

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



**Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en pacientes  
atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación**

**Karen Lorena Natareno Vásquez  
Astrid Lucía Hernández Estrada  
Bertha Laura Nalleli de León Ramos**

**QUÍMICAS BIÓLOGAS**

**Guatemala, octubre de 2016**

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 figure of a man in a cap and robe, surrounded by various symbols including a castle, a lion, and a cross. The Latin motto "CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEM" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Aislamiento e identificación de *Leptospira interrogans* en pacientes  
atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

Karen Lorena Natareno Vásquez

Astrid Lucía Hernández Estrada

Bertha Laura Nalleli de León Ramos

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

**QUÍMICAS BIÓLOGAS**

Guatemala, Octubre de 2016

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>III.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	4
	A. Generalidades.....	4
	B. Agente etiológico.....	4
	C. Transmisión de la leptospirosis.....	8
	D. Patogenia.....	9
	E. Manifestaciones clínicas.....	12
	F. Diagnóstico clínico.....	15
	G. Diagnóstico de laboratorio.....	16
	H. Medios de cultivo.....	21
	I. Muestras de laboratorio.....	24
	J. Tipificación.....	26
	K. Tratamiento.....	28
	L. Medidas de control y prevención.....	28
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>VI.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	46
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	49
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	53
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	54
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	65

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

**Decano**

M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza

**Secretaria**

MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo

**Vocal I**

Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

**Vocal II**

Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera

**Vocal III**

Br. Andreina Delia Irene López Hernández

**Vocal IV**

Br. Carol Andrea Betancourt Herrera

**Vocal V**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por ser nuestro guía y darnos la oportunidad de terminar nuestra carrera universitaria. Por ser nuestra fuente de fortaleza, por acompañarnos en cada paso y por brindarnos paciencia y sabiduría.

### **A nuestros padres**

Jaime Natareno y Martha Vásquez, Félix Hernández y Aracely Estrada, Antonio De León y Bertha Ramos, por su apoyo incondicional y su comprensión en cada momento de nuestra vida.

### **A nuestros hermanos y hermanas**

Por su compañía, apoyo y cariño además de su amistad para toda la vida.

### **A la Universidad de San Carlos de Guatemala**

En especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por ser la institución que nos brindó los conocimientos y enseñanzas necesarias para nuestra formación académica.

### **A todas las personas e instituciones colaboradoras**

Por brindarnos su apoyo y ayuda incondicional en todo momento.

## I. RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana causada por los miembros patógenos del género *Leptospira*. Debido a la diversidad de manifestaciones clínicas y a la similitud que presenta con otros síndromes febriles como el dengue, influenza, hepatitis, neumonías, entre otros, es necesario que además de contar con los antecedentes epidemiológicos, se realicen pruebas de laboratorio como el aislamiento de las leptospiras y la detección de anticuerpos para lograr establecer un diagnóstico definitivo.

En Guatemala, se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* tanto en poblaciones rurales como urbanas donde las condiciones para su transmisión son favorables. Sin embargo, no se han realizado estudios para identificar la leptospirosis en niños, por lo que esta investigación tuvo como objetivo principal determinar la presencia de *Leptospira interrogans*, a través de su aislamiento e identificación, en pacientes infantiles sospechosos de padecer leptospirosis que cumplieron con los criterios de selección, como fueron: fiebre sin razón específica, mialgia y cefalea intensa principalmente.

Se evaluaron un total de 40 pacientes, 32 (80.0%) fueron atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación (HIIR), y 8 (20.0%) en el Hospital Juan Pablo II. De la población estudiada 26 pacientes fueron de sexo masculino y 14 de sexo femenino, comprendidos entre las edades de 1 a 15 años. La mayoría (37) provenían de la ciudad capital (92.5%) y los 3 restantes del interior de la república (7.5%).

Las muestras fueron cultivadas para lograr el aislamiento de las leptospiras y su posterior identificación a través de la prueba de aglutinación microscópica (MAT). Para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* se realizó inicialmente una prueba de ELISA IgM y confirmada posteriormente con la prueba de MAT. Ambas pruebas fueron no reactivas en el total de pacientes estudiados.

Considerando que tanto la detección de anticuerpos como el aislamiento fueron negativos, se procedió a analizar el expediente clínico de cada paciente con el objetivo de establecer el diagnóstico conclusivo, se encontró que la mayoría fueron diagnosticados y

tratados como dengue clásico (42.5%), seguido de fiebre de origen desconocido (FOD) (27.5%), hepatitis A (15.0%), insuficiencia renal (7.5%), influenza (5.0%) e infección urinaria (2.5%).

Los sueros de los pacientes diagnosticados con Fiebre de Origen Desconocido (FOD), fueron analizados con la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la cual no se detectó ninguna secuencia de ADN de leptospiras, por lo que se confirmó que dichos pacientes no padecían leptospirosis aguda.

Los signos y síntomas que se presentaron con mayor frecuencia en los pacientes estudiados fueron, fiebre en el 100.0% de los casos, seguido de cefalea (95.0%), mialgias (82.5%), vómitos (67.5%) y náuseas (62.5%).

A pesar de que no se detectaron casos de leptospirosis aguda en la población infantil estudiada, existen zonas dentro de la ciudad capital donde se ha demostrado que dicha enfermedad es una de las zoonosis endémicas de mayor importancia, lo que representa un impacto sobre la salud, en especial en niños y ancianos del país, por lo que es preciso continuar con un monitoreo de forma periódica de la mencionada enfermedad y así poder garantizar que los síndromes febriles sean identificados correctamente.

## II. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis endémica asociada a cambios climáticos, actividades recreativas y características socioeconómicas. Es causada por especies patógenas del género *Leptospira* que pueden infectar a la mayoría de mamíferos, cuando éstos entran en contacto directo o indirecto con agua o suelo contaminado con orina de hospederos adaptados y reservorios de la infección (Céspedes y Mendoza, 2011; Daher et al., 2010).

La presentación clínica descrita en varios estudios sobre niños con leptospirosis, incluye síntomas inespecíficos como fiebre, la cual constituye el síntoma inicial de la infección, cefalea, mialgia generalizada, ictericia y vómitos (Guerrier et al., 2013; de Vries et al., 2014). Estos síntomas pueden confundirse fácilmente con otras enfermedades febriles tales como influenza, dengue, hepatitis virales, neumonías, entre otras (OMS, 2008).

Desde el primer caso de leptospirosis en Guatemala en el año de 1980, se han realizado estudios de seroprevalencia donde se han reportado anticuerpos anti-*Leptospira* tanto en poblaciones rurales como urbanas. En el año 2012 Herrera y Pérez detectaron una seroprevalencia de 7.56% en una población entre 6 y 15 años, y en el 2015 Solórzano y Gálvez reportaron leptospirosis en el 7.31% de pacientes febriles menores de 19 años, lo cual es un indicio de que la circulación de leptospiras sobre la población infantil es activa.

Por lo anterior el presente trabajo tuvo como principal objetivo determinar la presencia de *L. interrogans* en 40 pacientes infantiles sospechosos de padecer leptospirosis, a través del aislamiento y la detección de anticuerpos anti-*Leptospira*, utilizando las pruebas de ELISA IgM y de MAT.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades

La leptospirosis es una zoonosis endémica, reemergente de distribución universal y con presentación ocasionalmente epidémica. Su resurgimiento se ha atribuido a factores exógenos como el clima, la constitución del suelo y la exposición del hombre al contacto directo o indirecto con los reservorios naturales (Zunino y Pizarro, 2007).

Es causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* que afecta alrededor de 160 especies principalmente roedores y animales domésticos en especial a los caninos, el ganado bovino y el porcino, los cuales constituyen el reservorio y la fuente de infección para el hombre (Bharti, Nally, Ricaldi, Mathias, Diaz, Lovett & Vinetz, 2003).

Como consecuencia de la infección, las leptospiras colonizan los túbulos renales de los reservorios y son eliminadas por la orina contaminando el ambiente, dichas especies se convierten en portadores urinarios transitorios o pueden ser portadores permanentes, como es el caso de los roedores (Meites, Jay, Deresinki, Shieh, Kaki, Tompkins & Scott, 2004).

#### B. Agente etiológico

El género *Leptospira* comprende dos especies: *L. biflexa*, especie saprobia de vida libre y *L. interrogans* de gran importancia para el hombre y animales, ya que es la única especie patógena del género (Carrada, 2005).

Las leptospiras son bacilos gram negativo, móviles, aerobios estrictos, miden aproximadamente 0,1 micras de ancho y 12 micras de longitud y se caracterizan por su morfología filiforme y helicoidal, poseen curvaturas en forma de gancho en sus extremos que facilitan su penetración en tejidos y dos flagelos que le dan una gran movilidad. Se tiñen mal con la mayoría de tinciones y requieren de medios de cultivo especiales, donde crecen con dificultad y lentitud (Roca, 2006).

La estructura del ADN permite clasificarlos en 15 genomoespecies y su composición antigénica permite clasificarlos en 25 serogrupos y 200 serotipos. Estas clasificaciones, especialmente la antigénica, poseen cierto interés epidemiológico (Roca, 2006).

## 1. Epidemiología

A nivel mundial los datos de incidencia de la leptospirosis son diversos y dependen de las características particulares de cada zona geográfica, pero se ha establecido que es mayor la incidencia en regiones tropicales y que se presenta tanto en países industrializados como en vías de desarrollo (Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles, 2011).

Aunque clásicamente la enfermedad se asocia a ambientes rurales y ocupaciones agrícolas y mineras, en los últimos años ha emergido en ambientes urbanos, con brotes epidémicos asociados con la presencia de roedores, período de lluvias e inundaciones y actividades recreacionales, especialmente con el baño en aguas estancadas u otras actividades acuáticas ya sea recreativas o deportivas (Zunino y Pizarro, 2007).

A pesar de que a la leptospirosis se le ha identificado como enfermedad profesional, varios estudios han demostrado que suele ser frecuente en niños y en amas de casa de aquellas áreas en donde las condiciones epidemiológicas favorecen su transmisión (Suárez, Rodríguez, Menéndez, Marrero y Alonso, 2006).

Es pertinente mencionar que la infección está difundida en la infancia más de lo que se cree ya que en varios estudios sobre leptospirosis infantil, se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en niños, lo cual indica que estos han estado en contacto con la espiroqueta (Suárez et al., 2006). En El Caribe por ejemplo, se ha reportado una mayor prevalencia de anticuerpos en niños que en adultos (White & Wilson, 2002) y en Río de Janeiro se han reportado casos con evidencia serológica de infección aguda (Cruz, Andrade & Pereira, 2003).

### a. Estudios realizados en Guatemala

Torres (1982), detectó el primer caso de leptospirosis humana en Guatemala. El diagnóstico se realizó mediante la observación directa de las leptospiras por microscopía de campo oscuro y se demostró la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* mediante la prueba de MAT, donde se identificó *L. interrogans* serovariedad *Coppenagheni* como el agente causal de la infección.

Orantes en el año 2003 comparó los métodos de microscopía de campo oscuro y aglutinación en látex, con el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) IgM

para el diagnóstico de leptospirosis, analizando muestras de pacientes con sospecha de leptospirosis que asistieron a la emergencia del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD). El 73.33% de los pacientes fueron positivos, sin embargo los métodos presentaron una baja especificidad, por lo que se determinó que no eran adecuados para el diagnóstico, además no se utilizó la prueba de MAT para la confirmación de los casos.

Estrada (2004), llevó a cabo un estudio para demostrar que la enfermedad febril podría ser causada por leptospirosis además del virus del dengue. Dicho estudio se llevó a cabo con muestras de sueros de pacientes referidos al Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del Área de Salud de Escuintla, de las cuales el 9.52% presentó anticuerpos contra *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*. Determinando que es importante incluir pruebas específicas para el diagnóstico de leptospirosis.

Sikahall en el año 2006 estandarizó la prueba de MAT para el diagnóstico de leptospirosis humana. El estudio estuvo constituido por 4 grupos de 30 muestras cada uno, y se obtuvo un 25% de reactividad, encontrando las serovariedades *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*, *Bataviae* y *Pyrogenes*. En el grupo control el 10% presentó anticuerpos anti-*Leptospira*, con lo que se demostró que la leptospirosis es una zoonosis más frecuente de lo esperado.

Zelaya, García, Villagrán, Velásquez, Sikahall, Galindo y Díaz (2007), evaluaron la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* spp en 199 pobladores de la aldea El Milagro Escuintla, encontrando una seroprevalencia de 51.8% mediante las pruebas de MAT y ELISA IgG. Se muestrearon también especies animales y se obtuvo una seroprevalencia de 54.9%, especialmente en la población canina, seguida por la bovina y suinos.

Galindo en el año 2008 demostró la frecuencia de serogrupos de *Leptospira* en donadores de sangre del HGSJDD, mediante la prueba de MAT. Los serogrupos que se encontraron fueron *Icterohaemorrhagiae*, *Hebdomadis*, *Serjoe*, *Canicolay* *Bataviae*, demostrando así la circulación de *L. interrogans* en el país.

Barrios en el año 2010 determinó anticuerpos anti-*Leptospira* en pacientes de hospitales nacionales, referidos al Laboratorio Nacional de Salud (LNS) en el año 2005. Además demostró los diferentes serogrupos de *Leptospira* mediante la prueba de MAT y estableció

los síntomas y signos más frecuentes. De las 48 muestras, 18 fueron reactivas, identificando los serogrupos *Hebdomadis*, *Serjoe*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pyrogenes* y *Canicola*. Siendo los principales síntomas y signos encontrados: fiebre, escalofrío, dolor de cuerpo y dolor de cabeza.

González y Orozco (2010) realizaron un estudio con el objetivo de aislar *L. interrogans* en fuentes de agua de la aldea El Milagro, Escuintla, en donde se estableció que existe una alta seroprevalencia de leptospirosis tanto en la población humana (52%) como en la población animal (54.9%). Se procesaron 29 muestras, logrando aislar dos cepas de *L. biflexa*. El aislamiento de cepas no patógenas, permite inferir que están dadas las condiciones para que las patógenas puedan desarrollarse.

