 5- fluoracilo o antibióticos apropiados que inhiben el crecimiento de contaminantes bacterianos y no afectan las leptospiras pueden ser útiles para la reducción de la contaminación de cultivos de orina (Terpstra, J., 2008).

4. Material *post mortem*

En casos fatales de leptospirosis de humanos y animales, los organismos pueden ser cultivados a partir de muestras *post mortem* maceradas provenientes de varios tejidos. Las leptospiras también pueden ser aisladas exitosamente de fetos de animales abortados. Un trozo de tejido se coloca en una jeringa estéril sin aguja y se exprime (colocando presión en el émbolo) a través del orificio al final de la jeringa hacia un tubo conteniendo medio de cultivo. Alternativamente, una parte del hígado o riñón se colocan en un mortero, junto con tampón PBS, pH 7.2 o en medio de cultivo, y se macera, y la suspensión resultante se inocula en el medio de cultivo (Terpstra, J., 2008).

5. Aislamiento de leptospiras en animales de laboratorio

La muestra clínica sospechosa (sedimento de orina, sangre, etc) se inocula por vía intraperitoneal en un hámster de 50 a 60 g o en un cobayo de no más de 150 g. Después de 3 a 6 días de la infección, el animal debe presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad que pueden consistir en baja de peso, pelo erizado, fiebre, diarrea, daño neurológico y un importante ataque al estado general. Se inyectan por vía intraperitoneal 2 mL de solución salina amortiguada al animal y con la misma jeringa se toma una muestra del exudado. Se hace una preparación entre porta y cubreobjetos y se observa al microscopio de campo oscuro. Si hay abundantes leptospiras se sacrifica al animal. En condiciones de esterilidad, se obtienen fragmentos de hígado, riñones y pulmones de aproximadamente un gramo de peso y se manejan exactamente igual como fue descrito

para la muestra de órganos y tejidos en la sección precedente (Caballero, S., y Romero, J., 1997).

K. Identificación

1. Identificación de leptospiras patógenas

Las leptospiras pueden caracterizarse por sus características fenotípicas, como el crecimiento a 13, 30 y 37°C, crecimiento en la presencia de 8-azaguanina o CaSO₄, actividad de la lipasa y la apariencia de formas esféricas con la presencia de NaCl 1M. Para diferenciar entre las leptospiras patógenas y no patógenas, el método más apropiado es el crecimiento en diferentes temperaturas y la 8-azaguanina (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

2. Serotipificación de leptospiras patógenas

El serovar es una unidad taxonómica, el serovar tipo son subgrupos determinados por el análisis genómico. El serogrupo no tiene status taxonómico y son convenientes para su aplicación en el manejo de agrupación de los serovares en el laboratorio (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002).

El método convencional para la serotipificación es la técnica del análisis de inmunoabsorción de la estructura antigénica de leptospiras. Se considera que dos cepas aisladas pertenecen a diferentes serovares, si después de la absorción cruzada con adecuada cantidad de antígeno heterólogo, 10% o más del título homólogo permanecen regularmente en al menos uno de los antisueros en pruebas repetidas (Céspedes, M., y Araujo, M., 2002). Otras alternativas para la tipificación, son mediante el uso de anticuerpos monoclonales, métodos moleculares como Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), PCR, Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), DNA fingerprinting y análisis de factor (Céspedes, M., 2005).

Reacciones antígeno-anticuerpo, como en la MAT, son utilizadas para identificar cepas. La estructura antigénica de las leptospiras es compleja, el serovar está representado por una cepa de referencia (Terpstra, J., 2008).

Los serogrupos están integrados por serovares que presentan aglutinación cruzada con títulos que van de moderados a altos. Los serogrupos no pueden ser definidos con precisión y no tienen un estatus taxonómico oficial pero cumplen con el propósito práctico de agrupar cepas sobre la base de su semejanza antigénica (Terpstra, J., 2008).

La seroagrupación es necesaria debido a la existencia de más de 200 cepas de referencia que, por razones prácticas, no pueden ser usadas o evaluadas individualmente en experimentos de serotipificación. Debido a que no existe una definición exacta de serogrupo y a que las diferencias entre ellos son muchas veces borrosas, en el pasado, algunos serovares han sido movidos de un serogrupo a otro (Terpstra, J., 2008).

La unidad sistemática básica para la clasificación es el serovar. El mismo puede ser determinado mediante la llamada prueba de absorción de aglutinación cruzada usando antisuero de conejo. Esta prueba es complicada y laboriosa, por lo que no es apropiada cuando se necesitan resultados rápidamente y es utilizada solamente en unos pocos laboratorios especializados (Terpstra, J., 2008).

Varios métodos alternativos de tipificación han sido desarrollados, por ejemplo, existen dos métodos serológicos basados en el reconocimiento de las características antigénicas de las leptospiras que utilizan anticuerpos monoclonales o “suero factor”. Otros métodos se basan en el examen de las diferencias en el ADN de las leptospiras y sus resultados son comparables en alguna medida con aquellos de la tipificación de serovares (Terpstra, J., 2008).

El método convencional de serotipificación de cepas desconocidas involucra los dos procedimientos siguientes:

a. Determinación del serogrupo

Una suspensión de antígeno de una cepa desconocida es usada en titulaciones empleando la MAT, con un rango de antisuero de conejo que represente todos los serogrupos conocidos para determinar el estatus de serogrupo de la cepa desconocida. Este procedimiento también permite investigar la relación entre la cepa desconocida y otras cepas de referencia

dentro del mismo serogrupo. Un serovar desconocido puede ser aglutinado por uno o más antisueros (Terpstra, J., 2008).

1) Prueba de aglutinación-absorción cruzada (CAAT)

La CAAT es la prueba básica para la caracterización de las leptospiras en el nivel de serovar. El taxón básico es el serovar, que está representado por una cepa de referencia. Se lleva a cabo la primera prueba de aglutinación cruzada para seleccionar los serovares que se incluirán en el CAAT. En primer lugar, el serogrupo o grupos a los que pertenecen las cepas desconocidas se determinan mediante la realización de MAT con la cepa desconocida de antígeno y un panel de conejo que es representativo de todos los serogrupos patógenos. (Hartskeerl, R., 2006).

La cepa podría ser asignada a más de un serogrupo. Algunos de los serogrupos se han hecho tan extendidos que han debido ser reorganizados. Dos ejemplos son la división del grupo original *Hebdomadis* en el grupo *Hebdomadis*, *Mini* y el serogrupo *Sejroe* y la división del grupo original en *Autumnalis* en grupo *autumnalis*, *djasiman* y serogrupos de *Luisiana*. Así los acuerdos en serogrupos tienen sus limitaciones (Hartskeerl, R., 2006).

En segundo lugar, se seleccionan los serovares candidatos/cepas con el serogrupo(s) positivos que se incluirán en el CAAT. Esto se hace mediante la realización de MAT de la cepa desconocida con el antisuero de conejo contra varios serotipos/cepas dentro de serogrupo(s) positivos. Si es necesario un antisuero contra la cepa desconocida se pueden producir en un conejo y probado en el MAT con todos serovares de referencia/cepas que pertenecen a los grupos positivos. En la aglutinación cruzada los títulos son reexpresados como porcentajes del título recíproco de la cepa homóloga de antisueros de grupos positivos con la cepa desconocida y viceversa (Hartskeerl, R., 2006).

2) Anticuerpos monoclonales

Se han preparado anticuerpos monoclonales de conejo que aglutinan leptospiras y los serovares pueden ser identificados con base en patrones característicos de aglutinación. Preparar anticuerpos monoclonales es difícil y toma tiempo, pero usarlos en la MAT para serotipificar es fácil y da resultados rápidos. Actualmente están disponibles anticuerpos

monoclonales para tipificar cerca de la mitad de los serovares más comunes actualmente conocidos (Terpstra, J., 2008).

3) Anticuerpos policlonales

Son mezcla de anticuerpos que van dirigidos a diferentes determinantes antigénicos. En las técnicas inmunohistoquímicas, para la localización celular o tisular de antígenos, se emplean anticuerpos desarrollados frente a diferentes determinantes antigénicos de un mismo antígeno. Estos anticuerpos son producidos en diferentes especies de animales (conejo, cabra, cerdo, etc.) por inmunización activa con antígenos altamente purificados. De dichos animales se puede utilizar el suero total, la fracción inmunoglobulínica, el componente inmunoglobulínico específico o incluso los fragmentos Fab y (Fab')₂ con lo que se elimina la posibilidad de unión específica e inespecífica de los anticuerpos (Brio, M., 1995).

Los antisueros policlonales utilizados para el serotipaje de cepas de leptospira deben caracterizarse por un alto nivel de aglutininas específicas a un serogrupo o serovar determinado y una baja reactividad cruzada frente al resto de las serovariedades. La clasificación serológica mediante la técnica de microaglutinación con el empleo de antisueros policlonales de conejo sigue siendo el método más utilizado a pesar de ser laborioso y limitado para la clasificación hasta serovar, sino se dispone de una batería de anticuerpos monoclonales (González, 2002).

4) Suero factor

Es suero de conejo, convencionalmente preparado, que tiene una alta especificidad después de ser absorbidos por varias leptospiras. Paneles de “suero factor” pueden ser usados de manera similar a los anticuerpos monoclonales para identificar rápidamente las cepas a nivel de serovar. La preparación consume tiempo y la preparación de lotes no siempre conduce a resultados reproducibles (Terpstra, J., 2008).

5) Tipificación de ADN

El ADN de cada organismo viviente es único para ese organismo. Varios métodos de análisis de ADN están disponibles. El ADN puede ser procesado y fragmentos de ADN o

productos obtenidos mediante su procesamiento pueden ser separados sobre geles, dando patrones que son, por lo general, característicos de las cepas de leptospiras. Los métodos basados en ADN suelen dar resultados útiles pero algunos son relativamente complicados y requieren de habilidad técnica y equipamiento especializado (Terpstra, J., 2008).

La elección del método depende de las facilidades técnicas y la experiencia del personal disponible aunque algunos métodos no son claramente apropiados para su uso en laboratorios de rutina. Cualquiera que sea el método de tipificación usado es necesaria la comparación con las cepas de referencia. Los aislamientos locales pueden exhibir características únicas que difieran de aquellas de las cepas de referencia, lo cual es importante desde el punto de vista epidemiológico para la identificación de cepas locales. Debido a que actualmente no hay métodos de tipificación disponibles que den siempre resultados satisfactorios, los laboratorios especializados y centros de expertos suelen usar una combinación de métodos serológicos y genéticos para caracterizar un aislamiento (Terpstra, J., 2008).

L. Métodos complementarios de apoyo para la reproducción, conservación, purificación y recuperación de cepas de leptospiras

1. Cultivos para estudios rutinarios

Las cepas de leptospiras bien caracterizadas que van a servir para estudios rutinarios se siembran cada 15 ó 20 días en tubos de 150 x 16 mm con tapón de rosca que contengan 10ml de un medio líquido como el EMJH. Los pases se realizan sembrando 2ml de cultivo en el tubo con medio recién preparado. Periódicamente hay que comprobar por microscopía de campo oscuro si la cepa de leptospira no se encuentra contaminada. Si el porcentaje de formas degeneradas del serovar en estudio es muy alto y esto persiste en varios pases, se recomienda purificar las leptospiras y hacerlas virulentas pasándolas a través de un animal de laboratorio (Caballero, A., Romero, J., 1997).