Herrera y Pérez (2012) determinaron la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira*, los serovares circulantes y los factores que contribuyen a la leptospirosis, en habitantes del asentamiento 15 de Enero. Se determinó una seroprevalencia del 30.3%, identificando los serovares *Australis* y *Lanka* como los más frecuentes. No se encontró asociación entre los factores de riesgo y la presencia de anticuerpos. Sin embargo, la presencia de roedores en las viviendas probablemente contribuye a la infección.

García, Kestler, Castillo, Herrera y Pérez (2013a) estimaron la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* y los serovares circulantes, en dos asentamientos con ubicación topográfica de alto riesgo (Santo Domingo “El Tuerto” zona 2 y Manuel Colom Argueta zona 1). Para evaluar la presencia de anticuerpos se usaron las pruebas de MAT y de ELISA IgG. En ambos asentamientos se obtuvieron altas seroprevalencias que son comparables con las reportadas en áreas hiperendémicas de otros países. Los principales serovares detectados en Manuel Colom Argueta fueron *Icterohaemorrhagiae*, *Bataviae* y *Grippotyphosa*. Y en Santo Domingo “El Tuerto” *Djasiman*, *Javanica*, *Icterohaemorrhagiae*, *Cynopteri*, *Tarassovi*, *Hebdomadis* y *Hardjo*, lo cual demuestra la diversidad de serovares que se encuentran circulando.

## **2. Taxonomía**

El género *Leptospira* (Gr. Lepto = fino y espira = espiral) pertenece a la familia *Leptospiraceae* y al orden *Spirochaetales*. Actualmente, su clasificación está basado en la homología del ADN y está dividido en 17 especies, definido en 70% de homología y 5% de divergencia en el ADN (Anexo 1) (Bharti et al., 2003).

El avance en la biología molecular ha permitido también secuenciar su genoma, que consiste de dos cromosomas circulares (Nascimento, Ko, Martins, Monteiro-Vitorello, Ho & Haake, 2004). No obstante, esta clasificación coexiste con la clasificación antigua, por lo que la clasificación de nuevos aislamientos deben de caracterizarse por pruebas moleculares y serológicas (Céspedes, 2005).

## **3. Estructura antigénica**

El género *Leptospira* posee varios antígenos expresados en su superficie, predominando los lipopolisacáridos (LPS), responsables de la diversidad de serovariedades debido a las diferencias en su estructura y composición. Y las proteínas de membrana externa (OMPs), como OmpL1 y LipL41, que se encuentran en distintas especies patógenas (Carrizo, Bryhuela, Etchechoury, Arese, Romero, Gioffre y Kaimi, 2009).

Se ha demostrado que los LPS otorgan inmunidad, pero ésta es específica para cada serovariedad. Debido a ello, las investigaciones en antígenos han conducido a que las OMPs son capaces de estimular una respuesta inmune heteróloga, que podrían utilizarse para desarrollar productos recombinantes que permitan realizar serodiagnósticos, así también para elaborar vacunas dirigidas a la prevención de la leptospirosis (Cinco, 2010).

## **C. Transmisión de la leptospirosis**

La infección en el hombre se produce ya sea de forma directa o indirecta. La forma directa se presenta cuando entra en contacto con animales infectados y sus secreciones. Sin embargo, la forma más común es la forma indirecta, que se produce al estar en contacto con agua, terrenos o lugares contaminados por la orina de animales infectados (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2008).

Las leptospiras invaden al huésped a través de, abrasiones en la piel sana, de las membranas mucosas o conjuntivas y de los pulmones (después de la inhalación de fluidos aerosolizados) (Zunino y Pizarro, 2007).

Reportes recientes señalan que la transmisión suele estar relacionada con ciertos períodos del año, principalmente durante la época lluviosa, períodos de inundación, el final del verano y otoño. Con lugares de alta población de animales que son reservorio. Con grupos de población vulnerable como aquellos con precarias condiciones de vivienda, sin saneamiento y que están expuestos a mayor contacto con roedores (Meites et al., 2004).

#### **D. Patogenia**

Después de la penetración de las leptospiras en el organismo, éstas se difunden con rapidez e invaden el torrente sanguíneo diseminándose por los tejidos, con una localización especial en el riñón, el hígado, el pulmón, el corazón y los músculos esqueléticos (Marotto, Ko, Murta, Seguro, Prado, Barbosa & Eluf, 2010).

La migración de bacterias, toxinas, enzimas o productos antigénicos, conducen a una permeabilidad vascular aumentada, manifestación precoz y constante de la enfermedad, donde predomina la lesión vascular de tipo capilar, responsable de edema y de diátesis hemorrágica (Silva, Santos, Athanzio, Seyffert, Seixas, Cerqueira, Fagundes, Reis & Dellagostin, 2008; Rocha, Spichler & Athanzio, 2010).

Estudios comparativos de biología molecular, entre cepas patógenas y saprobias, han revelado un alto número de factores de virulencia implicados, entre los que destacan las enzimas con actividad como hemolisinas, fosfolipasas, catalasas, hialuronidasas y colagenasas (Hung, Chang, Tian, Wu, Yu, Pan & Yang, 2006).

Investigaciones recientes, sugieren que la gravedad de la leptospirosis podría relacionarse con la intensidad de la respuesta inmune, a través de la formación de inmunocomplejos, la liberación de citoquinas y la generación de vasculitis autoinmune. Así mismo los signos y síntomas del compromiso pulmonar, renal y hepático, aparecen en la fase inmune cuando comienzan a detectarse las aglutininas (Malajov, Panin y Sovoliova, 2007).

## **1. Fisiopatología de la enfermedad**

La fisiopatología de la enfermedad es poco conocida y es probable que estén en juego varios mecanismos fisiopatológicos que actúan complementariamente y se deba a la acción directa del microorganismo, cuyo poder invasivo puede estar relacionado con su constitución o con su estructura química y antigénica; a las toxinas producidas o liberadas después de su lisis, o secundaria a la lesión capilar (Laguna, 2000).

### **a. En el riñón**

El riñón es el principal blanco de las leptospiras, siendo el daño de este una manifestación temprana de leptospirosis sistémica (Yang, Hsu & Pan, 2005). La incidencia de insuficiencia renal aguda (IRA) varía ampliamente, pudiendo alcanzar entre un 40-86% en casos severos. Aunque la nefritis túbulo intersticial parece ser la causa principal de la IRA, la hipotensión severa también es un factor importante para el desarrollo de complicaciones. Estudios en conejos con leptospirosis han demostrado daño de células tubulares, nefritis túbulo intersticial, asociada a daño micro vascular, particularmente en la unión cortico-medular (Sitprija, 2006).

### **b. En el hígado**

La manifestación principal de las alteraciones hepáticas se refleja por ictericia, la cual ocurre en los casos más graves y se debe a la disfunción hepatocelular. El daño hepático en apariencia es subcelular y las leptospiras 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 (Laguna, 2000).

### **c. En el aparato cardiovascular**

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

#### **d. En el pulmón**

La neumonía es una presentación frecuente en casos de leptospirosis, es observada entre el 20 y 70% de los casos (Dolhnikoff, Mauad, Bethlem & Ribeiro, 2007). Se manifiesta en su forma más grave por un cuadro de neumonía hemorrágica, importante causa de letalidad, que parece estar relacionada con la acción de una toxina sobre la pared capilar. Siendo las lesiones 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 estas áreas (Perret, Abarca, Dabanch, Solari, García, Carrasco, Olivares y Avalos, 2005).

#### **e. Fenómenos hemorrágicos**

Son responsables por la severidad de la enfermedad y parecen ser secundarios de la agresión capilar. El compromiso endotelial puede iniciar la adhesión y la agregación plaquetaria, activando los mecanismos de coagulación y fibrinólisis (Guerrant, 2002).

En estudios recientes se implica a la “reacción de Jarisch-Herxheimer” como uno de los mecanismos fisiopatológicos relacionados a formas graves, que se caracteriza por una fiebre repentina y transitoria con lesiones cutáneas asociada a la administración de antibióticos. Además la presencia de una sustancia llamada “endotoxin-like” en la espiroqueta estimula la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral cuyo papel es decisivo en la mediación de la respuesta inflamatoria induciendo así la producción de otras citocinas, como interleucina 1 y 6 (Romero, Sánchez y Hayek, 2010).

En síntesis la lesión vascular asociada a la plaquetopenia, constituye la principal causa de hemorragias. El sangrado puede resultar de disturbios de los factores de la coagulación, secundarios a deficiencias en la síntesis hepática o de las lesiones vasculares (Abuauad, Osorios, Rojas y Pino, 2005).

## **2. Anatomía patológica**

Los hallazgos morfológicos están relacionados con alteraciones de la microcirculación, caracterizadas por una inflamación necrotizante (con destrucción celular) en todos los órganos y sistemas (Pumarola y Jiménez, 2002).

**a. Patología renal**

Las lesiones anatomopatológicas básicas son necrosis tubular aguda y nefritis intersticial, suelen iniciarse dentro de los glomérulos, luego surgen las alteraciones en los túbulos intersticiales, causadas por la migración de las leptospiras dentro de los capilares peritubulares para el intersticio y túbulos (Laguna, 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 daño tubular que en ocasiones puede ser prominente la pérdida de bicarbonato. La patogenia corresponde a diversos mecanismos como la asociación de hipovolemia e hipotensión (Saad, Morón, Parra, Higuera y Pacheco, 2006).

**b. Patología hepática**

Se presenta colestasis con trombos biliares, dilatación, tortuosidad del árbol biliar y lesiones hepáticas, alteraciones que tienen una localización centro lobular predominante. Así mismo se presenta regeneración hepatocitaria, alteración de la estructura sinusoidal y proliferación kupfferiana (Laguna, 2000).

Las lesiones del hepatocito son de carácter inespecífico y se asemejan a las encontradas en la hepatitis viral y en la colestasis medicamentosa, lesionando las microvellosidades de los polos biliar y sinusoidal, membrana celular, capilar biliar, retículo endoplásmico y mitocondrias (Laguna, 2000).

**E. Manifestaciones clínicas**

La leptospirosis presenta cuadros clínicos diversos, conforme al tropismo del agente, intensidad de la infección y posiblemente de las condiciones inmunitarias del hospedero (Levett, 2004). Es una enfermedad bifásica, con dos tipos de presentación: el 90% de los pacientes desarrolla la forma más leve (forma anictérica), mientras que el 5-10% desarrolla la forma grave (forma ictérica) también llamada enfermedad o síndrome de Weil (Caíno, Cursio y Siquiroff, 2006).

El período de incubación es de 5 a 14 días (máximo de 2 a 30 días) (OMS, 2008). Transcurrido este periodo da inicio la fase séptica, que dura de 4 a 7 días, durante esta se pueden aislar leptospiras de sangre, LCR y tejidos, siendo las características principales de tipo gripal. Posteriormente aparece una etapa intermedia, en la cual algunas veces el paciente se presenta afebril por 1 o 2 días. La segunda fase es la inmune, que dura de 4 a 30 días, durante la cual las leptospiras desaparecen de la sangre y LCR siendo posible encontrarlas en el riñón, orina y humor acuoso, también se desarrollan los anticuerpos circulantes presentándose afección renal, hepática, meningitis y uveítis. La fiebre suele ser baja y dura de 1 a 3 días (Lemarroy y Carrillo, 2003).

### **1. Leptospirosis anictérica**

Es la forma leve de la leptospirosis y ocurre durante la fase séptica. Se caracteriza por ser de inicio súbito con fiebre alta, cefalea intensa y mialgias que comprometen la región paraespinal, abdomen y cuello, además de malestar general y astenia. Estos signos y síntomas se mantienen por 4 a 7 días, y puede que no pase a la fase inmune (Levett, 2004).

La aparición de vómitos, dolor abdominal y náuseas ocurren hasta en el 95% de los casos (muy inespecífico). La hepatomegalia (<15%) y la esplenomegalia (<22%) son poco frecuentes en la forma anictérica (Laguna, 2000).

En ocasiones se presenta diarrea. Menos frecuentemente: irritación faríngea, linfadenopatías, hemorragias cutáneas y rash maculopapular o urticarial en el tronco. Lo más frecuente es la sensibilidad muscular y manifestaciones oculares como hemorragias conjuntivales, fotofobia y dolor ocular. Eventualmente aparecen hemorragias subconjuntivales. El signo más característico podría ser la hiperemia conjuntival, que le da una tonalidad rojiza a las escleróticas y que usualmente aparece en el tercer o cuarto día de la enfermedad (Abler y De la Peña, 2010).

Desde el punto de vista clínico la presencia de meningitis aséptica es el dato más importante, esta manifestación dura algunos días y no es fatal en casos anictéricos. Aunque las leptospiras han desaparecido del LCR las manifestaciones clínicas se relacionan con la aparición de anticuerpos. Sin embargo, esto no es específico y el diagnóstico puede ser confundido con meningitis de etiología viral, debido a la presencia de pleocitosis mononucleares (Lemarroy y Carrillo, 2003). Todos los serotipos patógenos para el ser

humano son probablemente capaces de causar meningitis, siendo de mayor prevalencia *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* y *Pomona* (Laguna, 2000).

## **2. Leptospirosis icterica o Síndrome de Weil**

Es la forma grave de la leptospirosis, producida con mayor frecuencia por *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*. Se caracteriza por ictericia, deterioro de la función renal, hemorragias, colapso vascular, alteración de la conciencia, fiebre elevada y continua por 4 a 7 días. Alrededor del 25% de los casos presentan hepatoesplenomegalia, bilirrubinemia en la que predomina la bilirrubina directa. La trombocitopenia ocurre en un 50% de los casos y está estrechamente relacionada con insuficiencia renal, lo cual se traduce en un aumento de los valores sanguíneos de urea y creatinina, proteinuria, cilindruria y hematuria (Caíno et al., 2006).

En niños, se puede presentar hipertensión, colecistitis acalculosa, pancreatitis y vasculitis necrotizante. En casos graves hasta el 10% presentan alteraciones respiratorias, como neumonías intersticiales y bronconeumonías, además tos, disnea y hemoptisis, inclusive síndrome de dificultad respiratoria que puede ser de difícil diagnóstico debido a la similitud con el cuadro pulmonar que presentan los pacientes infectados con hantavirus (Seijo, Coto, San Juan, Videla, Deodato, Cernigol, García, Collia, De Bassadoni, Schtirbu, Olenchuk, Dorta y Parma, 2002).

## **3. Fiebre pretibial de Fort Bragg**

Caracteriza por lesiones eritematosas pretibiales sobre elevadas de 1-5 cm, relacionada a infecciones por *Leptospira* del serotipo *autumnalis* y en algunos casos con el serotipo *Pomona*. Fue observada durante 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, 2000).

## **F. Diagnóstico clínico**

Desde el punto de vista clínico es difícil diferenciar la leptospirosis de un gran número de enfermedades con cuadros clínicos similares, por lo que para un diagnóstico eficaz se deben combinar los siguientes datos (Carrada, 2005).

Diagnóstico epidemiológico, cuyo objetivo es la obtención de un resultado de prevalencia, ya que se ha demostrado que la leptospirosis es una enfermedad de potencial epidémico, en la que a nivel mundial se reportan más de 500,000 casos al año, principalmente después de fuertes lluvias o inundaciones (World Health Organization [WHO], 2010).

Diagnóstico clínico, de carácter presuntivo, debido a que las manifestaciones clínicas son inespecíficas. Se realiza a través de signos y síntomas presentes en casos sospechosos, siendo la historia de exposición a la enfermedad un importante dato a tener en cuenta cuando se plantea el posible diagnóstico (Carrada, 2005).

Diagnóstico de laboratorio, diagnóstico definitivo que se basa en la detección de anticuerpos, el aislamiento del microorganismo o demostración de leptospiras en los tejidos (Caíno et al., 2006).

Generalmente la leptospirosis presenta cuatro categorías clínicas que incluyen:

- Una enfermedad leve caracterizada por signos y síntomas de tipo gripal
- Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias
- Meningitis/meningo encefalitis
- Hemorragia pulmonar con falla respiratoria (OMS, 2008).

### **1. Diagnóstico diferencial**

El diagnóstico clínico de leptospirosis resulta difícil por la variada y no específica presentación de los signos y síntomas; por lo que es fácilmente confundida con otras enfermedades comunes en los trópicos (Obregón, 2009).

Deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial las siguientes enfermedades:

- Influenza
- Dengue clásico y dengue hemorrágico
- Fiebre amarilla y otras fiebres hemorrágicas de origen viral
- Infecciones por hantavirus u otros síndromes de dificultad respiratoria
- Hepatitis viral
- Insuficiencia renal aguda de otras etiologías
- Meningitis aséptica
- Rickettsiosis
- Brucelosis
- Pielonefritis
- Fiebre tifoidea, entérica y de origen desconocido
- Intoxicación por sustancias químicas y alimentaria
- Toxoplasmosis (OMS, 2008).

#### **G. Diagnóstico de laboratorio**

Debido al difícil diagnóstico clínico es necesario la confirmación de casos sospechosos mediante pruebas de laboratorio, a través de la identificación de leptospiras, sus antígenos y/o ácidos nucleicos (técnicas directas) o de la detección de anticuerpos (técnicas indirectas) (Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica [CoNaVE], 2012).

Sin embargo existen algunos hallazgos de laboratorio que sin ser específicos pueden orientar al diagnóstico, por ejemplo, elevación del tiempo de protrombina y velocidad de eritrosedimentación, leucocitosis con desviación a la izquierda, trombocitopenia o neutrofilia que al prolongarse se presenta anemia. Otras alteraciones en cuanto a la química sanguínea, son la elevación de enzimas hepáticas transaminasas y la gamma glutamil transferasa. Aumento en los niveles de enzimas pancreáticas amilasa y lipasa, incremento de nitrógeno de urea y creatina fosfoquinasa; todo esto acompañado de alteraciones en el sedimento urinario (Zunino y Pizarro, 2007; Tullu y Karande, 2009).

## **1. Métodos directos**

### **a. Microscopía de campo oscuro**

Técnica para comprobar el crecimiento de leptospiras a partir del cultivo de muestras de sangre, orina, LCR y fluidos en general (Rosario, Arencibia, Batista, Jirón, Valdes y Suarez, 2012). La evaluación consiste en observar las leptospiras, sus características morfológicas y de motilidad en aproximadamente 50 campos del microscopio (Céspedes, 2005).

La presencia de leptospiras en la muestra indica un caso positivo. Otro tipo de microorganismos en LCR, sangre y tejidos, excepto en la orina que puede contener bacterias, indica contaminación durante la toma o transporte de la muestra. La ausencia de leptospiras no significa que en la muestra completa no estén presentes (Céspedes y Araujo, 2002).

#### **i. Ventajas**

Es útil para observar leptospiras en cultivos, sobre todo cuando están presentes en gran número, y para observar la aglutinación en la prueba de MAT (OMS, 2008).

#### **ii. Desventajas**

Para llevar a cabo este método se requiere de destreza y experiencia, debido al gran número de artefactos que por su parecido con las leptospiras pueden crear confusión. Por ejemplo se debe diferenciar las leptospiras móviles de elementos como fibrillas, que poseen movimiento browniano (Agudelo, Restrepo y Moreno, 2008).

Baja sensibilidad, únicamente se pueden detectar leptospiras cuando la concentración está entre 100-200/mL, siendo válida sólo en los primeros días después de la enfermedad (fase séptica) (Céspedes y Araujo, 2002).

Esta técnica no puede ser usada como único procedimiento de diagnóstico, debe ser confirmada y correlacionada con los hallazgos en el cultivo y los resultados serológicos (García, Reyes, Basilio, Ramírez y Rivas, 2013b).

**b. Cultivo**

El aislamiento de leptospiras por medio de cultivo es para muchos autores la técnica más sensible y específica para el diagnóstico, ya que confirma la presencia de la bacteria permitiendo la identificación del serovar al que pertenece, que es de gran importancia epidemiológica (Smythe, Wuthiekanun & Chierakul, 2009).

Los aislamientos dependerán del material elegido y de la etapa de la enfermedad, pueden realizarse a través de muestras de sangre y LCR, durante la fase séptica u orina durante la fase inmune (Naranjo, Suárez, Fernández, González, Batista y Sierra, 2007).

**c. Inoculación en animales**

Esta técnica se usa cuando no es posible el aislamiento de leptospiras en cultivos, para aislar cepas de material contaminado o para producir anticuerpos. Se basa en el hecho de que las leptospiras invaden rápidamente el torrente sanguíneo cuando se inoculan por vía intraperitoneal (OMS, 2008).

El procedimiento involucra la inoculación de la muestra en animales de laboratorio, especialmente en cobayos o hámsteres. A los cinco días se obtienen muestras de sangre que son sembradas en medio de cultivo EMJH o Fletcher y se estudia la presencia de anticuerpos a través de la prueba de MAT. El procedimiento se repite semanalmente durante 1 mes. El éxito del aislamiento varía de acuerdo con la susceptibilidad del animal y depende del serovar involucrado y de su patogenicidad (Dassanayake, Wimalaratna, Agampodi, Liyanapathirana, Piyarathna & Goonapienuwala, 2009).

**d. Tinciones**

Las leptospiras pueden ser coloreadas por varios métodos que permiten su observación en muestras histológicas como las tinciones con sales de plata, rojo congo, técnicas de inmunohistoquímica entre la que destaca la inmunofluorescencia directa y variantes como la coloración de inmunoperoxidasa. Sin embargo en estos procedimientos no es posible distinguir las serovariedades y pueden crear altos riesgos de falsos positivos o negativos, por la mínima concentración de bacterias en las muestras (OMS, 2008).

### **e. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Este método se basa en la detección directa de secuencias de ADN de leptospiras en muestras clínicas. Es utilizado para confirmar el diagnóstico de leptospirosis en la fase temprana antes que los títulos de anticuerpos puedan ser detectables (Cardona, Moros, López, Pérez y Hernández, 2008).

Posee gran especificidad ya que reconoce el género, la especie y la serovariedad involucrada, sin embargo posee el inconveniente de tener un alto costo económico al requerir de equipos especiales y personal altamente calificado. Además puede dar resultados falsos positivos por la presencia de mínimas cantidades de ADN extraño, o resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores en el material clínico que está siendo examinado (Manu, Roy, Duttaroy, Sharma, Vijayachari, Kataria & Seghal, 2009).

## **2. Métodos indirectos**

### **a. Prueba de aglutinación microscópica (MAT)**

Se le conoce como la “prueba de oro” del serodiagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad para identificar el serovar o serogrupo de la leptospira comprometida en la infección (Vanasco, Schmeling, Chiani, Lottersberger y Dante, 2012).

La prueba de MAT se emplea para determinar anticuerpos aglutinantes en el suero, mediante la mezcla de diluciones seriadas del suero del paciente con cultivos de *Leptospira* de distintos serovares en placas de microtitulación o en tubos, que se dejan reaccionar de 2 a 4 horas a 30 °C. Los anticuerpos anti-leptospiras presentes en el suero hacen que las leptospiras se adhieran entre sí formando grumos (Perret et al., 2005).

### **i. Interpretación**

Resulta complicada por las reacciones cruzadas entre serogrupos, especialmente en muestras en fase aguda, por lo que se deben realizar más diluciones de los sueros que presenten esta reacción (Sandow y Ramírez, 2005). La lectura se realiza a través de microscopía de campo oscuro por la observación del grado de aglutinación de cada antígeno, la cual se reporta por medio de cruces de aglutinación (de 1+ a 4+) (Cuadro 1).

Su interpretación se basa en el punto final que es la dilución más alta del suero donde el 50% de la aglutinación ocurre. Debido a la dificultad de detectar que el 50% de la leptospiras están aglutinadas, el punto final es determinado por la presencia de aproximadamente el 50% de leptospiras no aglutinadas en comparación con la suspensión control (Céspedes y Araujo, 2002).

Se considera un resultado 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 y Araujo, 2002). A pesar de esto un título bajo en la MAT o la ausencia de este no excluye la enfermedad, por lo que es aconsejable incluir una prueba de tamizado género específica como el ELISA (Terpstra, 2008).

**Cuadro 1.** Lectura de la prueba MAT

Observación por microscopía de campo oscuro	Cruces de aglutinación
25% aglutinación con 75% de células libres.	+
50% aglutinación con 50% de células libres.	++
75% aglutinación con 25% de células libres.	+++
100% aglutinación con 0-25% de células libres.	++++

**Fuente:** Céspedes y Araujo. (2002). Manual de Procedimientos Bacteriológicos y Serológicos para el Diagnóstico de la Leptospirosis. Instituto Nacional de Salud: Ministerio de Salud. Lima.

#### **b. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Consiste en la combinación entre los anticuerpos presentes en la muestra y el antígeno de *Leptospira* fijado a los micropocillos de poliestireno, seguido de la remoción del suero por medio de lavados, procedido por la adición del conjugado antihumano ligado a una enzima (generalmente peroxidasa), para una posterior incubación, seguida de una serie de lavados. Subsecuente a la adición del sustrato (peróxido de hidrógeno) y un cromógeno; hace que el sustrato sea hidrolizado por las enzimas y el cromógeno varíe de color,

haciendo que la intensidad del color final sea directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*Leptospira* presentes en la muestra (Céspedes y Araujo, 2002).

**i. ELISA indirecto IgM**

Es un procedimiento de detección cualitativa de anticuerpos IgM frente a varios serovares antigénicamente relacionados, valioso para el diagnóstico de infección aguda. Los anticuerpos de la clase IgM aparecen desde el tercer día de la infección y pueden persistir durante un período de hasta cinco meses, aunque se han descrito casos en que han persistido durante años o de por vida (Hartskeerl, Smits, Goris & Terpstra, 2006).

**ii. ELISA indirecto IgG**

Esta prueba es utilizada para estudios epidemiológicos adicionalmente a la prueba de MAT (Terpstra, 2008).

**H. Medios de cultivo**

Las leptospiras requieren para su crecimiento condiciones nutricionales adecuadas y ser incubadas en condiciones de oxígeno, pH y temperatura óptimos. Los compuestos orgánicos que se conocen como nutrientes esenciales que ayudan a su multiplicación y crecimiento *in vitro* son las vitaminas B1 (tiamina) y B12 (cobalamina), los ácidos grasos de cadena larga son utilizados como fuente de energía, de carbono y de lípidos celulares, ya 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 aminoácidos se utilizan en forma limitada, ya que no puede satisfacer los requerimientos de nitrógeno (OMS, 2008).

El piruvato ayuda al inicio del crecimiento de leptospiras de difícil desarrollo. En contraste con la mayoría de bacterias, estas 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, por lo que es usado en medios selectivos, para aislar las leptospiras a partir de fuentes contaminadas (OMS, 2008).

## 1. Tipos de medios de cultivo

Las leptospiras crecen en una variedad de medios de cultivo, su crecimiento es relativamente lento con un tiempo de duplicación celular de 6 a 8 horas. Las temperaturas óptimas de crecimiento van desde los 28 a 30 °C pero algunos serovares son más exigentes que otros en términos de sus requerimientos de cultivo (Terpstra, 2008).

### a. Medio tradicional (Fletcher, Stuart, Korhof, Vervoort y Schüffner)

Tipo de medio que contiene aproximadamente del 8 a 10% de suero de conejo, el cual contiene la más alta concentración de vitamina B12, que es esencial para la multiplicación de leptospiras. El título de aglutininas anti-*Leptospira* en suero de conejo es bajo comparado con el encontrado en otros animales. 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 (OMS, 2008).

### b. Medio Tween 80/albúmina sérica de bovino (BSA) o Ellinghausen & McCullough y su modificación por Johnson & Harris (EMJH)

Medio más utilizado para el aislamiento y cultivo de leptospira, considerado un superior a otros medios tradicionales que contienen suero de conejo. Los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a bajas concentraciones. 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 y de esta forma neutralizar su actividad citolítica (OMS, 2008).

### c. Medio enriquecido

Este tipo de medio es empleado para intensificar el crecimiento de leptospiras haciendo uso de requerimientos nutricionales complejos, tales como el serovar *hardjo*; 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 (OMS, 2008).

#### **d. Medio selectivo**

Medio con 5-fluoracilo (200 µg/mL) y/u otro antimicrobiano como neomicina (300 µg/mL), ácido nalidíxico, actidione, sulfadiazol, rifampicina o anfotericina B. Estos 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 mismas (OMS, 2008).