2. Conservación de cepas patrón

Antes de sembrar las leptospiras se examinan en el microscopio de campo oscuro, para confirmar la presencia de microorganismos viables y la ausencia de contaminación. Las cepas se siembran en medio de cultivo semisólido de Fletcher, contenido en tubos de 13 x

100mm en cantidad de 5 a 6mL. Los cultivos se incuban a 28°C y después de 7 días se observan en un microscopio de campo oscuro para comprobar el desarrollo. En estas condiciones las leptospiras se mantienen viables hasta por tres meses. Los cultivos se conservan a temperatura ambiente y en un sitio obscuro. También se pueden conservar las cepas indefinidamente en tanques de nitrógeno líquido, contenidas en viales especiales (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

3. Purificación de cepas en cultivos contaminados

Uno de los principales problemas que se plantean para el crecimiento y conservación de los cultivos de leptospiras es mantenerlos libres de microorganismos contaminantes, ya que estos con frecuencia acidifican el medio de cultivo y provocan la muerte de los treponemas. Existen varios métodos para purificar los cultivos, los más seguros son los siguientes:

a. Usando membranas Millipore®

Las leptospiras atraviesan filtros con poros de 0.22 a 0.45µm lo cual puede utilizarse para su purificación mediante el uso de membranas en el cual las leptospiras son separadas de otros microorganismos al atravesar los poros de la membrana (Caballero, A., y Romero J., 1997).

b. Inoculación de animales de laboratorio

Se basa en el hecho de que estos microorganismos invaden rápidamente el torrente sanguíneo cuando se inoculan por vía intraperitoneal, mientras que las otras bacterias necesitan más tiempo para efectuar el mismo proceso (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

Los hamster y los cobayos son los animales de laboratorio más comúnmente empleados para la inoculación experimental con leptospiras, a estos animales debe hacerseles cada cierto tiempo un control por punción cardíaca, siembra y examen serológico para tener la seguridad que no están infectados (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

M. Tratamiento

Tomando en cuenta que la leptospirosis humana tienen una evolución clínica sumamente variable y suele ser una enfermedad fatal cuando se tarda en su reconocimiento temprano,

resulta difícil evaluar con precisión la eficacia del tratamiento antimicrobiano, es importante tener en consideración: antibiótico, soporte respiratorio y cardiovascular, diálisis (peritoneal o hemodiálisis) y transfusión sanguínea en casos muy graves (Sandow, K., 2005).

El tratamiento con antibióticos efectivos debe ser iniciado tan pronto como se sospeche un diagnóstico de leptospirosis y preferiblemente antes del quinto día de la aparición de la enfermedad. Los beneficios de los antibióticos después del quinto día de la enfermedad son discutibles. Sin embargo, la mayoría de los médicos trata con antibióticos independientemente de la fecha de aparición de los síntomas. Los médicos nunca deben esperar los resultados del laboratorio para empezar el tratamiento con antibióticos debido a que las pruebas serológicas no son positivas hasta cerca de la semana después de la aparición de los síntomas y los cultivos pueden no resultar positivos hasta después de varias semanas (Terpstra, J., 2008).

La penicilina endovenosa, oxitetraciclinas y eritromicina administradas en dosis de acuerdo con la severidad del cuadro clínico son los antibióticos que mejor resultados han dado en el tratamiento de la leptospirosis. El manejo de casos moderados a graves debe ser de forma hospitalaria (Caballero, A., y Romero, J., 1997).

Experimentos *in vitro* y con animales han demostrado que las leptospiras son sensibles a un amplio rango de antibióticos pero hay, desafortunadamente una limitada experiencia clínica con muchos de los nuevos antibióticos (Terpstra, J., 2008).

N. Medidas de prevención

Por causa del gran número de serovares y fuentes de infección y las amplias diferencias en las condiciones de transmisión, el control de la leptospirosis es complicado y dependerá de las condiciones locales. El control puede ser alcanzado interviniendo el reservorio o reduciendo la infección en las poblaciones de animales reservorio tales como perros o ganado. El control de animales silvestres puede ser difícil. Las medidas preventivas deben estar basadas en el conocimiento de los grupos particularmente vulnerables a la infección y los factores epidemiológicos locales. La prevención y control deben dirigirse a:

1. La fuente de infección

Es importante establecer las especies animales que constituyen la fuente de infección en un área particular, pues las medidas de control pueden entonces ser orientadas o dirigidas a las especies de animales actúan como reservorios locales (Terpstra, J., 2008).

Tales medidas incluyen:

- a. La reducción de una determinada población animal que actúa como reservorio.
- b. La separación de los reservorios animales de las viviendas humanas a través de cercas y mallas.
- c. La inmunización de perros y ganado: los animales pueden ser inmunizados con vacunas que consisten en suspensiones de leptospiras muertas; la protección es serovar específica. La inmunización puede prevenir la enfermedad pero no siempre impide la evolución al estado de portador crónico con manutención de las leptospiras en los riñones.
- d. La eliminación de la basura y mantenimiento de la limpieza en las áreas alrededor de las viviendas humanas: pequeñas áreas, tales como pisos, pueden ser limpiadas y desinfectadas, pero la desinfección de grandes áreas naturales tales como lagos y ríos no es posible. Las leptospiras mueren rápidamente con desinfectantes y con la desecación; sin embargo, las leptospiras eliminadas en la orina animal pueden sobrevivir en el ambiente desde semanas a meses bajo condiciones apropiadas, como suelos húmedos o aguas superficiales con un pH neutro o levemente alcalino.
- e. No dejar alimentos no almacenados, especialmente en áreas recreativas o donde las ratas pueden estar presentes.

(Terpstra, J., 2008).

2. La ruta de transmisión entre la fuente de infección y el huésped humano

Es importante conocer los factores de riesgo para la infección humana y, si es posible, la fuente de infección. El riesgo de infección es minimizado, evitando el contacto con orina animal, animales infectados o un ambiente contaminado. Donde sea apropiado, debe usarse

ropa protectora y cubrir las heridas con ropa impermeable para reducir la probabilidad de infección, especialmente cuando existe la posibilidad de exposición, por ejemplo, exposición ocupacional o recreativa (Terpstra, J., 2008).

3. La infección o la enfermedad en el huésped humano.

La inmunización por medio de vacunas parece proveer un cierto grado de protección. Las vacunas son en principio, una suspensión de leptospiras muertas y la protección es principalmente serovar específica. En aquellas áreas donde muchos serovares están causando leptospirosis, la vacuna debe incluir los diferentes serovares que circulan localmente. La información sobre vacunas humanas es limitada y están disponibles solo en ciertos países. Se ha reportado que las vacunas proporcionan algún grado de protección y esto es particularmente importante en áreas en donde ocurren las formas más serias de leptospirosis, donde el acceso al servicio médico es limitado o en donde es probable que exista demora para recibir el tratamiento. Sin embargo, la protección es, relativamente, de corta duración siendo necesario el refuerzo a intervalos regulares para mantener los títulos de anticuerpos protectores. Las vacunas también pueden producir efectos colaterales como dolor en el sitio de inoculación y fiebre (Terpstra, J., 2008).

IV. JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por leptospiras de las especies consideradas patógenas, que se transmite directa o indirectamente de los animales a los seres humanos por lo que es una zoonosis. La transmisión de humano a humano ocurre muy raramente. La leptospirosis ocurre en todo el mundo, pero principalmente en áreas tropicales y subtropicales con altos índices de precipitación pluvial. La enfermedad se encuentra en cualquier lugar en donde los humanos están en contacto con la orina de animales infectados o un ambiente contaminado con orina (OMS, 2008).

En 1980 se confirmó el primer caso de leptospirosis en el país por Torres M. y la identificación del agente causal (Anzuetto, A., Torres, M., y Bran, J., 1982), Estudios recientes en Guatemala han demostrado una alta seroprevalencia en el área rural del 51.8% (Zelaya, B., et al., 2007) y en asentamientos humanos en el área periurbana de la ciudad de Guatemala, con una seroprevalencia de 30.25% (García, M., Pérez, A., y Herrera, M., 2011).

Sin embargo, no se ha trabajado en el aislamiento de *Leptospira* spp. en animales ni en humanos, lo cual es de importancia ya que las manifestaciones clínicas de la enfermedad se confunden con otras enfermedades febriles como dengue, influenza y malaria y con frecuencia dependen del serovar invasor, por lo que es necesario para la confirmación del diagnóstico (Echeverría, M., Lopez, M., Pérez, J., Pumarola, T., Cantera, E., et al., 2000).

La técnica de aislamiento es la única que permite identificar las serovariedades circulantes en una determinada área geográfica, lo que es de gran ayuda para confirmar las serovariedades detectadas con la prueba MAT y mejorar su especificidad, al contar con cepas nativas del lugar (Echeverría, M., 2000).

V. OBJETIVOS

A. General

Demostrar la presencia de *Leptospira* spp. en muestras de sangre de pacientes guatemaltecos del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad Capital, a través de su aislamiento e identificación.

B. Específicos

- 1 Evidenciar la presencia de *Leptospira* spp. en muestras de sangre de los pacientes sospechosos de leptospirosis del Hospital General San Juan de Dios, a través de su aislamiento.
- 2 Determinar los serogrupos de *Leptospira* spp. aisladas de muestras de los paciente por medio de la prueba MAT.
- 3 Establecer la frecuencia de leptospiras y serovares en muestras clínicas de pacientes con leptospirosis del Hospital General San Juan de Dios, a través de la prueba MAT.
- 4 Establecer los principales síntomas y signos asociados a la infección de leptospirosis, en los pacientes a los que se les aisle leptospiras patógenas.

VI. HIPOTESIS

En este estudio no es necesario el planteamiento de una hipótesis ya que es de tipo descriptivo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra de trabajo

1. Universo: Todos los pacientes con enfermedad febril que presentaron síntomas y signos compatibles con leptospirosis ingresados y hospitalizados en el HGSJDD.
2. Muestra: 41 muestras de sangre obtenidas de pacientes ingresados y hospitalizados en el HGSJDD que presentaron síntomas y signos compatibles con leptospirosis entre el período de mayo a septiembre del año 2013.

B. Recursos

1. Humanos

Investigadoras: Br. María Gabriela Solórzano Paz

Br. Yndira Nineth Gálvez García

Coordinadora y Asesora del proyecto: Licda. María Luisa García de López

Asesora: Licda. Leticia Castillo

Asesor Hospital General San Juan de Dios: Lic. César Conde Pereira

2. Institucionales

- a. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC.
- b. Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria, Medicina y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- c. Laboratorio Nacional de Salud (LNS) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSP y AS).
- d. Laboratorio Clínico del HGSJDD.

3. Físicos

- a. Materiales y suministros de laboratorio
 - 16 serogrupos de *Leptospira* spp. (anexo 6)
 - Kit ELISA IgM Panbio®
 - Antisueros policlonales

- Medios de cultivo
 - EMJH para mantenimiento de cepas y EMJH + 5-Fluoracilo para hemocultivos.
 - Fletcher®
- Filtros con membrana de celulosa 0.22 a 0.45µm
- Equipo de filtración Millipore®
- Guantes de látex
- Algodón
- Bulbos y pipeteadores
- Láminas portaobjetos
- Papel mayordomo
- Papel aluminio
- Pipetas de 1 y 10mL estériles
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Puntas de pipeta desechables
- Recipientes de vidrio
- Probeta de 1,000mL estéril
- 1 Erlenmeyer de 1,000mL estéril
- Tubos de vidrio con tapón de rosca estériles de 20mL
- Tubos Vacutainer de tapón rojo con capacidad de 10cc al vacío
- Varillas de agitación estériles
- Jeringas estériles de 5mL y 1mL
- Magnetos de agitación
- Hielera para transporte de muestras.
- Marcador indeleble negro
- Fichas de recolección de datos y hojas de consentimiento informado.

b. Equipo

- Microscopio de campo oscuro
- Cabina de bioseguridad nivel II
- Incubadoras de temperatura 30°C y 37°C.
- Refrigeradora

- Autoclave
- Centrífuga
- Estufa simple
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Termómetro
- Bomba de vacío
- Baño María
- Kitasato estéril de 500mL
- Rotador
- Pipetas semiautomáticas de volumen variable 10-100uL y de 100-1000uL
- Pipeta multicanal de volumen variable 50-200uL
- Reloj
- Placas de ELISA

c. Reactivos

- Medio EMJH
 - NH_4Cl
 - Vitamina B1
 - Na_2HPO_4
 - KH_2PO_4
 - NaCl
 - Solución de NaOH 1N
 - Agua destilada estéril
 - Suplemento Difco™
- Medio Fletcher® enriquecido con suero de conejo inactivado al 10%
 - Medio Fletcher BD®
 - Suero de conejo comercial/recolectado
- Solución de amonio cuaternario
- Hipoclorito de sodio al 25%

- Etanol al 70%
- Extrán
- Piruvato de sodio
- Albúmina bovina
- Vitamina B12
- Buffer Fosfato Salino (PBS, pH 7.2 - 7.4)
- 5-fluoracilo

4. Métodos

a. Alianzas estratégicas

- Se presentó el estudio a Jefatura del Laboratorio Clínico del HGSJDD.
- Se presentó el estudio a Médicos Residentes del HGSJDD.

b. Trabajo de campo

a) Consideraciones éticas:

Previo a la toma de muestra, se brindó la información del estudio y la lectura del consentimiento informado de forma individual. Para la aceptación se requirió la firma o huella digital del paciente o encargado (anexo 6).