### **2. Estado de los medios de cultivo**

#### **a. Forma líquida**

Los medios líquidos son esenciales para el aislamiento de leptospiras y para cultivos que van a ser usados como antígenos en pruebas de aglutinación ya que no poseen partículas de agar que puedan interferir con la interpretación de estas pruebas (OMS, 2008).

El desarrollo de leptospiras en este tipo de medio se evidencia por la turbidez, aunque algunas pueden presentar una apariencia granular en el fondo del tubo; ambos pueden verse a simple vista pero debe confirmarse por la observación en el microscopio (OMS, 2008).

#### **b. Forma semisólida**

Los medios semisólidos contienen 0.1 a 0.5% de agar (p/v) y son usados de preferencia para el aislamiento de varias cepas y para el mantenimiento de cultivos de reserva conservados a temperatura ambiente y transferidos cada tres meses a medios frescos (Terpstra, 2008).

En estos medios el crecimiento se inicia fácilmente y usualmente se visualiza en forma de anillos densos de crecimiento, varios milímetros debajo de la superficie del medio, sin embargo la ausencia de anillos no significa ausencia de leptospiras (OMS, 2008).

#### **c. Forma sólida**

Los medios sólidos pueden ser usados para el aislamiento de cepas a partir de materiales o cultivos contaminados, o para clonar leptospiras de cultivos mixtos (Terpstra, 2008).

Contienen 0.8 – 1.3% de agar (p/v) y son dispuestos en tubos o en placas que deben ser selladas para crear una cámara húmeda y prevenir así la deshidratación. Cuanto más baja es la concentración de agar, mayor es la tendencia de las leptospiras a ocupar toda la placa y

crecer a través de todo el medio; en el 1% del agar las colonias crecen bajo la superficie y son visibles después de 7 a 14 días para la mayoría de los serovares (Terpstra, 2008).

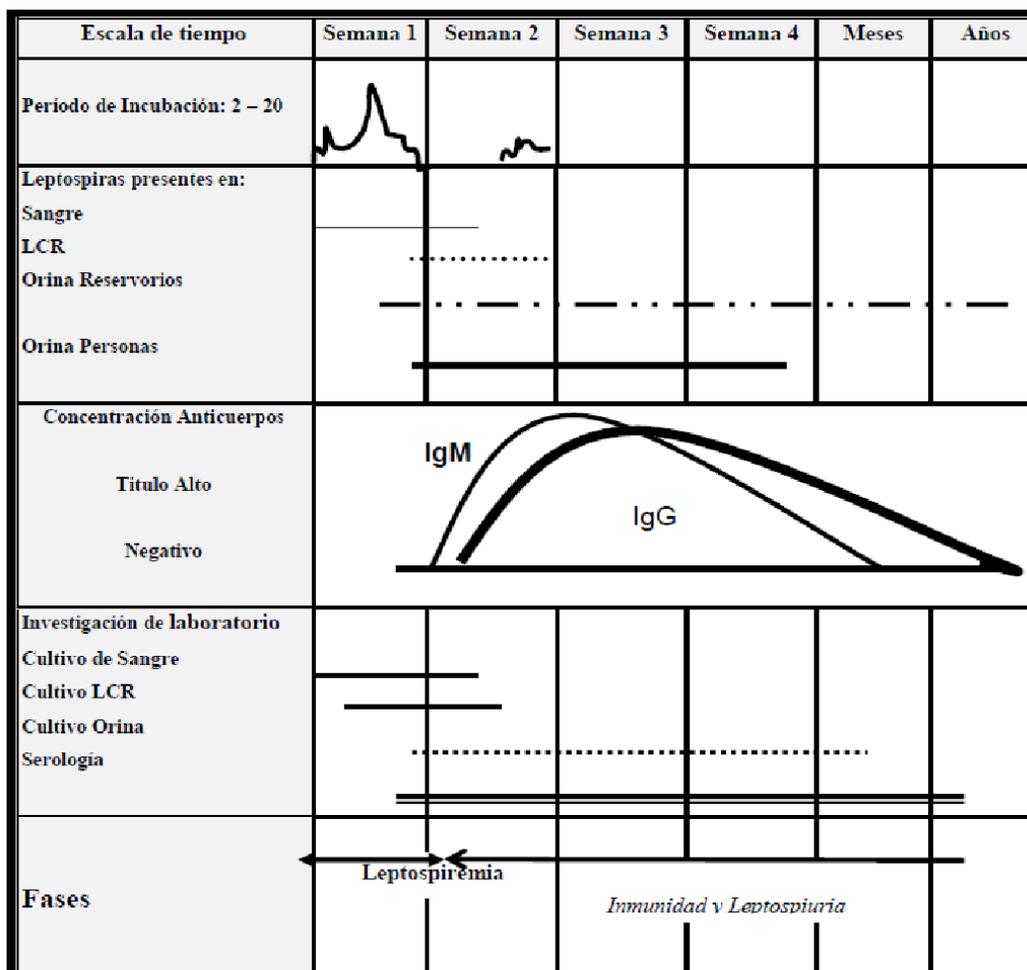
## **I. Muestras de laboratorio**

### **1. Obtención de la muestra y condiciones de envío**

Para obtener una muestra adecuada es necesario conocer la dinámica de la enfermedad (Figura 1). Las leptospiras usualmente circulan en la sangre del paciente infectado por aproximadamente 10 días después de la aparición de la enfermedad, también aparecen en otros fluidos corporales como orina y LCR, penetrando a los pocos días en órganos internos en donde pueden detectarse títulos de anticuerpos en la sangre de 5 a 10 días después de la aparición de la enfermedad. En la evolución clínica de la leptospirosis se reconocen dos fases: la fase séptica, que dura entre 4 a 7 días, durante la cual las leptospiras circulan en la sangre, también aparecen en orina y LCR. Después da inicio la fase inmune, durante esta las leptospiras penetran en los órganos y pueden detectarse títulos de anticuerpos después 5 a 10 días del inicio de la enfermedad, aunque algunas veces pueden tardar más, especialmente si se ha establecido una terapia con antibióticos (Céspedes y Araujo, 2002).

Para que en el laboratorio se realice un eficiente diagnóstico, tanto bacteriológico como serológico, la obtención, el transporte y la conservación de la muestra deben realizarse correctamente (Anexo 2) (CoNaVE, 2012).

Para obtener resultados confiables se recomienda que las muestras conserven sus características originales, por lo tanto deben de evitarse temperaturas extremas, pH extremos o desecamientos, para ello es indispensable que las muestras sean enviadas al laboratorio lo más pronto posible. En los casos en que sea necesario transferir las muestras a otros laboratorios, los responsables de su envío deben elegir el sistema de embalaje apropiado para la correcta conservación y transporte de éstas durante el tiempo que demanda el transporte (Anexo 3) (Céspedes y Araujo, 2002).

**Figura 1.** Dinámica de la leptospirosis

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

## 2. Tipos de muestras

### a. Sangre con heparina

Tipo de muestra apropiada para realizar cultivo, el cual se recomienda se obtenga antes del inicio de antibióticos y durante el período febril agudo de la fase séptica (primeros 7 días), ya que después las leptospiras han desaparecido de la sangre y los anticuerpos comenzarán a ser detectables en el suero permitiendo el serodiagnóstico (CoNaVE, 2012).

**b. Orina para cultivo**

Este tipo de muestra 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 recogida, debido a que las leptospiras mueren rápidamente (CoNaVE, 2012). La presencia de leptospiras es debido a la colonización de los túbulos renales y se presenta entre los 14 y 28 días después de la infección (OMS, 2008).

**c. Sangre coagulada o suero para serología**

Preferiblemente deben obtenerse dos muestras con un intervalo de varios días en base a la fecha del inicio de la enfermedad y el tiempo probable de seroconversión. Este análisis es necesario para detectar un incremento en el título de anticuerpos entre ambas muestras o la seroconversión. Se debe tomar en cuenta que un resultado serológico negativo en la fase aguda de la enfermedad no excluye la leptospirosis (OMS, 2008).

**d. LCR y dializado para cultivo**

En pacientes con compromiso meníngeo se puede observar y aislar leptospiras de LCR a partir de 4-7 día posterior a la infección. El LCR es de fácil contaminación bacteriana, por lo que debe procesarse inmediatamente después de colectado, como máximo a los 4 días de colectado (OMS, 2008).

**e. Muestras postmortem**

Este tipo de muestras se realiza en pacientes fallecidos. Es importante coleccionar muestras del mayor número de órganos posibles, incluyendo cerebro, LCR, humor acuoso, pulmones, riñones, hígado, páncreas y corazón para realizar la serología (CoNaVE, 2012).

**J. Tipificación**

La tipificación puede dar una indicación de los reservorios y de las fuentes de infección, ayudando por tanto en la selección de métodos de prevención y control (OMS, 2008). Se han desarrollado métodos basados en el reconocimiento de características antigénicas de las leptospiras que utilizan anticuerpos monoclonales o “suero factor”. Otros se basan en el examen de las diferencias en el ADN de las leptospiras y sus resultados son comparables con aquellos de la tipificación de serovares (Terpstra, 2008).

## **1. Identificación de serovares**

La unidad sistemática básica para la clasificación es el serovar, que se define sobre la base de similitudes y diferencias antigénicas. Idealmente todos los aislamientos deberían ser tipificados hasta este nivel, porque la clasificación de serovar en serogrupos es usada en epidemiología y puede ser necesaria para describir adecuadamente una cepa (OMS, 2008).

## **2. Identificación del serogrupo**

Una suspensión de antígeno de una cepa desconocida es usada en titulaciones empleando la prueba de MAT, con un rango de antisuero de conejo que represente todos los serogrupos reconocidos 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 (OMS, 2008).

### **a. Anticuerpos monoclonales**

Los serovares pueden ser identificados con base en patrones característicos de aglutinación a través de anticuerpos monoclonales preparados de conejo que aglutinan leptospiras. El uso de la MAT en la serotipificación es un método fácil y rápido, lo complicado aquí resulta en la preparación de los anticuerpos monoclonales ya que toma tiempo. Actualmente están disponibles anticuerpos monoclonales para tipificar cerca de la mitad de los serovares más comunes actualmente conocidos (Terpstra, 2008).

### **b. Anticuerpos policlonales**

Consisten en una mezcla de anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes antigénicos. La técnica de microaglutinación que emplea antisueros policlonales de conejo sigue siendo el método más utilizado para la clasificación serovares, pese a que es una técnica muy laboriosa que necesita que disponga de una batería de anticuerpos monoclonales (González, 2002).

### **c. Suero factor**

Los “suero factor” son sueros de conejo, convencionalmente preparados, que tienen una alta especificidad después de ser absorbidos por varias leptospiras. Los paneles de estos pueden ser usados de manera similar a los anticuerpos monoclonales para identificar rápidamente las cepas a nivel de serovar (OMS, 2008).

## **K. Tratamiento**

Se basa principalmente en la terapia de soporte, control de desequilibrio electrolítico y ácido base. Debe iniciarse tan pronto se sospeche de leptospirosis y de preferencia antes del quinto día de la aparición de los síntomas, ya que los beneficios de los antibióticos después del quinto día son discutibles (OMS, 2008).

El objetivo del tratamiento, es controlar la infección antes de pueda ocurrir lesiones en los tejidos. Nunca se debe esperar los resultados del laboratorio para empezar el tratamiento 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 varias semanas después (Terpstra, 2008).

El manejo de casos moderados a graves debe de ser en forma hospitalaria. Todo paciente con diagnóstico presuntivo debe ser hospitalizado cuando presenta síntomas que se relacionan con la infección como lo son la fiebre elevada (39 °C) que no cede a antipiréticos, vómitos, dolor abdominal intenso, ictericia, manifestaciones hemorrágicas (gingivorragia, hemoptisis, melena, petequias generalizadas), dificultad respiratoria, trastornos hemodinámicos (shock), oliguria y signos meníngeos (Céspedes, 2005)

Los casos severos deben ser tratados con altas dosis de penicilina endovenosa. Los casos menos graves pueden ser tratados con antibióticos orales como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina o eritromicina, cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona y cefotaxime y antibióticos quinólonicos (OMS, 2008).

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 (OMS, 2008).

## **L. Medidas de control y prevención**

Las medidas para la intervención y control de la leptospirosis requieren la coordinación de autoridades de salud pública, salud animal y ambiente. El enfoque difiere dependiendo si hay un brote debido a un desastre natural (inundación o lluvias fuertes) donde lo importante es proporcionar atención médica para casos sospechosos, o si la situación se refiere a un área endémica donde ocurre la transmisión esporádica (OMS, 2008).

Debido a la gran cantidad de serovares patógenos, las numerosas fuentes potenciales de infección y las diversas condiciones de transmisión, el control de la leptospirosis incluirá una estrategia compleja que depende de las condiciones locales. Aumentar el conocimiento de las áreas de riesgo, de los grupos de riesgo a la infección, así como de los factores conductores locales, es esencial al considerar medidas de prevención (Anexo 4) (OMS, 2008).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una zoonosis con amplia distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira* que infectan animales, los que frecuentemente se transforman en portadores, siendo una fuente de infección para el hombre cuando éste entra en contacto con la orina de animales infectados o con un ambiente contaminado con ésta (Brihuega, 2008).

Desde el primer caso de leptospirosis reportado en Guatemala en el año de 1980 (Torres, 1982), se han llevado a cabo estudios de seroprevalencia donde se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en pacientes con enfermedad febril, tanto en áreas rurales como urbanas (Orantes, 2003; Zelaya et al., 2008; Barrios, 2010).

Herrera y Pérez, en el 2012 reportaron una seroprevalencia de 7.56% en una población comprendida entre 6 y 15 años, y en 2015 Solórzano y Gálvez reportaron que el 7.31% de los pacientes que padecían leptospirosis eran menores de 19 años, lo cual fue indicio de que la circulación de leptospiras sobre la población infantil es activa. Sin embargo, no se han realizado estudios para poder aislar e identificar leptospiras sobre dicha población, lo cual es importante ya que las manifestaciones clínicas se confunden con otras enfermedades febriles como dengue, influenza hepatitis virales, entre otras, ocasionando la demora en el tratamiento adecuado y la desfavorable evolución de los casos puede pasar desapercibida (OMS, 2008).

Para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* se utilizó la prueba de aglutinación microscópica MAT, establecida por la OMS como el estándar internacional para el diagnóstico de leptospirosis. Asimismo, los resultados que se obtengan permitirán considerar a la leptospirosis en el diagnóstico diferencial de diversas enfermedades febriles. Por lo que esta investigación generará información de mucho valor que permitirá conocer la importancia de la leptospirosis infantil en Guatemala.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Determinar la presencia de *Leptospira interrogans* en muestras de sangre de pacientes atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, a través de su aislamiento e identificación.

### B. Específicos

1. Evidenciar la presencia de *Leptospira interrogans* en pacientes sospechosos de leptospirosis del Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, en muestras de sangre a través de su aislamiento.
2. Establecer la frecuencia de serovares en muestras clínicas de pacientes con leptospirosis del Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, a través de la prueba MAT.
3. Describir los síntomas y signos más frecuentes encontrados en los pacientes con serología positiva a *Leptospira interrogans*.

## **VI. HIPÓTESIS**

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, atendidos en el HIIR.
2. **Muestra:** Se tomaron por conveniencia 40 muestras de sangre de pacientes con síntomas y signos compatibles con leptospirosis, detectados por los médicos de los servicios del HIIR durante agosto a diciembre del año 2014 y del Hospital Infantil Juan Pablo II de enero a marzo de 2015.

### B. Recursos

#### 1. Humanos

Investigadoras	Br. Karen Lorena Natareno Vásquez Br. Astrid Lucía Hernández Estrada Br. Bertha Laura Nalleli De León Ramos
Asesor y coordinador	Licda. María Luisa García de López
Asesor	Licda. Leticia del Carmen Castillo Signor
Co-asesor HIIR	Dra. Nancy Gatica

#### 2. Institucionales

- a. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 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 (MSPAS).
- d. Servicios del Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación.
- e. Servicios del Hospital Infantil Juan Pablo II.

### 3. Físicos

#### a. Materiales y suministros de laboratorio

- Frascos estériles para hemocultivo
- Tubos Vacutainer de tapón rojo
- Tubos de vidrio con tapón de rosca estériles de 20 mL
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 mL
- Pipetas automáticas de volumen variable
- Puntas de pipeta desechables
- Bulbos y pipeteadores
- Portaobjetos de vidrio de 76 x 26 x 1 mm
- Placas de poliestireno con pozos de capacidad mínima de 300  $\mu$ L
- Probeta de 1,000 mL estéril
- Erlenmeyer de 1,000 mL estéril
- Varillas de agitación estériles
- Jeringas estériles de 3 y 5 mL
- Filtros con membrana de celulosa Millipore® 0.22 a 0.45 $\mu$ m
- Hieleras para el traslado de muestras
- Guardianes para el descarte de material punzocortantes
- Guantes de látex
- Liga de hule
- Algodón
- Gasas estériles
- Papel mayordomo
- Papel aluminio
- Papel parafilm
- Marcador indeleble
- Fichas de recolección de datos
- Hojas de consentimiento informado

**b. Equipo**

- Cabina de bioseguridad nivel II
- Incubadoras de temperatura 30 °C y 37 °C
- Lavador y lector de placas ELISA
- Bomba de vacío
- Estufa simple
- Centrífuga
- Autoclave
- Microscopio de campo oscuro
- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Baño de María
- Refrigeradora

**c. Reactivos**

- Kit Panbio LEPTOSPIRA IgM ELISA, para la determinación de anticuerpos IgM contra *Leptospira* en suero humano
- Medios de cultivo:
  - EMJH
  - EMJH + 5-fluoracilo
  - EMJH + Suero de conejo al 1% + suero fetal bovino 1% (FCS)
  - Fletcher enriquecido con suero de conejo inactivado al 10%
- 22 serogrupos de *Leptospira* spp (Anexo 5)
- Etanol al 70%
- Solución fenol al 5%
- Hipoclorito de sodio al 25%
- Amonio cuaternario
- Suero de conejo comercial
- Suero fetal bovino

## C. Métodos

### 1. Mantenimiento de cepas de leptospiras

Todas las cepas fueron trabajadas en cabina de seguridad biológica, para evitar la contaminación de las mismas y de las personas que las manipulan. También se usaron barreras primarias de bioseguridad (uso de bata, guantes, lentes y mascarilla).

#### a. Procedimiento

- Cada vez que se hizo uso de la cabina de seguridad biológica se limpió con etanol al 70% y con solución de fenol al 5%.
- Para el descarte de material se prepararon recipientes con agua y dos medidas de hipoclorito de sodio comercial, y recipientes con solución de amonio cuaternario.

#### i. Primer pase: Enriquecimiento

- Se observó la presencia de anillo de Dinger formado entre la parte media y superficie del medio Fletcher, en el cual se encontraban almacenadas las cepas de leptospiras (Anexo 6).
- Con pipetas Pasteur estériles se tomó 0.5 mL del cultivo en la ubicación del anillo.
- En un tubo con medio EMJH se agregaron 6 gotas del cultivo obtenido en la pipeta.
- Cada tubo se rotuló con el número de cepa y fecha del día de la inoculación.
- Se incubaron los tubos inoculados a 30 °C durante 10 días.

#### ii. Segundo pase: Fortalecimiento

- Después de 10 días se evaluó el crecimiento de las bacterias. Los cultivos con escaso crecimiento se incubaron por 48 horas.
- Se inoculó en los tubos con EMJH el volumen de cultivo adecuado según crecimiento
  - Crecimiento óptimo: 5 gotas del cultivo.
  - Crecimiento moderado: 6 gotas del cultivo.
  - Crecimiento abundante: 4 gotas del cultivo.
- Los tubos sembrados se incubaron a 30 °C durante 7 días.

### iii. Tercer pase: Almacenamiento

- Después de los 7 días de incubación, se evaluó el crecimiento de las bacterias. Los cultivos con escaso crecimiento se incubaron por 48 horas más.
- Los cultivos con crecimiento se inocularon en los tubos con medio Fletcher agregando el volumen de cultivo adecuado según los criterios empleados en la fase anterior.
- Se rotuló cada tubo con número de cepa y fecha del día de inoculación y se incubaron a 30 °C, revisándolos periódicamente en busca de la aparición de anillo de Dinger.
- Los tubos que presentaron el anillo se cerraron completamente con papel parafilm y se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar cerrado y protegidos de la luz.
- Este procedimiento se realizó de forma trimestral para un adecuado mantenimiento de las cepas de *Leptospira*.

## 2. Elaboración de medios de cultivo

### a. Medio líquido EMJH

- Se disolvieron 1.2 g del medio comercial en 450 mL de agua destilada.
- Se esterilizó por 15 minutos a 121 °C y se enfrió hasta temperatura ambiente.
- De forma aséptica se agregaron 50 mL de suplemento y se procedió a filtrar el medio.
- Se ajustó el pH a 7.4 con soluciones de NaOH 1N o HCl 1N.
- Posterior se agregaron 5 mL del medio filtrado en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles debidamente identificados con el nombre del medio y fecha de elaboración.
- Se colocaron tres controles de calidad, a temperatura ambiente, 30 °C y 37 °C.
- El medio se almacenó a 4 °C hasta su utilización por un máximo de 6 meses.

### b. Medio semisólido de Fletcher

#### i. Elaboración del medio base

- Se disolvieron 1.25 g del medio base Fletcher BD<sup>®</sup> en 500 mL de agua destilada, posterior se calentó por 1 minuto hasta una leve ebullición.
- Se esterilizó por 15 minutos a 121 °C y se enfrió hasta una temperatura aproximada de 50 °C dentro de la cabina de seguridad biológica.

ii. Inactivación de suero de conejo

- Se tomó una alícuota de 40 mL de suero de conejo almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , una vez descongelado se colocó durante 30 minutos en baño María a una temperatura constante de  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

iii. Preparación final del medio

- Alcanzada la temperatura deseada del medio base, se agregó de forma aséptica suero de conejo inactivado, en cantidad necesaria para alcanzar un 10% final.
- Se distribuyeron 8 mL del medio en tubos de vidrio con tapón de rosca estériles, identificados con el nombre del medio y fecha de elaboración.
- Se colocaron tres controles de calidad, temperatura ambiente,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- El medio se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización por un máximo de 6 meses.

**c. Medio enriquecido: EMJH+ Suero de conejo al 1% + Suero fetal bovino al 1%**

- Se disolvieron 1.2 g del medio comercial en 450 mL de agua destilada, posterior se esterilizó por 15 minutos a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se enfrió hasta temperatura ambiente.
- Se agregaron 50 mL de suplemento y se procedió a filtrar el medio.
- Se agregaron de forma aséptica 5 mL de suero de conejo y 5 mL de suero fetal bovino.
- Se ajustó el pH a 7.4 con soluciones de NaOH 1N o HCl 1N.
- En frascos de vidrio estériles para hemocultivo se agregaron 5 mL del medio enriquecido y se identificaron con nombre y la fecha de elaboración.
- Se colocaron tres controles de calidad, temperatura ambiente,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- El medio se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización por un máximo de 6 meses.

**d. Medio selectivo: EMJH+ 5-fluracilo**

- Se disolvieron 1.2 g del medio comercial en 450 mL de agua destilada, posterior se esterilizó por 15 minutos a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se enfrió hasta temperatura ambiente.
- Se agregaron 50 mL de suplemento y se procedió a filtrar el medio.

- Se adicionó 5-fluoracilo en una concentración de 200 µg/mL
- Se ajustó el pH a 7.4 con soluciones de NaOH 1N o HCl 1N.
- En frascos de vidrio estériles para hemocultivo se agregaron 5 mL del medio selectivo y se identificaron con nombre y la fecha de elaboración.
- Se colocaron tres controles de calidad, temperatura ambiente, 30 °C y 37 °C.
- El medio se almacenó a 4 °C hasta su utilización por un máximo de 6 meses.

### **3. Obtención de la muestra**

#### **a. Alianzas estratégicas**

- Reunión y presentación del protocolo de investigación a las autoridades del HIIR.
- Presentación del estudio ante las autoridades y Médicos Residentes del HIIR.

#### **b. Consideraciones éticas**

Para la participación en el estudio se requirió de la firma o huella digital de los padres o encargados del menor, a los que individualmente se realizó la lectura del consentimiento informado. Así mismo se brindó información sobre la leptospirosis y en qué consistía el estudio llevado a cabo (Anexo 7).

Los datos del paciente así como los signos y síntomas más frecuentes fueron recolectados en fichas epidemiológicas (Anexo 8). Todos los datos obtenidos tanto en la ficha de epidemiológica como en el consentimiento informado son confidenciales y fueron usados estrictamente con fines para la investigación.

#### **c. Obtención y siembra de la muestra en medios enriquecido y selectivo**

##### **i. Condiciones específicas**

- Posterior a la lectura del consentimiento informado y la autorización de que el menor participará en el estudio, se procedió a la extracción de sangre.
- La muestra se obtuvo durante el período febril agudo de la fase séptica (primer al séptimo día de iniciada la enfermedad), antes del inicio de la terapia antibiótica.

- Los medios de cultivo permanecieron a temperatura ambiente por 30 minutos antes de la toma de muestra.

#### ii. Procedimiento

- Los medios de cultivo se identificaron con el código del paciente y la fecha. Se emplearon 4 viales por paciente, 2 con medio selectivo y 2 con medio enriquecido.
- Se limpió el área de punción con solución desinfectante, yodo y alcohol al 70%.
- Se obtuvo de 2-3 mL de sangre venosa con una jeringa.
- Se limpió con alcohol al 70% el área de punción del vial y se inocularon de 2-3 gotas de sangre en la parte central del medio de cultivo. El resto de muestra se colocó en tubo para serología.
- Los hemocultivos fueron transportados al laboratorio en posición vertical, e incubados a 30 °C. Siendo observados por un período de 8 semanas.

#### iii. Lectura

- Los hemocultivos se evaluaron cada 7 días mediante microscopía de campo oscuro, transfiriendo de 1-2 gotas del cultivo sobre una lámina porta-objeto.
- Al sospechar de crecimiento de leptospiras se realizaron subcultivos en medio EMJH+5-Fluoracilo, estos subcultivos se incubaron por 7 días a 30 °C y se realizó la lectura tanto de viales originales como de subcultivos.
- Los hemocultivos negativos se incubaron y controlaron cada 7 días por 8 semanas antes de descartar como negativa la muestra.

#### iv. Interpretación

- La presencia de leptospiras indica la positividad del caso, sin embargo, la presencia de otras bacterias indicó que la muestra se contaminó durante la toma de muestra o siembra en los medios.
- La presencia de sedimento o turbidez indicó que el cultivo estaba contaminado.

- El no aislamiento de leptospiras posterior a las ocho semanas de realizada la siembra indicó que el paciente no tuvo leptospirosis o que la muestra se tomó en un período no adecuado posterior a la leptospiremia.

#### **4. Purificación de cepas de leptospira**

- a. Con pipetas Pasteur estériles se colocó 0.5 mL de medio de cultivo en el centro de una caja de Petri estéril.
- b. Se colocó sobre el medio líquido una membrana estéril con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- c. Al absorberse el líquido por el disco de membrana, se colocaron 0.5 mL de cultivo contaminado sobre el centro de la membrana.
- d. Se tapó la caja de Petri y se mantuvo a temperatura ambiente durante dos horas, tiempo en el cual las leptospiras atravesaron la membrana.
- e. La caja fue inclinada con el objetivo de que el material filtrado corriera hacia el costado y con una pipeta Pasteur se tomó el filtrado y se inoculó en dos tubos con medio de cultivo semisólido Fletcher, incubándolo a 30 °C durante 7 días, y posterior se observó el desarrollo y resiembra en medio de cultivo líquido de EMJH.

#### **5. Detección de Anticuerpos IgM anti-Leptospira mediante la prueba de ELISA**

##### **a. Procedimiento**

- i. Obtención de la muestras
  - La sangre extraída por venopunción se dejó coagular a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 3000 revoluciones por un tiempo de 5 minutos.
  - Se separó el suero y fue refrigerado (2-8 °C), o congelado ( $\leq -20$  °C) si iba a ser analizado en un plazo mayor de dos días.
- ii. Desarrollo de la prueba
  - Antes de comenzar con el ensayo las muestras y todos los reactivos fueron mantenidos a temperatura ambiente.