Los datos fueron recolectados en la ficha epidemiológica (anexo 7) siendo usados estrictamente por las investigadoras con fines del estudio. Por la participación no se brindó ninguna remuneración o pago, de ninguna forma se obligó a las personas a que aceptaran participar en el mismo.

Las muestras recolectadas no serán utilizadas en ningún otro tipo de estudio. Se preservó una copia de los sueros positivos para ELISA en el Laboratorio Clínico del HGSJDD y en el Departamento de Microbiología de la Universidad de San Carlos de Guatemala con fines de ser utilizados como controles internos de calidad.

b) Mantenimiento del cepario

Preparación de material necesario:

- Se limpió cabina de seguridad biológica con etanol al 70%.
- Posteriormente se limpió la cabina con solución de fenol al 5% y esperar 15

minutos.

- Se preparó un recipiente cilíndrico colocando un poco de algodón en el interior y agregando solución de amonio cuaternario hasta $\frac{1}{2}$ de su capacidad.
- En un recipiente hondo se colocó agua de chorro y dos medidas de hipoclorito de sodio comercial.

Primer pase: Enriquecimiento:

- Se colocó el cepario de leptospira almacenado en medio Fletcher dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Se introdujo dentro de la cabina todo el material estéril.
- Se tomó el tubo correspondiente a la cepa 1H y para observar la presencia del “anillo de Dinger”.
- Se eliminó el papel parafilm y se desenroscó el tapón con el dedo meñique.
- Con la ayuda de un bulbo y una pipeta Pasteur estéril, se tomó aproximadamente 0.5mL del cultivo, en la ubicación del anillo.
- Se cerró el tubo del cual se extrajo el cultivo, y se colocó papel parafilm.
- Se tomó un tubo con medio EMJH y se agregaron 6 gotas del cultivo.
- Se tapó el tubo sembrado, cuidando de no cerrarlo totalmente.
- Se descartó la pipeta Pasteur en el recipiente preparado con amonio cuaternario.
- Se rotuló el tubo con el número de cepa y fecha correspondiente al día de la inoculación.
- Se realizó este mismo procedimiento para cada una de las cepas.
- Se incubó a 30°C durante 10 días.

Segundo pase: Fortalecimiento:

- Después de los 10 días de incubación, se evaluó el crecimiento de las bacterias, según el procedimiento estandarizado.
- Los cultivos que presentaron crecimiento escaso se incubaron por 48 horas más y se revisaron nuevamente.
- Los cultivos con crecimiento óptimo o sobrecrecimiento se emplearon para la fase de fortalecimiento.

- Con la ayuda de un bulbo y una pipeta Pasteur estéril, se extrajeron aproximadamente 0.3mL del cultivo.
- En un tubo con medio EMJH, se agregó el volumen de cultivo adecuado según su crecimiento:
 - *Si el cultivo mostró un crecimiento óptimo de células, se agregaron 5 gotas del cultivo.*
 - *Cuando se observó un crecimiento moderado se agregaron 6 gotas del cultivo.*
 - *Si el crecimiento fue abundante, se agregaron únicamente 4 gotas del cultivo.*
- Se tapó el tubo sembrado, cuidando de no cerrarlo totalmente.
- Se descartó la pipeta Pasteur en el recipiente preparado con amonio cuaternario.
- Se rotuló el tubo con el número de cepa y fecha correspondiente al día de la inoculación.
- Se incubó a 30°C durante 7 días.

Tercer pase: Almacenamiento:

- Después de 7 días de incubación, se evaluó el crecimiento de las bacterias, según el procedimiento estandarizado.
- Los cultivos que presentaron un crecimiento escaso se incubaron por 48 horas más y se revisaron nuevamente.
- Los cultivos con crecimiento óptimo o sobrecrecimiento fueron utilizados en esta fase.
- Con la ayuda de un bulbo y una pipeta Pasteur estéril, se extrajeron aproximadamente 0.3mL del cultivo.
- En un tubo con medio de Fletcher® se agregó el volumen de cultivo adecuado según los criterios empleados en la fase de fortalecimiento.
- Se tapó el tubo sembrado, cuidando de no cerrarlo totalmente.
- Se descartó la pipeta Pasteur en el recipiente preparado con amonio cuaternario.
- Se rotuló el tubo con el número de cepa y fecha correspondiente al día de la inoculación.
- Se incubó a 30°C durante 7 días.
- Se revisaron los tubos periódicamente en busca de la aparición del anillo del Dinger.

- Los tubos que presentaron crecimiento (anillo) se cerraron completamente colocando papel parafilm.
- Una vez cerrados completamente, se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar cerrado y protegidos de la luz.
- El mantenimiento del cepario realizó cada tres meses.

c) Elaboración de medio líquido de EMJH

Elaboración de soluciones Stock:

- Se pesó 25.0g de NH_4Cl en balanza analítica, y se disolvió en 100mL de agua destilada estéril.
- Se pesó 0.5g de Vitamina B1 en balanza analítica y disolvió en 100mL de agua destilada estéril.
- Se almacenó ambas soluciones a -20°C en frascos estériles.

Elaboración de medio base (para un volumen de 500mL):

- Se midió 500mL de agua destilada con una probeta.
- Se pesó 0.5g de Na_2HPO_4 y NaCl en balanza analítica.
- Se pesó 0.3g de KH_2PO_4 en balanza analítica.
- Se agregó aproximadamente 250mL del agua medida en un erlenmeyer de 1,000mL.
- Se adicionó una a una las sales pesadas y mezcló suavemente para disolver.
- Se adicionó el agua destilada restante en la probeta.
- Se determinó el pH del medio con potenciómetro cuidando el uso de agua destilada estéril para el lavado del potenciómetro.
- Se ajustó pH a 7.4 con solución de NaOH 1 N de ser necesario.
- Se autoclaveó el medio por 15 minutos a 121°C .

Preparación final del medio:

- Se tomó una alícuota de 50mL de suplemento almacenado a -4°C , y colocó a temperatura ambiente dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Una vez autoclaveado el medio base, se enfrió hasta temperatura ambiente dentro de la cabina de seguridad biológica.

- Cuando se alcanzó la temperatura deseada, se añadió lentamente los 50mL de suplemento.
- Se mezcló suavemente para homogenizar.
- Se preparó equipo de filtración y una vez listo, se agregó lentamente el medio según sea la velocidad de la filtración.
- Con ayuda de una pipeta estéril de 10mL y un pipetor, se dispensó 5mL del medio filtrado en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles.
- Se identificaron los tubos con el nombre del medio y fecha de elaboración (que fue equivalente al número de lote).
- Se almacenó a 4°C por un máximo de 6 meses.

d) Elaboración de medio líquido EMJH + 5 Fluoracilo

Elaboración de soluciones Stock:

- Se pesó 25.0g de NH_4Cl en balanza analítica, y se disolvió ambos en 100mL de agua destilada estéril.
- Se pesó 0.5 g de Vitamina B1 en balanza analítica y disolvió en 100mL de agua destilada estéril.
- Se almacenó ambas soluciones a -20°C en frascos estériles.

Elaboración de medio base (para un volumen de 1L):*

- Se midió 900mL de agua destilada con una probeta.
- Se pesó 1.0 g de Na_2HPO_4 y NaCl en balanza analítica.
- Se pesó también 0.3 g de KH_2PO_4 en balanza analítica.
- Se agregó aproximadamente 500mL del agua medida en un erlenmeyer de 1,000 mL.
- Se adicionó una a una las sales pesadas y mezcló suavemente para disolver.
- Se añadió 1.0mL de solución stock de Vitamina B1.
- Se tomó 1.0mL de solución stock de NH_4Cl y adicionó al medio.
- Se adicionó el agua destilada restante en la probeta.
- Se determinó el pH del medio con potenciómetro cuidando el uso de agua destilada estéril para el lavado del potenciómetro.

- Se ajustó pH a 7.4 con solución de NaOH 1N de ser necesario.
- Se autoclaveó el medio por 15 minutos a 121°C

** Cuando se contó con el medio base comercial en polvo se disolvió 2.56 g del medio en 900mL de agua destilada.

Preparación final del medio:

- Se tomó una alícuota de 100mL de suplemento almacenado a -4°C, y colocar a temperatura ambiente dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Una vez autoclaveado el medio base, enfrió hasta temperatura ambiente dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Cuando se alcanzó la temperatura deseada, se añadieron lentamente los 100mL de suplemento.
- Se mezcló suavemente para homogenizar.
- Se preparó equipo de filtración y una vez listo, se agregó lentamente el medio según sea la velocidad de la filtración.
- Se adicionó 5 Fluoracilo en una concentración de 200 µg/mL.
- Se mezcló suavemente para homogenizar.
- Con ayuda de una pipeta estéril de 10mL y un pipetor, se dispensó 5.0mL del medio filtrado en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles.
- Se identificaron los tubos con el nombre del medio y fecha de elaboración.
- Se almacenaron a 4°C por un máximo de 6 meses.

e) Elaboración del medio semisólido de Fletcher®

Preparación del medio base (500mL):

- Se midió 500mL de agua destilada con una probeta.
- Se pesó 1.25g del medio base Fletcher BD® en balanza analítica.
- Se agregó aproximadamente 250mL del agua medida en un erlenmeyer de 1,000mL.
- Se adicionó el medio pesado y mezcló suavemente para disolver.
- Se adicionó el agua destilada restante en la probeta.
- Se calentó el medio con agitación frecuente, hasta una leve ebullición por aproximadamente 1 minuto.

- Se cubrió el erlenmeyer con papel kraft y colocar un trozo de cinta testigo identificando el medio y la fecha de elaboración.
- Se autoclaveó el medio por 15 minutos a 121°C.

Inactivación de suero de conejo:

- Se tomó una alícuota de 40mL de suero de conejo (o las necesarias para alcanzar este volumen) se almacenó a – 20°C, y colocó a temperatura ambiente para descongelar.
- Se calentó el baño María hasta una temperatura constante de 56°C.
- Una vez estuvo descongelado el suero de conejo, se colocó durante 30 minutos en baño María.
- Se retiró el recipiente y se llevó hasta la cabina de seguridad biológica para la preparación final del medio.

Preparación final del medio:

- Una vez autoclaveado el medio base, se enfrió hasta una temperatura aproximada de 50°C dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Cuando se alcanzó la temperatura deseada, se añadió lentamente el suero de conejo inactivado.
- Se mezcló suavemente para homogenizar.
- Con ayuda de una pipeta estéril de 10mL y un pipetor, se dispensó 8mL del medio en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles.
- Se identificaron los tubos con el nombre del medio y fecha de elaboración (que fue el equivalente al número de lote).
- Se almacenó a 4°C por un máximo de 6 meses.

f) Obtención de muestra de sangre

La muestra para el hemocultivo se obtuvo durante el período febril agudo de la fase septicémica (entre el primer y séptimo día), antes del inicio de la terapia antibiótica.

Condiciones específicas

Tomar la muestra durante el período agudo febril (primer al séptimo día de iniciada la enfermedad) de la fase leptospirémica.

Solicitar al laboratorio de referencia 2 viales con medio de cultivo los que mantendrán a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos antes de la toma de muestra.

Procedimiento

- Se llenó el consentimiento informado y ficha epidemiológica con los datos del paciente.
- Se prepararon 2 viales por paciente y se atemperaron.
- Se llenó etiqueta y se rotuló tubo de serología.
- Se pegó la etiqueta al vial correspondiente.
- Se limpió el área de punción con desinfectante, solución de yodo y alcohol al 70%.
- Se tomó muestra con jeringa de 5mL.
- Se limpió con alcohol al 70% el área de punción del vial 1 y se inocularon 2 gotas de sangre.
- Se limpió con alcohol al 70% el área de punción del vial 2 y se inocularon 2 gotas de sangre.
- Se homogenizó suavemente los viales.
- Se guardó el resto de muestra en tubo de serología.
- Se transportaron los viales al laboratorio para ser incubados a 30°C.

Lectura

- Se trabajó en una cabina de bioseguridad nivel II.
- Se controlaron los cultivos cada 7 días, transfiriendo 1-2 gotas del cultivo sobre una lámina porta-objeto, limpia y sin ralladuras, se observó al microscopio de campo oscuro con objetivo de 40X. Se observó por lo menos 5 preparaciones de cada cultivo.
- Si se observó alguna sospecha de crecimiento de leptospiras, se realizaron subcultivos en tubos con medio EMJH.
- Se incuban los viales originales y los subcultivos por 7 días a 28-30°C.