- Se colocó el número necesario de micropocillos en el soporte para tiras, requiriendo cinco micropocillos para: el control negativo (N), el control de reactivo (R) y el calibrador (cal) por triplicado. Los pocillos no utilizados restantes se dejaron sellados herméticamente en el sobre de aluminio.
- Usando tubos de ensayo, se diluyeron el control negativo, control reactivo, los calibradores por triplicado y las muestra a analizar.
- Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del suero y se añadieron 180  $\mu\text{L}$  de diluyente de muestra.
- En sus respectivos pocillos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras diluidas, controles y calibradores. La placa se cubrió y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
- Se realizaron seis lavados con Buffer de lavado diluido.
- A cada pocillo se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de HRP conjugado anti-IgM humana. Luego la placa se cubrió y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
- Con un Buffer de lavado diluido se lavó seis veces.
- En cada pocillo se pipetearon 100  $\mu\text{L}$  TMB y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El tiempo se tomó a partir de la primera adición.
- Se añadieron en todos los pocillos 100  $\mu\text{L}$  de la solución de parada en el mismo orden y tiempo que cuando se agregó la TMB.
- Se leyó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm, dentro del transcurso de 30 minutos.

### iii. Interpretación

- Muestra positiva, si las unidades obtenidas mediante cálculo son mayores a 11.
- Muestra negativa, cuando las unidades obtenidas mediante el cálculo son menores a 9.
- Muestra con valores intermedios entre 9 y 11, realizar un segundo análisis y de persistir este resultado, solicitar una segunda muestra después de una semana.
- Los falsos negativos se presentan cuando el paciente se encuentra en los primeros cinco días de enfermedad y la cantidad de anticuerpos no son detectables por la prueba (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Interpretación de la prueba de ELISA Indirecto IgM

UNIDADES LEPTO	RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
<9	Negativo	No evidencia de anticuerpos IgM contra <i>Leptospira</i> .
9-11	Intermedio	Sugiere segunda muestra.
>11	Positivo	Presencia de anticuerpos IgM contra <i>Leptospira</i> .

**Fuente:** Panbio diagnostic. (2013). LEPTOSPIRA IgM ELISA. United States of America. Autor

## 6. Determinación de anticuerpos totales por medio de la prueba de MAT

### a. Preparación del antígeno

- Con pipeta Pasteur se tomó aproximadamente 1 mL del “anillo de Dinger”, el cual se formó entre la parte media y superficie del medio Fletcher.
- Se inoculó 10 gotas del contenido de la pipeta en un tubo con medio EMJH.
- Los inóculos se incubaron a 30 °C por 5 - 7 días.
- Se seleccionaron los cultivos que no evidenciaron contaminación ni aglutinación microscópica. Los cultivos densos se diluyeron con buffer fosfato salino (PBS), hasta observar en el microscopio un aproximado de 150 - 200 leptospiras por campo.

### b. Tamizaje

- Se agregaron 50 µL de PBS a los 96 pozos de las microplacas de fondo en U; y 40 µL más de PBS en los 8 pozos de la columna número dos de la microplaca.
- Se adicionaron 10 µL de suero problema en los 8 pozos de la columna dos (dilución 1:10). Los pozos de la columna uno fueron empleados como control negativo.
- Se tomaron 50 µL de la dilución contenida en los pozos de la columna número dos y se realizaron diluciones seriadas en las columnas siguientes.
- Se agregó por fila, 50 µL de los diferentes antígenos de *Leptospira* a los pozos de la placa.
- Luego de agitar y cubrir la placa con papel aluminio, se incubó por 1 hora a 37 °C.

**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).

**d. Interpretación**

- REACTIVO: cuando se presentó una aglutinación igual o mayor al 50% en la dilución 1:20 frente a uno o más serogrupos de *Leptospira* spp.
- NO REACTIVO al no observar aglutinación en una dilución igual o mayor a 1:20 con ninguno de las diferentes serogrupos.

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

Todas las muestras de sangre de pacientes con enfermedad febril que presentaron signos y síntomas compatibles con leptospirosis durante el período de agosto del año 2014 a marzo del 2015.

**a. Criterio de inclusión**

La muestra fue tomada entre los primeros siete días después del apareamiento de síntomas en pacientes 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
  - Alanina aminotransferasa (ALAT)
  - Aspartato aminotransferasa (ASAT)
  - Nitrógeno de urea (BUN)
  - Creatinina sérica

- Amilasa sérica
- Velocidad de eritrosedimentación
- Trombocitopenia
- Leucocitosis
- Creatinina quinasa

**b. Criterio de exclusión**

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

**2. Tipo de muestreo**

Por conveniencia

**3. Análisis estadístico**

**a. Tipo de estudio:** Descriptivo - exploratorio

**b. Análisis de los datos:** Análisis de frecuencias y porcentajes de las variables de interés.

Los resultados fueron tabulados con el programa Epi info 7.

## VIII. RESULTADOS

Durante los meses de agosto a diciembre de 2014 se capturaron 32 muestras de sangre provenientes de pacientes atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación, y de enero a marzo de 2015 se capturaron 8 muestras que provenían del Hospital Infantil Juan Pablo II, haciendo un total de 40 muestras.

De las 40 muestras de sangre seleccionadas de pacientes con enfermedad febril que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos en el estudio, 24 pacientes (60.0%) se encontraban en un rango de edad entre 8 a 15 años y 16 (40.0%) en un rango de 1 a 7 años. La mayor proporción de los pacientes estudiados fueron de sexo masculino 65.0%, y el 35.0% de sexo femenino. Con relación a la procedencia de las mismas, la mayoría eran de la ciudad capital 37 (92.5%) y 3 (7.5%) procedían del interior de la república (tabla 1).

**Tabla 1. Características sociodemográficas y procedencia de los pacientes con sospecha de leptospirosis (N=40)**

<b>Características</b>	<b>Total (%)</b>
	<b>N = 40</b>
<b>Edad (años)</b>	
1-7	16 (40.0)
8-15	24 (60.0)
<b>Género</b>	
Femenino	14 (35.0)
Masculino	26 (65.0)
<b>Procedencia</b>	
Ciudad capital	37 (92.5)
Departamentos	3 (07.5)
<b>Institución</b>	
HIIR	32 (80.0)
Hospital Juan Pablo II	8 (20.0)

Fuente: Datos experimentales

De los 40 pacientes sospechosos de padecer leptospirosis, ninguno fue reactivo con la prueba de ELISA IgM, resultado que fue confirmado a través de la prueba de MAT. Tampoco se obtuvo aislamientos de leptospiras mediante el cultivo de las muestras.

Con el objetivo de establecer el diagnóstico conclusivo, se analizaron los expedientes clínicos de los casos evaluados, se encontró que la mayoría de pacientes fueron diagnosticados y tratados como dengue clásico 17 (42.5%), seguido de fiebre de origen desconocido (FOD) 11 (27.5%), hepatitis A 6 (15.0%) e insuficiencia renal 3 (7.5%) (Tabla 2).

**Tabla 2. Diagnóstico conclusivo de los casos sospechosos de leptospirosis N=40**

<b>Diagnóstico</b>	<b>Total (%) N=40</b>	<b>IC 95%</b>
Dengue clásico	17 (42.5)	27.04 – 59.11
FOD*	11 (27.5)	14.60 – 43.89
Hepatitis A	6 (15.0)	5.71 – 29.84
Insuficiencia renal	3 (07.5)	1.57 – 20.39
Influenza	2 (05.0)	0.61 – 16.92
Infeción urinaria	1 (02.5)	0.06 – 13.16

\*FOD: Fiebre de origen desconocido Fuente: Expediente clínico

Los sueros de los pacientes diagnosticados con FOD fueron analizados con la prueba de PCR con la cual no se detectó ninguna secuencia de ADN de leptospiras por lo que se confirmó que dichos pacientes no padecían leptospirosis aguda.

Por otro lado, los datos obtenidos de las fichas epidemiológicas demostraron que los pacientes estudiados presentaban signos y síntomas en común, éstos se muestran en la tabla 3, observando que el 100.0% (40) de los pacientes presentaron como principal síntoma la fiebre, seguido de cefalea 95.0% (34), mialgias 82.5% (33), vómitos 67.5% (27) y náuseas 62.5% (25).

**Tabla 3. Signos y síntomas más frecuentes presentados en los pacientes con sospecha de leptospirosis (N=40)**

Signos y síntomas	N=40	%
Fiebre	40	100.0
Cefalea	34	95.0
Mialgias	33	82.5
Vómitos	27	67.5
Nauseas	25	62.5
Anorexia	15	37.5
Petequias	10	25.0
Daño hepático	2	5.0
Dolor abdominal	1	2.5
Diarrea	1	2.5

Fuente: Ficha epidemiológica

En la tabla 4 se muestran los signos y síntomas encontrados con mayor frecuencia en los pacientes que tuvieron un diagnóstico diferente de leptospirosis. Se observó que los síntomas principales fueron fiebre en el 100% de los casos, seguido de cefalea, mialgias y vómitos.

**Tabla 4. Signos y síntomas más frecuentes presentados por pacientes con diferente diagnóstico de leptospirosis**

Signos y síntomas	Dengue n=17	FOD <sup>a</sup> n=11	Hepatitis n=6	IR <sup>b</sup> n=3	Influenza n=2	IU <sup>c</sup> n=1
Fiebre	17	11	6	3	2	1
Cefalea	14	10	5	2	2	1
Mialgias	15	7	5	3	2	1
Vómitos	12	8	3	2	1	1
Nauseas	13	5	4	3	0	0
Anorexia	8	3	3	1	0	0
Petequias	4	3	0	2	1	0
Daño hepático	0	0	0	2	0	0
Dolor abdominal	0	0	0	0	0	1
Diarrea	0	0	0	0	0	1

a Fiebre de origen desconocido

b Insuficiencia renal

c Infección urinaria

Fuente: Ficha epidemiológica

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La leptospirosis es una zoonosis que puede presentarse como un síndrome febril inespecífico cuyo diagnóstico clínico resulta difícil, ya que comprende desde cuadros subclínicos hasta formas graves, en las que pueden desarrollarse signos y síntomas similares a otras enfermedades infecciosas como lo son influenza, dengue, hepatitis virales y neumonías principalmente; siendo el diagnóstico de laboratorio de vital importancia en la identificación correcta de leptospirosis (OMS, 2008; Samudio et al., 2010).

En regiones tanto rurales como urbanas de Guatemala a través de estudios de seroprevalencia, se ha demostrado que existen las condiciones necesarias para la transmisión de *L. interrogans*, entre las que se encuentran principalmente condiciones de higiene precarias, la convivencia con animales reservorio de leptospirosis y el clima (Herrera y Pérez, 2012, García et. al., 2013a; Solórzano y Gálvez 2015). Por lo que en esta investigación se tuvo como objetivo principal determinar la presencia de *L. interrogans*, en muestras de sangre de pacientes infantiles sospechosos de padecer leptospirosis, a través de la detección de anticuerpos con las pruebas de ELISA IgM y MAT y su aislamiento por medio del cultivo, que es el diagnóstico definitivo de dicha enfermedad.

Se evaluaron un total de 40 muestras, de las cuales en ninguna se demostró la presencia de *L. interrogans* en la población infantil estudiada. Esta seroprevalencia es más baja de la esperada, si se consideran los resultados de otros estudios realizados. Herrera y Pérez (2012) reportaron la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira* en el 7.56% de niños con edades entre 6 y 15 años. También Solórzano y Gálvez (2015) detectaron un 7.31%, en pacientes febriles menores de 19 años, lo cual es un indicio de que la circulación de leptospirosis sobre esta población es activa.

Tanto el cultivo de leptospirosis como la prueba de MAT, son considerados los métodos estándares para el diagnóstico definitivo de leptospirosis en humanos (Céspedes, 2006; de Vries et al., 2014), y ambos fueron negativos en todos los pacientes evaluados, por tal razón al no demostrar *L. interrogans*, se puede concluir que en la población infantil estudiada no padecía de leptospirosis aguda.

Es importante mencionar que el porcentaje de sensibilidad de las pruebas serológicas depende del tipo de población o grupo de riesgo donde se apliquen, así como de la situación clínica-epidemiológica de la enfermedad (Obregón et al., 2011). También debe considerarse que la detección de anticuerpos comienza entre 5 y 10 días después de la aparición de los síntomas, es por eso que se señala que la sensibilidad es superior cuando se estudian sueros correspondientes al décimo día posterior al inicio de la infección, ya que la seroconversión puede ocurrir después de la aparición de la enfermedad afectando la determinación de anticuerpos de clase IgM (Tullu y Karande, 2009; OMS, 2008; García et al., 2013b).

Otro aspecto a considerar, es que la detección de anticuerpos estuvo limitada a una sola muestra de suero durante la fase aguda, porque se presentó la dificultad para la localización de los casos posthospitalarios, lo que impidió tomar una segunda muestra, como recomienda la OMS, en donde indica que se deben obtener al menos dos muestras de suero de cada paciente, la primera durante la fase aguda y la segunda durante la fase de convalecencia, ya que puede observarse un incremento hasta de cuatro veces el título de anticuerpos, con lo que se confirma la leptospirosis aguda (Samudio et al., 2010). Además, al obtener la primera muestra en fase aguda y la segunda en la convaleciente, aumenta la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Rivero y Rago, 2011).

En esta investigación se incluyeron únicamente 40 pacientes con sospecha de leptospirosis; mientras que en otras publicaciones, realizadas sobre todo en países de Latinoamérica, se han llevado a cabo estudios retrospectivos que incluyen un mayor número de casos, (Vanasco et al., 2008; Suárez et al., 2006; Céspedes et al., 2009; Guerrier et al., 2013). Rafizah y cols., en el 2013 reportaron una baja frecuencia de leptospirosis en la que concluyeron que los pocos hallazgos probablemente se debían a que la población muestreada era pequeña, en comparación con estudios similares. Por esta razón se recomienda efectuar estudios que contemplen un mayor número de pacientes.