- Se realizó la lectura de viales originales y subcultivos.
- Si los hemocultivos fueron negativos, se continuó incubando y controlando cada 7 días de 2-4 semanas antes de descartar como negativa la muestra incluso hasta 4-6 meses (OMS, 2008).
- Si los hemocultivos fueron positivos, se realizó pase de las cepas a medio EMJH cada 7 días para mantener viables las cepas para su posterior identificación. Además, se hizo pase a medio Fletcher® para almacenar las cepas.

Interpretación

- La presencia de leptospiras indicó la positividad del caso.
- Generalmente, el aislamiento de otras bacterias fue indicio de contaminación durante el procedimiento de toma de muestra o siembra en los medios.
- El no aislamiento de leptospiras posterior a los 4-6 meses de realizada la siembra indicó que el paciente no estuvo con leptospirosis o que la muestra se tomó en un período no adecuado posterior a la leptospiremia.
- El crecimiento de leptospiras en el medio de Fletcher® (semisólido), fue característico por la aparición del anillo de Dinger. Sin embargo, la ausencia del disco no indicó necesariamente la ausencia de éstas.
- Para observar el desarrollo macroscópico en el medio de EMJH (líquido), fue caracterizado por la opalescencia, al agitar suavemente el cultivo y poder observar a través de la luz natural o artificial. La presencia de sedimento o turbidez indicó que el cultivo estaba contaminado.

g) Purificación de cepas de leptospira

i. Filtración con membrana

- Con una pipeta estéril de 1mL se colocaron 0.5mL de medio de cultivo en el centro de una caja de Petri estéril.
- Con unas pinzas estériles se depositó sobre medio líquido una membrana estéril con poro de 0.22 ó 0.45µm.
- Al absorberse el líquido por el disco de membrana, suavemente se colocaron 0.5mL de cultivo contaminado sobre el centro de la membrana.

- Se tapó la caja de Petri y se mantuvo a temperatura ambiente durante dos horas, tiempo en el cual las leptospiras atravesaron la membrana.
- La caja se inclinó a fin de que el material filtrado corriera hacia el costado; con una pipeta Pasteur se recogió el filtrado, se inoculó en dos tubos con medio de cultivo semisólido de Fletcher®, se incubó a 28°C por 7 días, se observó el desarrollo y se resembró en medio de cultivo líquido de EMJH.

ii. Utilizando medio EMJH + 5 Fluoracilo

- Se realizó pase a medio EMJH + 5 Fluoracilo.
- Se alternar con pases a medio EMJH para favorecer el crecimiento de la leptospira.

Nota: No realizar dos pases seguidos en medio EMJH + 5 Fluoracilo para evitar perder la cepa.

h) Determinación de anticuerpos IgM mediante la prueba de ELISA Panbio®

Procedimiento

- Se removió el número necesario de micropocillos de la bolsa de aluminio e insertó en el soporte de tiras. Fueron necesarios cinco micropocillos para: el control negativo (N), el control de reactivo (R) y el calibrador (cal) por triplicado. Se aseguró que los pocillos no utilizados restantes estén sellados herméticamente en el sobre de aluminio.
- Usando tubos de ensayo adecuados o una placa de microtitulación, se diluyó el control negativo, control reactivo, calibrador en muestras por triplicado y la muestra del paciente.
 - a. A 10 µL de suero se añadió 1.000 µL de diluyente de muestra. Se mezcló bien.
 - b. A 10 µL de suero se añadió 90 µL de diluyente de muestra. Se tomó 20 µL del suero diluido y se añadió 180 µL de diluyente de muestra. Se mezcló bien.
- Se pipeteó 100 µL de las muestras diluidas, controles y calibradores en sus respectivos pocillos.
- Se cubrió la placa e incubó durante 30 minutos a 37°C.
- Se lavó seis (6) veces con Buffer de lavado diluido (se consultó el procedimiento de lavado).

- Se pipeteó 100 μ L HRP conjugado anti-IgM humana a cada pocillo.
- Se cubrió la placa e incubó durante 30 minutos a 37 °C
- Se lavar seis (6) veces con Buffer de lavado diluido (se consultó el procedimiento de lavado).
- Se pipeteó 100 μ L TMB en cada pocillo
- Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Se tomó el tiempo a partir de la primera adición. Desarrolló un color azul.
- Se pipeteó 100 μ L de la solución Stop en todos los pocillos en la misma secuencia y tiempo, como la adición de TMB. Se mezcló bien. El color azul cambió a amarillo.
- Dentro del transcurso de 30 minutos se leyó la absorbancia desde cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650nm.

Lavado manual

- Se descartó el contenido de la placa en el recipiente de residuos apropiado.
1. Se llenaron los pozos con solución de lavado utilizando un frasco adecuado. Se evitó burbujas de Buffer de lavado, ya que podrían reducir la eficiencia de lavado. Se descartar el Buffer de lavado de los pozos en seguida.
- Se llenaron los pozos con Buffer de lavado y se desecharon inmediatamente.
 - Se repitió el paso (3) otras cuatro veces. Esto hizo que se lavara 6 veces con Buffer de lavado.
 - Después del último lavado, se descartó el contenido de los pozos y se eliminó el buffer de lavado sobre una toalla de papel absorbente.

Cálculos

- Se calculó la absorbancia media del calibrador de los valores por triplicado y luego semultiplicó el factor de calibración. Este fue el valor de corte.
- El valor de índice se obtuvo dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de corte (obtenido en el paso 1).

Alternativamente

- Unidades Panbio pueden ser calculadas multiplicando el valor index (calculado en el paso 2) por 10.

$$\text{Valor Index} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Valor de corte}}$$

Interpretación de resultados

| INDEX | PANBIO | RESULTADO |
|-----------|--------|-----------|
| < 0.9 | <9 | Negativo |
| 0.9 – 1.1 | 9 – 11 | Zona Gris |
| >1.1 | >11 | Positivo |

| Resultado | Interpretación |
|-----------|--|
| Negativo | Anticuerpos IgM no detectables. Si los anticuerpos IgM específicos no se detectan y se sospecha de una infección reciente, esto puede ser confirmado mediante pruebas de otro ejemplar, 7-14 días después. |
| Zona Gris | Las muestras deben repetirse. Muestras que sigan siendo dudosas al repetir la prueba deben confirmarse con un método alternativo. |
| Positivo | Presencia detectable de anticuerpos IgM |

i) Determinación de anticuerpos totales por medio de la prueba de MAT

Preparación del antígeno:

- Todas las muestras fueron procesadas en la cabina de bioseguridad, para evitar la contaminación de las cepas.
- Se tomó aproximadamente un 1mL del “anillo de Dinger” formado entre la parte media y superficie del medio de Fletcher®, sin tocar el agar.
- Se inoculó 10 gotas aproximadamente del contenido de la pipeta a tubo con medio EMJH.
- Los inóculos se incubaron a 30°C por 5-7 días, registrando diariamente el control de la temperatura, para un mejor desarrollo de la cepa.
- Todos los cultivos utilizados para la prueba MAT tenían entre 5 y 7 días de desarrollo en medio EMJH modificado.
- Los cultivos con una concentración aproximada de $2-4 \times 10^8$ leptospiras, que no evidenciaron contaminación ni autoaglutinación microscópica fueron seleccionados.

- Los cultivos densos, se diluyeron con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2.-7.4), hasta observar en el microscopio un aproximado de 150-200 leptospiras en movimiento por campo.

Tamizaje:

- Se agregaron 25 μ L de Buffer Fosfato Salino (PBS) a los 96 pozos de las microplacas de fondo en U; y 20 μ L más de PBS en los 8 pozos de la columna número dos de la microplaca.
- Después se adicionaron 5 μ L de suero problema en los 8 pozos de la columna número dos de la microplaca (dilución 1:10). Los pozos de la columna fueron empleados como control negativo.
- Después se tomaron 25 μ L de la dilución contenida en los pozos de la columna número dos y se realizaron diluciones seriadas en las columnas siguientes.
- Se agregaron por fila 25 μ L de los diferentes antígenos preparados de *Leptospira* a los pozos de la placa.
- Luego de agitar suavemente y cubrir la placa con papel aluminio, se incubó por 2 horas a 37 °C.

Lectura:

- Se colocó una gota de cada alícuota de los pozos en una lámina portaobjetos limpia.
- Posteriormente se observó con aumento de 10x en microscopio de campo oscuro para buscar aglutinación comparando con el control negativo preparado (pozo 1).

Interpretación:

- Un resultado fue considerado REACTIVO cuando se presentó una aglutinación igual o mayor del 50% en la dilución 1:20 frente a uno o más serogrupos de *Leptospira* spp.
- Un suero fue considerado NO REACTIVO al no observar ninguna aglutinación evidente en una dilución igual o mayor a 1:20 con ninguno de las diferentes serogrupos.
- El título de anticuerpos asignado corresponde al inverso de la dilución en la que se observa un 50% de aglutinación y 50% de leptospiras libres.

- El serovar considerado infectante fue aquel en el cual se observa aglutinación o el mayor título de anticuerpos (de haber aglutinación en más de uno).

C. Diseño de la investigación

1. **Tamaño de la muestra:** Todas las muestras de sangre recibidas en el período de mayo a septiembre del año 2013 de pacientes con enfermedad febril que presentaron síntomas y signos compatibles con leptospirosis ingresados al Hospital General San Juan de Dios.
2. **Tipo de muestreo:** Descriptivo – exploratorio, según la metodología de análisis de casos.
3. **Diseño estadístico**
 - a. **Tipo de estudio:** descriptivo
 - b. **Análisis de la investigación:** análisis de frecuencia de las variables de interés. Los resultados serán tabulados con el programa Microsoft Excel 2010.
4. **Criterio de inclusión para hemocultivo**

Usuarios que presenten los siguientes signos y síntomas:

 - Fiebre sin razón específica
 - Mialgia
 - Cefalea intensa
 - Ictericia
 - Valores fuera de los límites de referencia de:
 - Bilirrubina directa
 - Alaninaaminotransferasa (ALAT)
 - Aspartato aminotransferasa (ASAT)
 - Nitrógeno de urea (BUN)
 - Creatinina sérica
 - Amilasa sérica
 - Velocidad de eritrosedimentación
 - Trombocitopenia

- Leucocitosis
- Creatinina quinasa

Muestra tomada entre los primeros cinco días después del apareamiento de síntomas.

5. Criterio de exclusión para hemocultivo

- Pacientes con tratamiento antibiótico previo.
- Muestras tomadas después de nueve días de iniciados los síntomas de la enfermedad.

VIII. RESULTADOS

En el estudio participaron un total de 41 pacientes ingresados al Hospital General San Juan de Dios, durante el período de mayo a septiembre de 2013 y que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos.

Dicho estudio estuvo constituido por 15 pacientes de sexo femenino (36.58%) y 26 de sexo masculino (63.41%). La edad de los pacientes osciló entre 0-79 años. Las características demográficas y procedencia de los mismos pueden observarse en la tabla No. 1.

Tabla 1. Características demográficas y procedencia de los pacientes reactivos con la prueba de ELISA IgM. Hospital General San Juan de Dios, mayo – septiembre 2013.

| Características | Total (%) N= 41 | ELISA IgM Positivos n=9 |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|
| Sexo | | |
| Femenino | 15 (36.58) | 7 (77.77) |
| Masculino | 26 (63.41) | 2 (22.22) |
| Grupo de edad* | | |
| 0-9 | 2 (4.88) | 1 (11.11) |
| 10-19 | 10 (24.39) | 2 (22.22) |
| 20-29 | 11 (26.83) | 5 (55.56) |
| 30-39 | 8 (19.51) | 1 (11.11) |
| 40-49 | 8 (19.51) | 0 (0.0) |
| 50-59 | 1 (2.44) | 0 (0.0) |
| 70-79 | 1 (2.44) | 0 (0.0) |
| Ocupación | | |
| Ama de casa | 8 (19.51) | 2 (22.22) |
| Estudiante | 7 (17.07) | 2 (22.22) |
| Encargado de bodega | 2 (4.88) | 1 (11.11) |
| Agricultor | 3 (7.32) | 0 (0.0) |
| Otros** | 21 (51.22) | 4 (44.44) |
| Localidad | | |
| Ciudad capital | 24 (58.54) | 7 (77.78) |
| Departamentos | 17 (41.46) | 2 (22.22) |

* Edad en años

Fuente: Datos experimentales

** Otros: carpintero, secretaria, conserje, mecánico, área de salud, tejedor, docente.

El sexo femenino fue el grupo con mayor porcentaje de positividad (77.77%). El rango de edades de casos positivos fue de 0 – 39 años, el grupo más afectado fue de 20-29 años (55.56%). La mayor parte de personas afectadas fueron amas de casa (19.51%) y estudiantes (17.07%).

De los 41 pacientes incluidos en el estudio, 24 (58.54%) eran procedentes de la ciudad capital, principalmente de la zona 7 en donde se reportaron 2 casos. Los 17 (41.46%) restantes procedían de otros departamentos como Cobán con 2 casos positivos.

Entre los factores asociados al desarrollo de la infección por leptospiras en los pacientes reactivos predominó el contacto con animales con un 66.67% (Tabla 2).

Tabla 2. Factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos IgM anti-Leptospira en pacientes hospitalizados en el Hospital General San Juan de Dios, mayo – septiembre 2013.

| Factor de riesgo | ELISA positivos (n=9) | % |
|-------------------------|----------------------------------|----------|
| Contacto con animales | 6 | 66.67 |
| Viajes realizados | 3 | 33.33 |
| Contacto con agua* | 5 | 55.55 |

* agua de ríos, agua potable, agua de mar Fuente: Datos experimentales

En los pacientes reactivos con la prueba de ELISA IgM se encontró que la mayoría de ellos presentaron fiebre 88.89%, seguido de vómitos 77.78%, cefalea 55.56%, ictericia 44.44%, náuseas 44.44% y en menor proporción mialgias 22.22% (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de síntomas y signos presentados por los pacientes reactivos. Hospital General San Juan de Dios, mayo – septiembre 2013.

| Signos y síntomas | ELISA positivos (n=9) | % |
|--------------------------|----------------------------------|----------|
| Fiebre | 8 | 88.89 |
| Vómitos | 7 | 77.78 |
| Cefalea | 5 | 55.56 |
| Ictericia | 4 | 44.44 |
| Nausea | 4 | 44.44 |
| Diarrea | 3 | 33.33 |
| Mialgias | 2 | 22.22 |
| Gripe | 2 | 22.22 |
| Hemorragia | 1 | 11.11 |
| Mareos | 1 | 11.11 |
| Anorexia | 1 | 11.11 |

Fuente: Datos experimentales

De los 41 pacientes sospechosos de leptospirosis; 9 fueron reactivos con la prueba de ELISA IgM (21.95%), confirmándolos con la prueba de MAT y obteniéndose un 100% de positividad.

Las 9 muestras de suero fueron enfrentados a 16 serovares de *Leptospira* spp con la prueba de Microaglutinación (MAT). El título más bajo fue de 1:80 y el más alto de 1:640, quedando confirmados como casos positivos de leptospirosis según criterios que establece la OMS (OMS, 2008). De los pacientes positivos con ELISA IgM y la prueba de MAT, se logró aislar cuatro cepas de *Leptospira* spp, que representa el 9.76%.

De los 16 serovares de *Leptospira* spp. usados como batería de rutina en la prueba de MAT, 7 fueron aglutinados por los 9 sueros reactivos (Tabla 5).

Tabla 5. Determinación de los Serovares de *Leptospira* en las muestras de pacientes reactivos. Hospital General San Juan de Dios, mayo - septiembre 2013.

| Especie | Serogrupo | Serovar | Frecuencia (%) | Título | | | | |
|---|------------|------------|----------------|--------|------|-------|-------|-------|
| | | | | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 |
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis | 1 (11.11) | | 1 | | | |
| <i>L. interrogans</i> | Serjoe | Hardjo | 1 (11.11) | | | 1 | | |
| <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | 1 (11.11) | | 1 | | | |
| <i>L. gorgpetersenii</i> | Tarassovi | Tarassovi | 2 (22.22) | | | 1 | 1 | |
| <i>L. interrogans</i> | Pomona | Pomona | 1 (11.11) | | | | | 1 |
| <i>L. interrogans</i> | Autumnales | Autumnales | 1 (11.11) | | | | 1 | |
| Subtotal | | | 7 (77.77) | | | | | |
| Serovares aglutinantes con el mismo título (INDETERMINADOS) | | | | | | | | |
| Australis, Australis/ Javanica, Javanica | | | 1 (11.11) | | | | 1 | |
| Canicola, Canicola/ Autumnales, Autumnales | | | 1 (11.11) | | | 1 | | |
| Subtotal | | | 2 (22.22) | | | | | |
| TOTAL | | | 9 | | | | | |

Fuente: Datos experimentales

De los serovares detectados con la prueba de MAT, *Tarassovi Tarassovi* fue el que presentó mayor frecuencia (22.22%), seguido de *Pestan redundandoomona*, *Hardjo*, *Autumnales*, *Canicola* y *Australis* cada uno representando un 11.11%. El serovar *Pomona* presentó el título más alto siendo de 1:640 y el más bajo fue de 1:80 correspondientes a *Canicola* y *Australis*. En los 2 sueros restantes se observó coaglutinación con 2 serovares, imposibilitando la determinación del serovar implicado en la respuesta inmunológica, reportando títulos de 1:160 y 1:320.

Para las 9 muestras de suero a las que se les realizó la prueba de MAT, se observó que la mayoría de los pacientes con títulos altos (\geq a 1:320) presentaron un mayor número de síntomas en comparación a los que se les reportó títulos menores (\leq a 1:160).

Tabla 6. Signos y síntomas relacionados con los títulos de MAT reportados en las muestras de pacientes reactivos. Hospital General San Juan de Dios, mayo - septiembre 2013.

| Paciente | Título MAT | Signos y síntomas |
|----------|------------|--|
| 1 | 1:80 | Vómitos, cefalea |
| 2 | 1:80 | Vómitos, cefalea, fiebre, mialgia |
| 3 | 1:160 | Vómitos, cefalea, fiebre, diarrea |
| 4 | 1:160 | Vómitos, fiebre, hemorragia |
| 5 | 1:160 | Fiebre, edema |
| 6 | 1:320 | Vómitos, cefalea, fiebre, mialgia, diarrea, ictericia, náusea |
| 7 | 1:320 | Vómitos, fiebre, mialgia, ictericia, náusea |
| 8 | 1:320 | * |
| 9 | 1:640 | Vómitos, cefalea, fiebre, diarrea, ictericia, náusea, anorexia |

*No se obtuvieron datos.

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La leptospirosis es considerada como la enfermedad zoonótica de mayor distribución en el mundo y desde el punto de vista clínico desarrolla un conjunto amplio de signos y síntomas similares a otras enfermedades infecciosas como dengue, hepatitis, influenza, entre otras; por lo que el diagnóstico microbiológico a través del cultivo es de vital importancia en la confirmación de un caso (Obregón *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2007; Francois, 2013).

En el año de 1980 Torres confirmó el primer caso de leptospirosis aislando *L. interrogans* serovariedad *copenaghensi* en un paciente que residía en la Democracia, Escuintla y desde entonces no se han realizado estudios sobre aislamientos de humanos en Guatemala. Por lo que el presente estudio tuvo como principal objetivo demostrar la presencia de *Leptospira* spp. en muestras clínicas de sangre de pacientes ingresados en el HGSJDD de la ciudad capital, a través de su aislamiento e identificación; así también establecer las serovariedades responsables de la infección mediante la prueba de MAT.

En el presente estudio se detectó una seroprevalencia de leptospirosis por el método de ELISA IgM en el sexo femenino con un 77%, lo que confirma lo reportado en los estudios de seroprevalencia realizados en Guatemala por Barrios en el año 2010 donde obtuvo un 61.1% y por Herrera y Pérez en el 2012 con el 69.4%, en el mismo grupo.

Es importante mencionar que en investigaciones realizadas en algunos países mencionan al sexo masculino como el grupo que más padece esta enfermedad (Céspedes *et al.*, 2003; Perret *et al.*, 2005 y Hernández *et al.*, 2012). Sin embargo, otros estudios hacen referencia que cuando hombres y mujeres trabajan en idénticas condiciones ambos sexos pueden padecerla, comprobando la existencia de un factor de riesgo laboral y recreacional (Rodríguez *et al.*, 2000 y Agudelo *et al.*, 2007)

Se ha demostrado que la ocupación y el predominio de edades jóvenes son factores asociados a la infección por leptospira por ser de carácter laboral y recreacional. Lo anterior se evidenció con los resultados obtenidos en este estudio, en donde se reporta una alta positividad en el grupo de 20 a 29 años con un 55.56%, siendo amas de casa y estudiantes los más afectados ambos con un porcentaje de 22.22%.

Las amas de casa se encuentran más expuestas a las fuentes de contagio en la realización de sus labores teniendo contacto directo o indirecto con roedores y animales domésticos como los perros, que se ha demostrado desempeñan el papel de reservorios y transmisores de la leptospirosis (Céspedes *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2012). Para la variable edad de 20-29 años, en este estudio se calculó una tasa de riesgo de 0.19/100,000 habitantes, según la población estimada por el Instituto Nacional de Estadística (INE), 2012.

De los casos seropositivos reportados, 7 procedían de la ciudad capital principalmente de dos asentamientos de la zona 7, lo que viene a confirmar los hallazgos reportados en los estudios seroepidemiológicos de Herrera y Pérez en el 2012 y García, *et al.*, en el 2013, los cuales fueron llevados a cabo en asentamientos de la zona 1 y 2 de la ciudad capital con seroprevalencias de 30.3% y (74.4 ,76.78%) respectivamente.

El factor de riesgo de adquirir leptospirosis en estas áreas podría asociarse a condiciones de saneamiento inadecuadas que propician la presencia de vectores principalmente roedores y animales domésticos. Además condiciones climáticas como lluvias abundantes que favorecen la supervivencia de leptospiras patógenas, las cuales propician que la infección sea más frecuente (Céspedes *et al.*, 2003). Por lo que es importante mencionar que los casos positivos reportados en este estudio se detectaron durante los meses de mayo a septiembre, que es la época lluviosa en el país.

Tomando en cuenta que se detectaron y confirmaron 7 casos de leptospirosis en la ciudad capital, se calculó una tasa de riesgo de 0.22/100,000 habitantes y para el departamento de Alta Verapaz con los 2 casos restantes fue de 0.17/100,000 habitantes. Aunque el presente estudio no es representativo de toda la república, aporta datos iniciales que evidencian el riesgo de adquirir leptospirosis en Guatemala, lo que permite hacer comparaciones con otros países tal es el caso de México que en el año 2010 reportó una tasa de 0.45/1000,000 habitantes (CoNaVe, 2012).

Los casos de leptospirosis en el mundo no están bien documentados y el número de casos no es conocido con precisión, ya que la enfermedad no es diagnosticada correctamente, por lo que la incidencia anual varía dentro de un rango desde, aproximadamente 0.1-1/100,000

habitantes en climas templados y de hasta 10-100/100,000 habitantes en climas húmedos tropicales (CoNaVE, 2012).

El estimado de casos anuales de leptospirosis es de 320,000 en el mundo, en Centro América se reporta una media anual de 263 casos y en Guatemala la media anual de casos confirmados es de 13 durante el período 2003-2005 (Costa *et al.*, 2012).

Según el análisis de vigilancia de leptospirosis en la región de las Américas de 1996 al 2005, Brazil, Costa Rica y Cuba representan el mayor número de notificaciones de casos de leptospirosis (83.1%) debido a la existencia de un Programa Nacional para el control de la enfermedad en estos países (Rodríguez *et al.*, 2000).

Los principales factores asociados a la infección en el presente estudio fue el contacto con animales (66.67%) y el contacto con agua (55.55%), que son considerados factores de riesgo por las investigaciones realizadas por Céspedes, *et al.*, 2003 y Duany, *et al.*, 2014.

Según la OMS (2008), las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son muy variables e inespecíficas, el diagnóstico es muy difícil y se ve asociado con otras enfermedades. De los pacientes positivos con la prueba de ELISA IgM y MAT se encontró que los síntomas más frecuentes fueron fiebre (88.89%), vómitos (77.78%) y cefalea (55.56%) y además mialgias aunque en menor porcentaje (Ver tabla 3), los que concuerdan con otros estudios en los que fiebre, cefalea, mialgias, dolor de articulaciones, escalofríos se reportan como los principales síntomas de esta enfermedad (Estrada, 2004; Barrios, 2010; Hernández *et al.*, 2012; Duany *et al.*, 2014).