Se ha demostrado que la leptospirosis puede oscilar desde una enfermedad subclínica hasta casos fatales siendo las manifestaciones clínicas tan variables que no son patognomónicas y pueden clínicamente confundirse con otras enfermedades infecciosas, tal como se comprobó durante el estudio, en el que se encontró que el diagnóstico final

presentado en los pacientes muestreados fueron dengue, síndromes febriles, hepatitis virales e influenza, mismos que según la OMS deben ser considerados para el diagnóstico diferencial (Tabla 2) (Céspedes et al., 2009; OMS, 2008).

Los sueros de los pacientes diagnosticados con FOD fueron analizados con la prueba de PCR con la cual no se detectó ninguna secuencia de ADN de leptospiras por lo que se confirmó que dichos pacientes no padecían leptospirosis aguda (Boonsilp et al, 2011).

Estudios sobre leptospirosis infantil, han reportado fiebre, cefalea, mialgias y dolor abdominal como los síntomas más predominantes (Mena et al., 2008; Guerrier et al., 2013), mismos que fueron identificados principalmente en este estudio (Tabla 3), lo que confirma que en investigaciones sobre leptospirosis, sobre todo en niños, existe poca sospecha clínica debido a que la presentación clínica no es específica.

El 42.5% de los casos fueron diagnosticados con dengue clásico (Tabla 2), siendo esta una de las principales patologías en las que debe considerarse el diagnóstico diferencial con la leptospirosis, ya que ambas son enfermedades febriles que presentan una mayor similitud en cuanto a sintomatología clínica. Es por ello que se debe de conocer las diferentes presentaciones clínicas de ambas enfermedades siendo necesario realizar un diagnóstico diferencial a través de pruebas de laboratorio (Bruce et al., 2005). Los síntomas que se presentaron con mayor frecuencia fueron fiebre, mialgias y cefalea, los cuales también fueron encontrados en los estudios de leptospirosis realizados por Estrada (2004) y Barrios (2010). Lo anterior confirma la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial entre leptospirosis humana y dengue.

A pesar de que en el presente estudio no se detectaron casos de leptospirosis positivos, existen zonas dentro de la ciudad capital donde se ha demostrado que la leptospirosis es una de las zoonosis endémicas de mayor importancia, debido al impacto que tiene sobre la salud en especial en niños y ancianos, por lo que es preciso continuar con un monitoreo de forma periódica y así poder garantizar que los síndromes febriles sean identificados correctamente (Herrera y Pérez, 2012; García et al., 2013; Solórzano y Gálvez 2015).

## X. CONCLUSIONES

1. En las muestras de sangre de los pacientes atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación y en el Hospital Juan Pablo II, no se demostró la presencia de *Leptospira interrogans*, a través de su aislamiento.
2. Serologicamente no se demostró evidencia de anticuerpos anti-*Leptospira* ni por el método de ELISA IgM, ni mediante la prueba de Microaglutinación (MAT).
3. Con la prueba de PCR se confirmó que los pacientes diagnosticados con fiebre de origen desconocido (FOD) no padecían leptospirosis aguda.
4. Los casos sospechosos de leptospirosis presentaron principalmente: fiebre (100.0%), cefalea (95.0%), mialgias 82.5%, vómitos (67.5%) y náuseas (62.5%).
5. El diagnóstico final de los pacientes investigados fueron los siguientes: dengue clásico (42.5%), FOD (27.5%), hepatitis A (15.0%), insuficiencia renal (7.5%), influenza (5.0%) e infección urinaria (2.5%).

## XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con estudios sobre leptospirosis en la población infantil con un mayor número de pacientes, con el fin de lograr el aislamiento de *Leptospira interrogans*, que permita determinar los serovares circulantes en Guatemala.
2. Debido a la importancia de la leptospirosis humana como problema de salud pública, es necesario continuar con la capacitación del personal de salud para que se incluya en el diagnóstico diferencial en enfermedades febriles para evitar la demora en el diagnóstico presuntivo y el tratamiento oportuno.
3. Emplear pruebas más sensibles y específicas como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), para confirmar el diagnóstico de leptospirosis durante la fase temprana de la infección.
4. Además de evaluar el título de anticuerpos durante la fase aguda, también es importante determinar el título de anticuerpos durante la fase convaleciente de enfermedad, con el objetivo de mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de la leptospirosis, por lo que se debe incluir en la solicitud de las pruebas de leptospirosis la obligatoriedad de obtener dos muestras de los pacientes a los pacientes sospechosos.

## XII. REFERENCIAS

- Abuauad, M., Osorios, G., Rojas, J., y Pino, L. (2005). Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología* 22(1), 93-97.
- Abler, B., y De la Peña, M. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Leptospira* In Gyles. (4a ed.). cap 28. Wiley-Blackwell: Prescott.
- Agudelo, P., Restrepo, M., y Moreno, N. (2008). Diagnóstico de leptospirosis de muestras de sangre y cultivo por observación en microscopio de campo oscuro. *Revista Biomédica* 28(1), 7-9.
- 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 Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Bharti, A., Nally, J., Ricaldi, J., Mathias, M., Diaz, M., Lovett, P., et.al. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infection Disease* 3(12), 757-771.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., et al., (2011). Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases* 11, 1-9.

- Brihuega, B. (2008). *Leptospirosis: Diagnóstico y Tipificación de leptospiras: Temas de Zoonosis IV*. Buenos Aires, Argentina: Asociación de Zoonosis.
- Bruce, M., Sanders, E., Leake, J., Zaidel, O., Bragg, S., Aye, T., et.al. (2005). *Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico*. *Acta Tropica* 96, 36-46.
- Caíno, H., Cursio, F., y Siquiroff, G. (2006). *Leptospirosis*. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* 1(3), 30-36.
- Cardona, M., Moros, R., López, E., Pérez, J., y Hernández, R. (2008). *Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 28(1), 24-30.
- Carrada, T. (2005). *Leptospirosis humana. Historia natural, diagnóstico y tratamiento*. *Revista Mexicana Patología clínica* 52(4), 246-256.
- Carrizo, A., Bryhuega, B., Etchechoury, I., Arese, A., Romero, S., Gioffre, A., et.al. (2009). *Identificación de antígenos inmunorreactivos de *Leptospira interrogans**. *Revista Argentina de Microbiología* 41(1), 129-133.
- Céspedes, M. (2005). *Leptospirosis: Enfermedad zoonótica y reemergente*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 22(4), 290-307.
- 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.

- Céspedes, M., Balda, L., González, D., y Tapia, R. (2006). Situación de la leptospirosis en el Perú 1994-2004. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 23(1), 56-66.
- Céspedes, M., Balda, L., González, D., Tapia, R., Glenny, M., y Vinetz, J. (2009). Brote de Leptospirosis asociado a la natación en una fuente de agua subterránea en una zona costera, Lima-Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26(4), 441-448.
- Céspedes, M. y Mendoza, G. (2011). Leptospirosis, a propósito de un caso. *Revista Sociedad Bol Pediátrica* 50(2), 75-78.
- Cinco, M. (2010). New insights into the pathogenicity of leptospire: evasion of host defences. *New microbiologica* 33, 283-292.
- Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica. (2012). *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis*. México: Secretaría de Salud.
- Cruz, M., Andrade, J., & Pereira, M. (2003). Leptospirosis in children in Rio de Janeiro. *Revista Brasileira Medical Tropical* 27, 5-9.
- Daher, E., Lima, R., Silva, G., Karbage, N., Kataoka, R., Carvalho, P., et al., (2010). Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. *Brazilian Journal Infection Disiases* 14(1), 3-10.
- Dassanayake, D., Wimalaratna, H., Agampodi, S., Liyanapathirana, V., Piyarathna, T., & Goonapienuwala, B. (2009). Evaluation of surveillance case definition in the

- diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation. *BMC Infectious Diseases* 9(48), 14-17.
- De Vries, S., Visser, B., Nagel, I., Goris, M., Hartskeerl, R. & Grobusch, M. (2014). Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases* 28, 47-64.
- Dolhnikoff, M., Mauad, T., Bethlem, E., & Ribeiro, C. (2007). Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11(1), 142-148.
- 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 Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Galindo, S. (2008). *Determinación de anticuerpos anti-Leptospira en donadores de sangre del Hospital General San Juan de Dios*. (Tesis Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- García, M., Kestler, R., Castillo, L., Herrera, M., y Pérez, A. (2013)a. Prevalencia de anticuerpos anti *Leptospira* spp. en la población de dos asentamientos de la ciudad de Guatemala. Informe técnico final. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Dirección General de Investigación.
- García, R., Reyes, A., Basilio, D., Ramírez, M., y Rivas, B. (2013)b. Leptospirosis; un problema de salud pública. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica* 60(1), 57-70.

- González, S., y Orozco, C. (2010). *Aislamiento e Identificación de Leptospira interrogans en fuentes de agua en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla*. (Tesis Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles (grupo zoonosis). (2011). *Protocolo de vigilancia y control de leptospirosis*. Colombia, Bogotá: Instituto Nacional de Salud.
- Guerrant, R., Walker, D., y Weller, P. (2002). *Enfermedades Infecciosas Tropicales*. España: Elsevier Harcourt.
- Guerrier, G., Hie, P., Gourinat, A., Huguon, E., Polfrit, Y., Goarant, C., et.al. (2013). *Association between Age and Severity to Leptospirosis in Children*. PLOS Neglected Tropical Diseases 7(9), 2436.
- Hartskeerl, R., Smits, H., Goris, M., & Terpstra, W. (2006). *International Course on Laboratory Methods for The Diagnosis Leptospirosis*. (5th ed.). Amsterdam: Biomedical Research.
- Herrera, M., y Pérez, A. (2012). *Seroprevalencia de la Leptospirosis Humana en un Asentamiento ubicado en la Ciudad de Guatemala*. (Tesis Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Hung, C., Chang, C., Tian, Y., Wu, M., Yu, C., Pan, M., et.al. (2006). Leptospiral membrane proteins stimulate proinflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrology dialysis transplantation Epub* 21(4), 898-910.

- Laguna, V. (2000). Leptospirosis. Módulos Técnicos. Serie Documentos Monográficos No. 2. Perú: Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud.
- Lemarroy, D., y Carrillo, M. (2003). Leptospirosis y disfunción orgánica múltiple, caso clínico y revisión de la literatura. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva* 17(5), 175-186.
- Levett, P. (2004). Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical Microbiology* 4, 435-448.
- Malajov, Y., Panin, A., y Sovoliova, G. (2007). *Leptospirosis de los animales*. (3a ed.). La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Manu, V., Roy, S., Duttaroy, A., Sharma, S., Vijayachari, P., Kataria, V., Seghal, S., et.al. (2009). PCR on formalin-fixed necropsy tissues to diagnose leptospirosis. *Indian Journal of Medical* 129, 105-107.
- Marotto, P., Ko, A., Murta, C. Seguro, A., Prado, R., Barbosa, M., & Eluf, J. (2010). Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *Journal Infection* 60(3), 218-223.
- Meites, E., Jay, M., Deresinski, S., Shieh, W., Zaki, S., Tompkins, L., et.al. (2004). Reemerging leptospirosis, California. *Emerging Infectious Diseases* 10(3), 1-7.
- Mena, E., de Luna, E., González, A., Ramírez, A., y Jarvis, V. (2008). Leptospirosis e Insuficiencia Renal en Niños. *Archivo Dominicano de Pediatría* 41(3), 3-6.
- Naranjo, M., Suárez, M., Fernández, C., Amador, N., González, M., Batista, N., et.al. (2007). Confirmación microbiológica de un brote de leptospirosis en Honduras tras

el paso del huracán Mitch y potencialidad profiláctica de vax-SPIRAL. *Vaccinator* 16(3), 13-18.

Nascimento, A., Ko, A., Martins, E., Monteiro-Vitorello, C., Ho, P., Haake, D., et.al. (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal Bacteriology* 186(7), 2164-2172.

Noor, A., Aziah, B., Azwany, Y., Kamarul, M., Mohamed, R., Mohd, S., et.al. (2013). A hospital-based study on seroprevalence of leptospirosis among febrile cases in northeastern Malaysia. *International Journal of Infectious Diseases* (17), 394-397.

Obregón, A. (2009). *Sistemas serológicos rápidos y su impacto en el diagnóstico de leptospirosis* (Tesis de Graduación). Instituto de medicina tropical Pedro Kourí. La Habana Cuba.

Obregón, A., Fernandez, C., Martínez, I., Llop, A., Rodríguez, I., Rodríguez, J., et.al. (2011). Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba. *Revista Cubana Medicina Tropical* 63(3), 239-245.

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 Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. WHO Library Cataloguing in Publication Data.

- Perret, C., Abarca, K., Dabanch, J., Solari, V., García, P. Avalos, E., et.al. (2005). Prevalencia y presencia de riesgo de leptospirosis en una población de riesgo de la región metropolitana. *Revista Médica Chile* 133, 426-431.
- Pumarola, S., y Jiménez, M. (2002). Leptospirosis. *Medicine* 8(69), 3688-92.
- Rafizah, N., Aziah, B., Azwany, Y., Kamarul, I., Mohamed, R., Mohd, N. et al., (2013). A hospital-based study on seroprevalence of leptospirosis among febrile cases. *International Journal of Infectious Diseases* 17, 394-397.
- Rivero, S. y Rago, M. (2011). *Leptospirosis: revisión del tema a propósito de dos casos*. *Biomedicina*, 6(2), 38-49.
- Roca, B. (2006). Leptospirosis. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra* 50(2), 3-6.
- Rocha, F., Spichler, A., & Athanazio, D. (2010). Leptospirosis associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Tropica, Epub* 115(2), 155-162.
- Romero, M., Sánchez, J., y Hayek, L. (2010). Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del departamento de Tolima. *Revista de Salud Pública* 12(2), 268-275.
- Rosario, L., Arencibia, D., Batista, N., Jiron, W., Valdes, B., y Suarez, Y. (2012). Leptospirosis, una Revisión Actualizada. *Veterinaria. Argentina* 29(291), 4-7.
- 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* 1(1), 1-13.