La presencia de *Leptospira* spp. en los pacientes sospechosos de leptospirosis fue puesta en evidencia a través de técnicas inmunológicas y bacteriológicas. La prueba de ELISA IgM es un método de diagnóstico rápido y sensible (sensibilidad de 36 al 100% según Perret, 2005 y especificidad de 80% según Céspedes, 2008) ante una infección por leptospira y utiliza antígenos género-específico que detectan anticuerpos de clase IgM durante la primera semana, producidos contra la mayoría de leptospirosis. Pero de acuerdo a la OMS (2008), los resultados obtenidos mediante una prueba de tamizaje deben ser confirmados por el método de referencia internacional (MAT) en la cual es posible determinar el “serovar/serogrupo” causante de la infección de manera indirecta (Obregón, 2012).

De las 41 muestras analizadas por el método de ELISA IgM, nueve muestras fueron reactivas, de las cuales ocho fueron recolectadas durante las primeras dos semanas y una fue obtenida después de un mes de iniciados los síntomas.

Es de resaltar que la respuesta inmunológica es diferente de un paciente a otro y la seroconversión puede ocurrir de 5 a 7 días después de la aparición de la enfermedad. Los anticuerpos IgM aparecen a los 3 días de la infección y pueden persistir hasta por cinco meses, incluso por ocho meses según lo reportado por Boza, R., 1990 (OMS, 2008) (Ríos, *et al.*, 2008).

En la prueba de MAT se utilizó una batería de 16 serovares con cepas certificadas por el Instituto de Medicina Tropical de Holanda (ver anexo 6). En este estudio el serovar más frecuente fue *Tarassovi* (22.22%) seguido de *Australis*, *Hardjo*, *Canicola*, *Pomona*, y *Autumnales* (11.11%), hallazgos similares han sido reportados en estudios seroepidemiológicos realizados en el país (Herrera y Pérez, 2012; García., *et al.*, 2013).

En relación a la sintomatología y los títulos obtenidos por la prueba de MAT, en el presente estudio se observó que la mayoría de los pacientes que presentaron un título \geq a 1:320, presentaron un mayor número de síntomas que los pacientes con un título \leq a 1:160. Los estudios que analizan esta relación son escasos, como el llevado a cabo por Velasco y colaboradores (2009), en el cual analizó 7 casos en los que la leptospirosis aguda progresó a crónica. En el caso de la leptospirosis aguda observaron un incremento de los títulos obtenidos inicialmente de dos a cuatro veces en la segunda muestra tomada, lo que tiene valor diagnóstico según los criterios de la OMS (2008). Cuando la leptospirosis evolucionó a la cronicidad, observaron que el cuadro clínico se agravaba y los títulos de la MAT se reducen a límites no diagnósticos (1:20 a 1:80). Cuando mejora el cuadro clínico, la serología vuelve a ser positiva. Por lo que hacen énfasis que se debe tomar en cuenta el momento en que se realiza el diagnóstico de leptospirosis crónica por métodos serológicos tradicionales.

Así mismo se observó coaglutinación con 2 serovares diferentes con el mismo título, imposibilitando la determinación del serovar implicado en la respuesta inmunológica, esto debido a que algunos sueros pueden producir reacciones-cruzadas es decir, que estos

pacientes presentan anticuerpos que reaccionan con varios serovares, observándose la mayoría de veces en la fase inicial de la leptospirosis (OMS, 2008).

La forma de disminuir estas reacciones cruzadas es logrando el aislamiento e identificación de los diferentes serovares que circulan en un área geográfica determinada, por lo que se debe hacer énfasis en la necesidad de continuar con investigaciones que tengan este fin y contar con cepas nativas que permitan reajustar la batería de serovares que se usan en la prueba de MAT utilizada actualmente (Herrera y Pérez, 2012).

De los casos positivos, el título más bajo reportado fue de 1:80, comparable con los estudios realizados en el país por Zelaya *et al* en el 2008; Herrera y Pérez en el 2012, y García *et al* en el 2013, quienes lo establecieron como el título más frecuente y con valor diagnóstico, además por tratarse de muestras únicas y considerando los criterios de OMS (2008) esta dilución se interpretó como caso positivo al relacionarlo con los datos clínicos y epidemiológicos.

Uno de los principales objetivos del estudio fue demostrar la presencia de *Leptospira* spp. en muestras clínicas de pacientes del HGSJDD a través del aislamiento del microorganismo. Aunque el aislamiento no ofrece un diagnóstico temprano de la infección, permite conocer el serovar responsable y asociarlo con determinados cuadros clínicos (Perret *et al.*, 2005). Por ello es de suma importancia la realización de este tipo de estudios que permitan determinar los serovares circulantes en el país y conocer la epidemiología de la enfermedad, ya que se ha demostrado que el desarrollo de los síntomas depende de la virulencia del serovar infectante (Obregón *et al.*, 2003).

El mayor desafío en este estudio para lograr el aislamiento de las leptospiras fue la purificación de las cepas. La contaminación persistió a pesar de haber utilizado el medio EMJH con 5-fluoracilo que actúa como inhibidor del crecimiento de contaminantes y el método de filtración por membrana. La contaminación interfirió en las pruebas fenotípicas confirmatorias y no fue posible establecer si se trataba de leptospiras patógenas o saprófitas.

Diferentes investigadores resaltan la dificultad de mantener los cultivos puros, debido a que la contaminación constituye uno de los principales problemas, en el aislamiento,

crecimiento y conservación de dichas bacterias. Así mismo, entre otros de los factores que pueden afectar la viabilidad de las leptospiras están el lavado inadecuado de la cristalería, la preparación inadecuado del medio, sustancias inhibitorias y el tratamiento previo con antibióticos, (Caballeros., 1997; Céspedes., 2002; de León., 2002).

El desarrollo de técnicas de biología molecular desempeña un papel importante en el diagnóstico de la leptospirosis, para evidenciar genéticamente la patogenicidad de los aislamientos. Sin embargo, en nuestro estudio no fue posible la realización de estas pruebas debido a la falta de reactivos y estandarización del método durante el periodo experimental. Las cepas aisladas quedaron almacenadas en el medio de Fletcher®, para que en estudios posteriores puedan ser purificadas y caracterizadas por métodos fenotípicos y moleculares como el PCR.

Obregon (2003) y Rodríguez (2007) indican que el diagnóstico de la leptospirosis es muy difícil, siendo necesaria la confirmación microbiológica, clínica y epidemiológica. Por lo que en este estudio se utilizó la combinación de pruebas inmunológicas y bacteriológicas permitiendo demostrar la presencia de leptospira en las muestras clínicas.

Es importante mencionar que según la cinética de la infección por leptospira (ver anexo 4) el aislamiento se logra durante los primeros 10 días de iniciados los síntomas, sin embargo, se obtuvo un aislamiento entre el primer mes de haber presentado sintomatología e iniciado tratamiento antibiótico. Velasco y colaboradores en el 2009, demostraron que es posible el aislamiento de leptospiras durante este período y que a pesar de haber recibido tratamiento los pacientes evolucionaron hacia la cronicidad con recaídas en varias ocasiones, semanas o meses más tarde, ellos indican que durante el seguimiento siempre se observó leptospiras en sangre y orina y que fue posible obtener cultivos positivos.

Es importante mencionar que de las 9 muestras positivas se obtuvieron 4 aislamientos, usando únicamente dos tipos de medios y de acuerdo lo establecido por Goris, (2008), para aumentar la posibilidad de aislar leptospiras es necesario el uso de una batería de 5 medios de cultivo y la combinación de otros antibióticos inhibidores de contaminantes. Por lo que se recomienda ampliar el número de medios y el uso de otros antibióticos para garantizar un mayor número de aislamientos en futuras investigaciones.

La escases de estudios de esta naturaleza y la falta de vigilancia epidemiológica no permiten evaluar el impacto de la leptospirosis en el país, a pesar de ser considerada como un problema de salud. Por consiguiente, el presente trabajo contribuye al conocimiento de la epidemiología de esta zoonosis, por constituir el primer estudio de cepas de leptospiras aisladas en pacientes hospitalizados, evidenciando la existencia de casos de una infección activa y proporcionando a la comunidad médica datos útiles para que esta enfermedad sea considerada en el diagnóstico diferencial junto a otras enfermedades infecciosas y síndromes febriles.

Además, se hace énfasis en la necesidad de llevar a cabo estudios similares en las áreas consideradas hiperendémicas como las comunidades de Escuintla que según estudios realizados por Zelaya *et al.* se encontró una seroprevalencia por encima del 50%.

X. CONCLUSIONES

1. Se aislaron cuatro cepas de *Leptospira* spp. de las muestras de sangre de pacientes.
2. Los serogrupos y serovares de *Leptospira* sp. fueron *Tarassovi Tarassovi* (22.22%), seguido por *Pomona Pomona*, *Serjoe Hardjo*, *Autumnales Autumnales*, *Canicola Canicola* y *Australis Australis* (11.11% para cada uno).
3. Los signos y síntomas más frecuentes presentados por los pacientes diagnosticados con leptospirosis fueron fiebre (88.89%), vómitos (77.78%), cefalea (55.56%), ictericia (44.44%) y náuseas (44.44%).
4. El grupo etario donde se encontró la mayor positividad fue el de 20 a 29 años (55.56%), siendo el sexo femenino fue el más afectado (77.77%).
5. Las ocupaciones más afectadas fueron las amas de casa (22.22%) y los estudiantes (22.22%).

XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con los esfuerzos por lograr el aislamiento de *Leptospira* spp. de humanos y de los reservorios, que permitan determinar los serovares circulantes en el país, con el objetivo de mejorar el diagnóstico y tratamiento de la leptospirosis en Guatemala.
2. Efectuar estudios sobre aislamiento de *Leptospira* spp. en los principales centros hospitalarios del país, con el objetivo de obtener datos representativos que permitan establecer la epidemiología de la leptospirosis en el país.
3. Se recomienda el uso de un panel de 5 medios de cultivo, EMJH, EMJH + 5-fluoracilo, Fletcher®, EMJH + 1% suero de conejo + 1% suero bovino, EMJH + 1% suero de conejo + 1% suero bovino + 5-fluoracilo y la combinación de antibióticos, para disminuir la contaminación y aumentar las posibilidades de aislar las leptospiras.
4. Seleccionar el método más eficaz para lograr la purificación de las cepas aisladas en este estudio que permitan identificarlas mediante métodos fenotípicos y moleculares.
5. Es importante seguir fortaleciendo la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad en el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, así como reforzar los métodos diagnósticos existentes en el Laboratorio Nacional de Salud.

XII. REFERENCIAS

- Agudelo, P., Restrepo, B. y Arboleda, M. (2007). Situación de la leptospirosis en el Urabá Antioqueño Colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en la población general Urbana. *Cad Salud Pública*. 23(9), 2094-2012.
- Agudelo, P., Restrepo, M. (2007). Frecuencia de anticuerpos para 14 serovariedades de *Leptospira* spp. detectados por la prueba de microaglutinación en una serie de casos humanos de Antioquía, Colombia. *Revista CES Med*. 21(2), 7-13.
- Aguilar, V. (2004). Reacciones de Aglutinación. *Revista Medigracphic*. Gac. Med. Mex. 140 (3).
- Anzueto, A., Torres, M., y Bran, J. (1982). Leptospirosis humana en Guatemala. Primer Caso confirmado. *Revista USAC*, 33, 16.
- Barbosa, W. (1972). Leptospirosis. Epidemiología y Fisiopatología. *Revista Patología Tropical*. Brasil.
- Barrios, J. (2010). *Determinación de anticuerpos anti-Leptospira en pacientes con serología negativa a dengue, referidos al laboratorio nacional de salud en el año 2005*. (Tesis de Graduación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Boza, R. (1990). Leptospirosis Anictérica: Análisis de una epidemia en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*. 33(2).
- Brio, M. (1995). *Manual de bases Teórico-Prácticas de inmunocitoquímica*. Universidad de Oviedo.

- Caballero, A., y Romero, J. (1997). *Manual de Procedimientos de laboratorio del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE)*. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
- Cardona, M., *et al.* (2008). Diagnóstico de Leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico.
- Recuperado de <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v28n1/art06.pdf>
- Carrada, T. (2005). Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento. *Revista Mexicana Patología clínica*. 52(4), 246-256.
- Céspedes, M. (2005). Leptospirosis: Enfermedad zoonótica y reemergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 22(04), 290-307.
- Céspedes, M., Gleny, M., Felices, V., Balda, L. y Suarez, V. (2002). Prueba de Elisa Indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 19(1).
- Céspedes, M., Ormaeche, M., Condori, P., Balda, L. y Gleny, M. (2003). Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 20(4), 180-185.
- Céspedes, M., y Araujo, M., (2002). *Manual de Procedimientos Bacteriológicos y Serológicos para el Diagnóstico de la Leptospirosis*. Perú: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
- Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica. (2012). Manual de Procedimientos Estandarizados para la vigilancia Epidemiológica de la leptospirosis. México, DF. Dirección General de Epidemiología.

- Costa, F., Martínez, M., Hagan, J., Hartskeerl, R., Galvao, M. & Icksang, A. (2012). Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996-2005: a review of data from ministries of health. *Revista de Panama de Salud Pública*. 32(3), 169-77.
- De León, G. (2002). Leptospirosis. Las aguas de la explotación porcina como vehículo de la leptospira.
- Duany, L., Achón, M., Varén, A., Badell, E., Morales, N. y Bolaños, T. (2014). Aspectos clínicos y epidemiológicos de pacientes con leptospirosis en Cienfuegos 2001-2010. 12(4).
- Echeverría, M., López, M., Pérez, J., Pumarola, T., Cantera, E., et al., (2000). Leptospirosis, Consideraciones sobre el diagnóstico microbiológico a propósito de un caso. *Enfermedades Infecciosas de Microbiología Clínica*. 18(8), 423-24.
- Estrada, P. (2004). *Diagnóstico diferencial de leptospirosis humana y dengue de pacientes con enfermedad febril referidos al Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del área de salud de Escuintla*. (Tesis de Graduación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Farr, W. (1995). Leptospirosis. *Clin Infect Dis*, 21, 1-8.
- Farrar, E. (1995). *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica*. 4ed. New York: Bennett.
- Figuroa, M., Vargas, L., y Mendoza, L. (1984). *Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica*. Costa Rica: EUNED.
- Francois, S., Brihueg, B., Grune, S., Gattarello, M., Correa, D. y Petrakovsky, J. (2013). Aislamiento de leptospira borgpetersenii de fuentes de agua en Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 65(2), 177-184.

- Galindo, S. (2008). *Determinación de anticuerpos anti-Leptospira en donadores de sangre del Hospital General San Juan de Dios*. (Tesis de Graduación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- García, M., Kestler, R., Castillo, L., Herrera, M. y Pérez, A. (2013). Prevalencia de anticuerpos Anti-leptospira spp. en la población de dos asentamientos de la ciudad de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Dirección General de Investigación.
- García, M., Pérez, A., y Herrera, M. (2011). *Determinación de Anticuerpos IgG anti Leptospira en Poblaciones Urbanas de Guatemala*. (Tesis de Graduación, pendiente de publicación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- González, A. (2002). *Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros Hiperinmunes contra Leptospira interrogans*. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de vacunas y sueros. Cuba.
- González, S., y Orozco, C. (2010). *Aislamiento e Identificación de Leptospira interrogans en fuentes de agua en la aldea El Milagro, Masgua, Escuintla*. (Tesis de Graduación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Goris, M. (2008). Cultivo de Leptospira. Presentado en el 4º simposio y taller anual de leptospirosis. Habana, Cuba.
- Guerrant, R. (2002). *Enfermedades Infecciosas Tropicales*. España: Elsevier Harcourt.

- Hartskeerl, R. (2006). *Internacional Course on Laboratory Methods for The Diagnosis of Leptospirosis*. Kononklijk Instituut voor de Tropen / Royal Tropical Institute. Biomedical Research. Amsterdam, Netherlands.
- Hernández, M., García, V. y Mauri, J. (2012). Leptospirosis en humanos en el municipio Playa, La Habana 2000-2010. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 11(1), 94-103.
- Herrera, M. y Pérez, A. (2012). Seroprevalencia de la leptospirosis humana en un asentamiento ubicado en la ciudad de Guatemala. Proyecto de Investigación para optar al título de Química Bióloga de la Escuela de Química Biológica de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hidou, M. (1991). Acute adult respiratory distress syndrome in Leptospirosis. *Cah Anesthesiol*. 9:281-4
- INE. (2012). Caracterización estadística de Guatemala. Recuperado de <http://www.ine.gob.gt/index.php/estadisticas/caracterizacion-estadistica>
- Laguna, V. (2000). *Leptospirosis*. Módulos Técnicos. Serie Documentos Monográficos No.2. Perú: Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud.
- Levett, P. (2001). Leptospirosis. *Revista CMR*, 14(2), 296-326.
- Myers, D. (1985). *Leptospirosis: Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio*. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis. OPS/OMS.
- Nicodemo, A., Del Negro, G., y Amato, V. (1990). Trombocytopenia and Leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 32(4):252-259.
- Obregón, A., Fernández, C., Rodríguez, I., Rodríguez, J., Fernández, N. y Enrique, G. (2003). Importancia de la confirmación microbiológica de un brote de leptospirosis

- humana en la ciudad de Villa Clara. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 55(2), 96-9.
- Obregón, A., Fernández, C., Balbis, Y., Martínez, B., Rodríguez, J. (2004). Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de leptospirosis en Cuba. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Washington. 16:(4).
- Orantes, J. (2003). *Comparación de métodos para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes que asisten a la emergencia del hospital general San Juan de Dios*. (Tesis de graduación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control de la leptospirosis humana*. Brasil: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.
- Pecchini, F., Borghi, M., Bodini, B., et al (1992). Acute renal failure from Leptospirosis: New trends of treatment. *Clin Nephrol*. 18: 164.
- Perret, C., Abarca, C., Dabanch, J., Solari, V., García, P., Carrasco., et al. (2005). Prevalencia de factores de riesgo de leptospirosis en una población de riesgo de la región Metropolitana. *Revista de Medicina de Chile*. 133, 426-431.
- Plank, R., y Dean, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*, 1265-76.
- Ríos, R., Franco, S., Mattar, S., Urrea, M y Tique, V. (2008). *Seroprevalencia de leptospira sp., Rickettsia sp. Ehrlichia sp. En trabajadores rurales del departamento de Sucre, Colombia*. *Infect* 12(2).
- Rodríguez, Y. (2015). Leptospiras y formación de anillo de Dinger. Información facilitada por experto, Instituto Pedro Kourí, La Habana, Cuba.

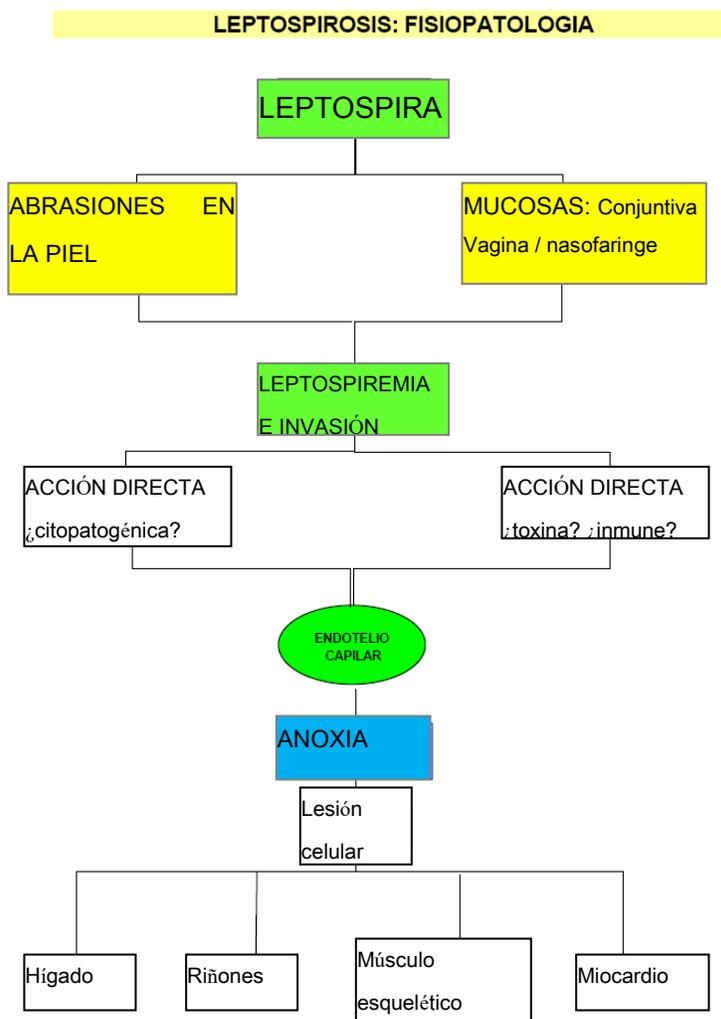
- Rodríguez, B., Gómez, H., Cruz, R. (2000). Leptospirosis Humana: ¿Un Problema de Salud? *Revista Cubana de Salud Pública*. 26(1). 27-34.
- Rodríguez, I., Fernández, C., Obregón, A., Zamora, Y., Rodríguez, J. y Rodríguez, N. (2007). Confirmación microbiológica de 2 brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba. *Revista Cuba de Medicina Tropical*. 59(1), 19-23.
- Saad, C., Morón, L., Parra, E., Higuera, L., y Pacheco, A. (2006). Leptospirosis Humana: Hallazgos Clínicos e Histopatológicos. En un caso y Revisión de Literatura. *Revista Colombiana de enfermería*.
- Sadow, K. y Ramírez, W. (2005). Leptospirosis. *Revista Electronica de Veterinaria*. 6(6), 1-65.
- Sanford, J. (1991). *Leptospirosis: Harrisons Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill.
- Sikahall, S. (2006). *Estandarización de la prueba de Aglutinación Microscópica en Placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana*. (Tesis de graduación). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala Guatemala.
- Silva, R. (2007). Seroprevalencia de Leptospirosis canina. Departamento de Salud Animal. *Archivo Medicina Veterinaria*. 39(3).
- Terpstra, J. (2008). *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. Río de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. VP/OPS/OMS.
- Torres, B. (1982). Leptospirosis humana primer caso reportado. *Revista Universidad de San Carlos de Guatemala*. 1, 5-10.
- Velasco, O., Rivas, B y Rivera, H. (2009). *Transición de la leptospirosis aguda a crónica: seguimiento de siete casos*. *Rev Mex Patol Clin*, 56(3):189-192.

- Watt, G., Padre, L., Triazon, M., y Cakyvaqyuki, C. (1990). Skeletal and cardiac muscle involvement in severe, late Leptospirosis. *J Infect Dis.* 161(1):2.
- Zamora, J. Leptospirosis: Actualización y situación en Chile. Documento facilitado por el autor.
- Zelaya, B., García, M., Villagrán, C., Velásquez, M., Sikahall, S., Galindo, S y Díaz, R. (2008). *Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua Escuintla.* FODECYT. 91(06):1-71.
- Zunino, E. y Pizarro, R. (2007). Leptospirosis: Actualización y situación en Chile. *Rev. Chil.infect*, 24(03):220-26.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1.

Figura No 1. Fisiopatología de la enfermedad producida por leptospira.



Fuente: Laguna, V. (2000). Leptospirosis. Módulos Técnicos. Lima.

ANEXO 2.

Fig. No.2 Anillo o Disco de Dinger en cultivos de *Leptospira* spp.

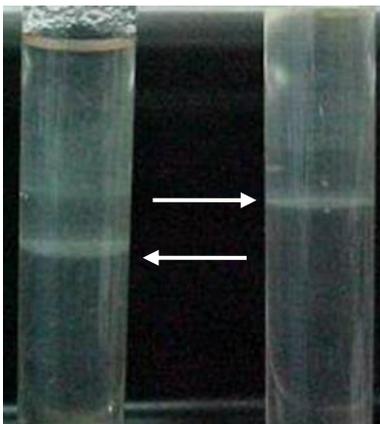


Figura 1. En los medios semisólidos la tensión de oxígeno provoca un área de mayor densidad de crecimiento de *Leptospira* spp., conocida como anillo o

ANEXO 3.

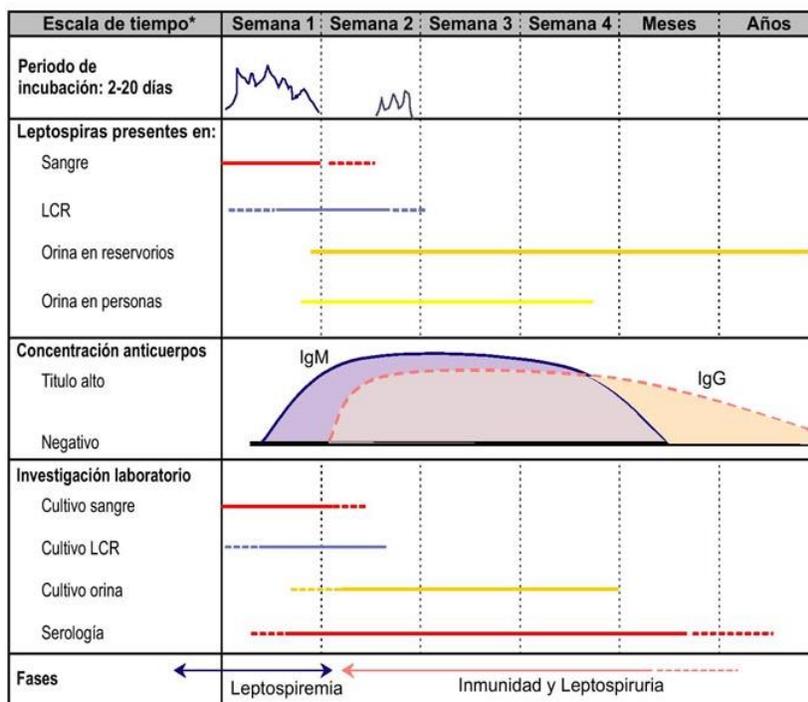
Tabla No. 1 Lectura por la prueba MAT

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

Fuente: Céspedes, M., y Araujo, M. (2002). Manual de Procedimientos Bacteriológicos y Serológicos para el Diagnóstico de la Leptospirosis. Instituto Nacional de Salud: Ministerio de Salud. Doc Tec. No. 34. Lima.

ANEXO 4.

Figura No. 3. Cinética de la infección por leptospira



Fuente: Céspedes, M., y Araujo, M. (2005). Manual de procedimientos bacteriológicos y serológicos para el diagnóstico de la leptospirosis. Perú. Instituto Nacional de Salud.

ANEXO 5.

Tabla No. 2 Condiciones de toma y envío de muestra para el diagnóstico bacteriológico y serológico de la leptospirosis.

| TIPO DE MUESTRA | PERÍODO DE TOMA | CANTIDAD | CONDICIÓN |
|---|--|-----------|--|
| SEROLOGÍA | | | |
| Suero agudo | 4 a 10 días del inicio de los síntomas. | 3mL | Estéril. Enviar congelado o a 4°C. |
| Suero convalesciente | 7 a 30 días después de la primera toma. | 3mL | Igual al suero agudo |
| AISLAMIENTO | | | |
| Sangre completa | Entre el 1er al 7mo día (período agudo febril de la fase septicémica). | 5mL | Estéril con anticoagulante EDTA. Heparina 2 gotas y oxalato de sodio 0.5mL de una solución al 1% a temperatura ambiente. No usar citrato* |
| Líquido cefalorraquídeo | 5 a 10 días desde el inicio de los síntomas. | 0.5 – 1mL | Estéril, enviar a temperatura ambiente dentro de los 4 días de su obtención. |
| Orina | 14 – 28 después del inicio de la enfermedad. | 50mL | Estéril, enviar a temperatura ambiente, dentro de las 2 horas de su obtención. |
| EN CASO DE FALLECIMIENTO | | | |
| Tejido (riñón, hígado, médula, hueso largo y globo ocular). | Al practicar la necropsia. | ± 2mL | Estéril, enviar a 4°C en recipientes estériles y bien cerrados en un plazo máximo de 6 horas. Para estudios histopatológicos, enviar 2mL de cada tejido en 5mL de formol al 10%. |

Fuente: Céspedes, M., y Araujo, M. (2002). Manual de Procedimientos Bacteriológicos y Serológicos para el Diagnóstico de la Leptospirosis. Lima.

* Enviar inmediatamente al laboratorio. De no ser posible, remitir máximo dentro de los 5 días siguientes. Para el envío de muestras al Laboratorio de Referencia revisar el Manual de normas y procedimientos para la toma de muestras y su envío al Laboratorio Nacional de Salud, elaborado por la Unidad Central de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica (UCREVE) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

ANEXO 6.

Tabla No. 3 Listado de serovariedades empleados para la prueba de MAT

| No. | Especie | Serogrupo | Serovar | Cepa |
|-----|--------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| 1H | <i>L. interrogans</i> | Australisg | Australis | Ballico |
| 2H | <i>L. interrogans</i> | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | RGA |
| 3H | <i>L. noguchii</i> | Luisiana | Lanka | R740 |
| 4H | <i>L. borgpetersenii</i> | Ballum | Ballum | Mus 127 |
| 5H | <i>L. interrogans</i> | Bataviae | Bataviae | Swart |
| 6H | <i>L. interrogans</i> | Pomona | Mozdok | 5621 |
| 7H | <i>L. meyeri</i> | Ranarum | Ranarum | ICF |
| 8H | <i>L. interrogans</i> | Serjoe | Hardjo | Hardjoprajitno |
| 9H | <i>L. interrogans</i> | Djasiman | Djasiman | Djasiman |
| 11H | <i>L. interrogans</i> | Hebdomadis | Hebdomadis | Hebdomadis |
| 12H | <i>L. interrogans</i> | Canicola | Canicola | Hond Utrech IV |
| 14H | <i>L. kirschneri</i> | Cynopteri | Cynopteri | 3522C |
| 17H | <i>L. gorgpetersenii</i> | Tarassovi | Tarassovi | Perepelitsin |
| 18H | <i>L. weilii</i> | Manhao | Lincang | L14 |
| 21H | <i>L. borgpetersenii</i> | Javanica | Javanica | Veldrat Batavia |
| 22H | <i>L. interrogans</i> | Autumnales | Autumnales | Akiyami A |

Fuente: Cepario proporcionado por el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS) y el Laboratorio Nacional de Referencia del MINSAL De El Salvador. El cepario fue donado al LNS por el Laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto de Medicina Tropical de Holanda.

ANEXO 7. Consentimiento Informado

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>Figura 1. En los medios semicálidos la tensión de</p> | <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Escuela de Química Biológica</p> |
| CONSENTIMIENTO INFORMADO | |
| <p>No. Historia clínica _____ Servicio: _____ Fecha: _____/_____/_____</p> | |
| Título de la Investigación: | |
| <p>Aislamiento e identificación de <i>Leptospira</i> spp. en pacientes guatemaltecos atendidos en hospitales nacionales de la ciudad de Guatemala.</p> | |
| Objetivos de la Investigación: | |
| <p>El objetivo de la investigación es demostrar la presencia de <i>Leptospira</i> spp. en muestras clínicas de sangre de pacientes que asistan al Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD), a través de su aislamiento e identificación.</p> | |
| Riesgos y Beneficios: | |
| <p>Las muestras que se obtendrán serán: una muestra de sangre. Las muestras de sangre serán tomadas en los primeros 7 días de iniciados los síntomas y signos compatibles con leptospirosis en pacientes sin tratamiento antibiótico previo. En ningún momento la toma de muestra representará algún peligro para la salud. Por lo tanto, el estudio no conlleva ningún riesgo y el participante no recibirá ningún beneficio económico. La participación es totalmente voluntaria.</p> | |
| Confidencialidad: | |
| <p>El proceso en todo momento será estrictamente confidencial. Y los resultados no serán impresos de ninguna manera que comprometa el anonimato de los participantes.</p> | |
| A quién contactar en caso de preguntas: | |
| <p>Yndira Gálvez García, Br. Gabriela Solórzano Paz, Br.</p> | |
| <p><i>Si desea participar en el estudio, favor llenar el registro abajo descrito y devolver al médico tratante.</i></p> | |

AUTORIZACIÓN

Me han leído el procedimiento descrito en los párrafos anteriores y lo he comprendido. Los investigadores me han explicado y han resuelto mis dudas. Voluntariamente doy mi consentimiento para que las muestras e información que brinde sean usadas en el estudio “*Aislamiento e identificación de Leptospira spp. en pacientes guatemaltecos atendidos en hospitales nacionales de la ciudad de Guatemala*”. He recibido copia de este procedimiento.

Nombre completo: _____

Número de cédula o DPI: _____ Extendida en: _____

Firma del participante

Fecha: _____ / _____ / _____

día mes año

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de
consentimiento informado

Firma del informante

Fecha: _____ / _____ / _____

día mes año

Original: estudio Copia: participante

ANEXO 8. Ficha Epidemiológica



Universidad de San Carlos de Guatemala
 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
 Escuela de Química Biológica
 Departamento de Microbiología



Aislamiento e identificación de *Leptospira* spp. en pacientes guatemaltecos atendidos en hospitales nacionales de la ciudad de Guatemala

INSTRUCCIONES: Escriba en el espacio en blanco la información que se solicita. Marque con una X las opciones que se aplican a los incisos que correspondan según las manifestaciones del paciente. Toda la información recolectada en este estudio es estrictamente CONFIDENCIAL.

No. De historia clínica: _____ Servicio: _____ Fecha: __/__/__

A. Datos generales del paciente:

Nombre completo: _____ Cédula o DPI: _____

Edad: _____

Sexo: M

| |
|----------------|
| Ciencias |
| Químicas y Hos |

Residencia: _____

B. Detalles clínicos:

- | | | |
|--|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ictericia | <input type="checkbox"/> Mialgia | <input type="checkbox"/> Cefalea |
| <input type="checkbox"/> Fiebre | <input type="checkbox"/> Petequias | <input type="checkbox"/> Nauseas |
| <input type="checkbox"/> Vómitos | <input type="checkbox"/> Hipotensión | <input type="checkbox"/> Convulsiones |
| <input type="checkbox"/> Anorexia | <input type="checkbox"/> Gripe | <input type="checkbox"/> Fallo renal |
| <input type="checkbox"/> Daño hepático | <input type="checkbox"/> Sufusión conjuntival | <input type="checkbox"/> Otros: _____ |

C. Ocupación:

- | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Agricultor | <input type="checkbox"/> Pescador | <input type="checkbox"/> Ama de casa |
| <input type="checkbox"/> Veterinario | <input type="checkbox"/> Granjero | <input type="checkbox"/> Médico |
| <input type="checkbox"/> Otro: _____ | | |

D. Contacto con animales:

- Ganado Ratones Perros
 Gatos Ovejas Peces
 Otros: _____

E. Contacto con agua:

- Lagos Ríos Aguas residuales
 Otros: _____

F. Viajes:

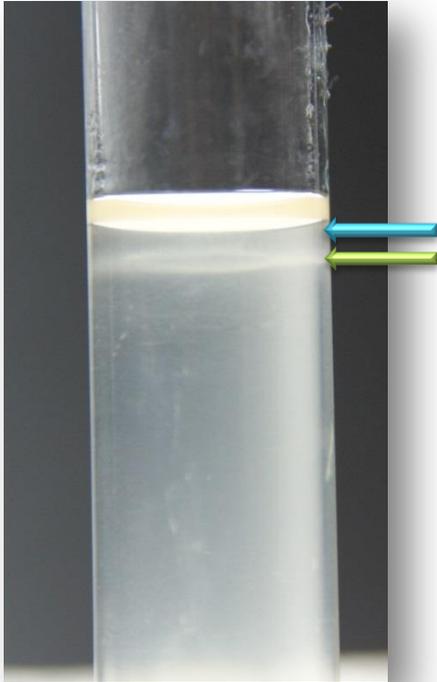
- Sí No Dentro del país, especifique: _____
 Fuera del país, especifique: _____

ANEXO 9.

Figura 4. Crecimiento de *Leptospira* spp. en medio semisólido Fletcher®



Figura 5. Anillo de Dinger



Interfase

Anillo de Dinger

Cepa de *Leptospira* spp. en medio semisólido Fletcher® aislada de hemocultivo de paciente hospitalizado en el HGSJDD. Puede observarse la formación del anillo de Dinger.

Fotografía: *Roberto A. Cáceres Staackmann.*