- Samudio, D., Cuevas, C., Brizuela, E., y Coronel, J. (2010). Leptospirosis en pediatría. A propósito de un caso. *Servicio de Pediatría, Hospital General Barrio Obrero*. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Asunción – Paraguay.
- Sadow, K., y Ramírez, W. (2005). Leptospirosis. *Revista Electrónica de Veterinaria* 6(6), 1-65.
- Seijo, A., Coto, H., San Juan, J., Videla, J., Deodato, B., Cernigoi, B., et.al. (2002). Distres respiratorio debido a hemorragia pulmonar por leptospirosis. *Medicina. Buenos Aires* 62(2), 135-140.
- Sikahall, S. (2006). *Estandarización de la prueba de Aglutinación Microscópica en Placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana*. (Tesis Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Silva, E., Santos, C., Athanazio, D., Seyffert, N., Seixas, F., Cerqueira, G., et.al. (2008). Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in hamster model. *Vaccine* 26(31), 3892-3896.
- Sitprija, V. (2006). Renal dysfunction in leptospirosis: a view from the tropics. *Nature Reviews Nephrology* 2, 658-659.
- Smythe, L., Wuthiekanun, V., & Chierakul, W. (2009). The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81(4), 695-697.
- Solórzano, G., y Gálvez, Y. (2015). *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.* (Tesis Químico Biólogo).  
Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Suárez, M., Martínez, R., Posada, P., Bustelo, J., Carrera, O., Bravo, F., et. al. (1999).  
Leptospirosis en niños de la Provedencia de Ciego de Ávila, Cuba. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(2), 145-150.
- Suárez, M., Rodríguez, G., Menéndez, O., Marrero, J., y Alonso, J. (2006). Leptospirosis en niños de una provincia cubana. *Revista Mexicana de Pediatría* 73(1), 14-17.
- 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.
- Tullu, M., y Karande, S. (2009) Leptospirosis in children: a review for family physicians. *Indian Journal of Medical Sciences* 8(63), 368-378.
- Vanasco, N., Schmeling, M., Chiani, Y., Lottersberger, J., y Dante, H. (2012). Diagnóstico de leptospirosis humana: evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. *Salud Pública de México* 54(5), 530-536.
- Vanasco, N., Schmeling, M., Lottersberger, J., Costa, F., Ko, A., Tarabla, H. (2008). Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Tropica* 107, 255-258.
- White, E., & Wilson, V. (2002). Leptospirosis in the Caribbean. *Veterinary Public Health Seminar St Johns* 1, 6-7.

- World Health Organization. (2010). *Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group*. WHO Library Cataloguing in Publication Data.
- Yang, H. Hsu, P., & Pan, M. (2005). Clinical distinction and evaluation of leptospirosis in Taiwan – a case– control study. *Journal Nephrology* 18(1), 45-53.
- Zelaya, B., García, M., Villagrán, C., Velásquez, M., Sikahall, S., Galindo, S., y Díaz, R. (2007). *Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua Escuintla*. (Tesis para optar al título de Químico Biólogo). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala
- Zunino, M., y Pizarro, R. (2007). Leptospirosis. Puesta al día. *Revista Chilena de Infectología* 24(3), 220-226.

## XIII. ANEXOS

Cuadro 1. Clasificación de *Leptospira* spp.

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa de referencia
<b><i>Leptospiras patógenas</i></b>			
<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	Australis	Ballico
	<i>Australis</i>	Bratislava	Jez Bratislava
	<i>Bataviae</i>	Bataviae	Van Tienen
	<i>Canicola</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni	M 20
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Lai	Lai
	<i>Pomona</i>	Pomona	Pomona
<i>L. alexanderi</i>	<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes	Salinem
	<i>Sejroe</i>	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. alexanderi</i>	<i>Manhao</i>	Manhao3	L 60
<i>L. fainei</i>	<i>Hurstbridge</i>	Hurstbridge	BUT 6
<i>L. inadai</i>	<i>Lyme</i>	Lyme	10
<i>L. kirschneri</i> *	<i>Autumnalis</i>	Bim	1051
	<i>Cynopteri</i>	Cynopteri	3522 C
	<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. meyeri</i>	<i>Pomona</i>	Mozdok	5621
	<i>Semarangae</i>	Semarangae	Velrad Semarang 173
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Ballum</i>	Ballum	Mus 127
	<i>Ballum</i>	Castellonis	Castellon 3
	<i>Javanica</i>	Javanica	Veldrat Bat 46
	<i>Sejroe</i>	Sejroe	M 84
<i>L. weillii</i>	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi	Perepicilin
	<i>Celledoni</i>	Celledoni	Celledoni
<i>L. noguchii</i>	<i>Autumnalis</i>	Fortbragg	Fort Bragg
	<i>Panama</i>	Panama	CZ 214 K
<i>L. santarosai</i>	<i>Bataviae</i>	Brasiliensis	An 776
	<i>Mini</i>	Georgia	LT 117
Genomospecies 1	<i>Ranarum</i>	Pingchang	80- 412
Genomospecies 4	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Hualin	LT 11 -33
Genomospecies 5	<i>Semarangae</i>	Saopaulo	Sao Paulo
<b><i>Leptospiras saprófitas</i></b>			
Genomospecies 3	<i>Holland</i>	Holland	Waz Holland (P438)
<i>L. biflexa</i>	<i>Semarangae</i>	Patoc	Patoc I
<i>L. wolbachii</i>	<i>Codice</i>	Codice	CDC

**Fuente:** Bharti, Nally, Ricaldi, Mathias, Diaz y Lovett. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infection Disease.

## **Anexo 2.** Procedimiento para obtención de la muestra

### **A. Muestra de sangre**

#### **1. Para hemocultivo (en pacientes de la consulta)**

- La muestra debe obtenerse durante el periodo febril agudo de la fase séptica, es decir entre el primer y sétimo día, antes del inicio de la terapia antibiótica.
- Tomar 3 mL de sangre, usando un tubo con anticoagulante (EDTA, heparina u oxalato de sodio, evitar el uso de citrato porque inhibe el desarrollo de algunos serovares.
- Enviar la muestra inmediatamente al laboratorio a temperatura ambiente. De no ser posible, se puede mantener la misma por un periodo máximo de 5 días, aunque no es recomendable.

#### **2. Para hemocultivo directo (en pacientes hospitalizados)**

- Los medios de cultivo deben de permanecer a temperatura ambiente por 30 minutos antes de la toma de muestra.
- Rotularse cada medio con el código del paciente y la fecha.
- Limpiar área de punción con solución desinfectante, solución de yodo y alcohol al 70%.
- Obtener de 2-3 mL de sangre venosa con una jeringa, para realizar el hemocultivo idealmente al lado de la cama del paciente.
- Limpiar con alcohol al 70% el área de punción del vial e inocular de 2 a 3 gotas de sangre en la parte central del medio de cultivo.
- Concluida la siembra cerrar las tapas herméticamente y mezclar inclinando los viales y rotándolos sin agitar.
- Transportar los hemocultivos al laboratorio en posición vertical e incubar a 30 °C.

#### **3. Para exámenes serológicos**

Tomar 5 mL de sangre usando un tubo sin anticoagulante, extraer el suero y transportar en cadena de frío.

##### **a. Muestra de LCR**

- La obtención de la muestra la debe realizar el médico de acuerdo a los procedimientos de la institución, obtener 2 mL de LCR en forma aséptica.
- Con un mechero flamear la tapa del frasco y trasvasar el LCR de la jeringa.
- Rotular y transportar la muestra inmediatamente al laboratorio en un período no mayor de 4 días a temperatura ambiente.

**b. Muestra de orina**

- Administrar al paciente 24 horas antes de la toma de muestra una tableta de acetazolamida de 250 mg ó 12 horas antes de la toma de muestra 0,5 g de bicarbonato de sodio (1/2 cucharadita) disuelto en un vaso con agua, a fin de alcalinizar la orina.
- Rotular con el nombre del paciente, fecha de obtención de la muestra y hora.
- Realizar la limpieza de los genitales del paciente y coleccionar la orina (segundo chorro).
- Transportar la muestra de orina inmediatamente al laboratorio. Máximo dos horas de tomada la muestra (para cultivo).

**c. Muestra de tejidos post mortem**

- Este tipo de muestras deben ser obtenidas por el médico, de acuerdo a normas establecidas. Una vez realizada la necropsia, con las debidas medidas de bioseguridad, cortar una pequeña porción de riñón, hígado, pulmón, cerebro y colocar cada una en un frasco estéril de boca ancha.
- Transportar los frascos con las muestras de órganos hacia el laboratorio. Máximo 2- 4 horas de tomada la muestra (cultivo) (Céspedes y Araujo, 2002).

### Anexo 3. Condiciones de obtención, conservación y envío de muestra para el diagnóstico de leptospirosis

Prueba	Tipo de muestra	Período de toma de muestra	Cantidad (mL)	Transporte	Conservación
<b>Serología</b>	Suero agudo	5-10 días de inicio de los síntomas	3	Cadena de frío a 4-8°C	-20 a -70°C
	Suero convaleciente	15 a 30 días después de la primera toma	3	Cadena de frío a 4-8°C	-20°C
	Sangre completa	Entre el 1° al 7° día (período febril de la fase septicémica)	5	tubo con EDTA	TA* por 7 días
	Líquido cefalorraquídeo	4 a 10 días después del inicio de síntomas	0.5 -1	TA	TA Por 4 días
	Orina	10–28 días después del inicio de síntomas	50	TA	TA 2 a 4 horas
<b>Aislamiento PCR</b>	Tejido (hígado, pulmón, riñón, cerebro)	Necropsia	±2 cm	Enviar a 4°C en recipientes estériles en un plazo máximo de 6 horas	
<b>Histopatología</b>	Tejido (hígado y riñón)	Necropsia	±2 cm	2mL de cada tejido en 5mL de formol al 10%	TA

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

\*mL: mililitro

\*\*TA: Temperatura ambiente

## **Anexo 4. Medidas de prevención**

### **A. Intervención en la fuente de infección (huésped reservorio/portador):**

- Determinar qué especies animales son la fuente de infección y orientar medidas de control hacia el reservorio local.
- Separar los reservorios animales de viviendas humanas a través de cercas y mallas.
- Controlar la higiene animal y realizar vigilancia mediante el diagnóstico serológico en un subconjunto de la población animal.
- Vacunar a los perros y al ganado anualmente.
- Establecer el control de roedores (envenenamiento, trampas, evitando el acceso a alimentos y agua potable, separación de asentamientos humanos)
- Mantener el aseo de áreas alrededores de las viviendas a través de la eliminación de basura y motivación a la gente a no dejar recipientes de comida abiertos.

### **B. Intervención en la vía de transmisión**

- El riesgo de infección es minimizado evitando el contacto con orina animal, animales infectados o un ambiente contaminado.
- La transmisión puede prevenirse: usando ropa protectora; cubriendo lesiones cutáneas con ropas impermeables; bañándose o duchándose después de la exposición a salpicaduras de orina y suelo o agua contaminada; lavando y limpiando heridas; creando conciencia sobre los riesgos potenciales y los métodos para prevenir o minimizar la exposición; proveyendo agua potable limpia; evitando cuerpos de agua conocidos o sospechosos de estar contaminados (piscinas, ríos, lagos); estableciendo procedimientos de seguridad estandarizados en laboratorios; manejando los rebaños de manera apropiada; desinfectando áreas contaminadas si es posible.

### **C. Intervención a nivel del huésped humano**

- Incremento de conciencia en la población general y en grupos de riesgo, proveyendo profilaxis con antibióticos en casos específicos, vacunación que está disponible en algunos países, educación de médicos y de la comunidad, disseminación de información sobre control de brotes a través de comunicados de prensa y de anuncios de radio y televisión.

Algunas de las medidas principales recomendadas por varios autores son:

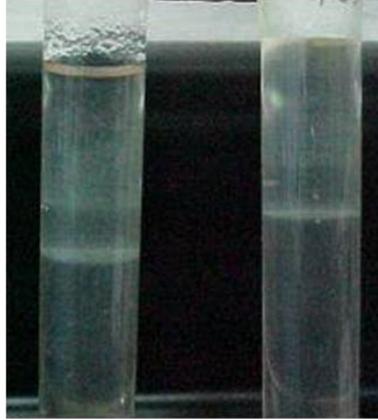
- Protección individual de los trabajadores como: ganaderos, trabajadores de alcantarillados, obreros agrícolas veterinarios, arrozales, cañeros etc. mediante el uso de calzado y vestimentas apropiadas (botas, delantales guantes, antiparras, tapaboca) según la tarea que se desempeñen.
- Higiene personal y del ambiente doméstico, se debe impedir el ingreso de animales al interior de los domicilios, así como a los galpones de producción o almacenamiento de alimento.
- Control ecológico de la población animal salvaje.
- Aislamiento de los animales domésticos.
- Realizar estudios epidemiológicos para tener noción sobre prevalencia de la enfermedad en la especie así como para saber que serogrupo o serovar está circulando.
- Las mascotas deben vacunarse anualmente.
- Realizar informe anual sobre la situación de la enfermedad en el territorio (OMS, 2008; Sandow y Ramírez, 2005).

**Anexo 5.** Listado de serovariedades empleados para la prueba MAT

<b>Especie</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Serovar</b>	<b>Cepa</b>
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Lanka	R740
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Mozdok	5621
<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
<i>L. interrogans</i>	Serjoe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrech IV
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
<i>L. biflexa</i>	Samaranga	Patoc	Patoc I
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K (=LT821)
<i>L. weilii</i>	Manhao	Lincang	L14
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ214
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia

**Fuente:** Cepario proporcionado por el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala (LNS); que brindó seguimiento y capacitación para el mantenimiento del mismo. El cepario fue donado al LNS por el Laboratorio de Referencia Internacional de Leptospirosis del Instituto de Medicina Tropical de Holanda.

**Anexo 6.** Anillo o Disco de Dinger en cultivos de *Leptospira* spp.



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

## Anexo 7. Consentimiento informado



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

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

No. de identificación de la muestra: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

El participante leerá o escuchará el consentimiento informado antes de firmarlo. En caso de que no pueda escribir, puede colocar la huella del dedo pulgar.

El objetivo de la investigación es demostrar la presencia de *Leptospira interrogans* en pacientes que asistan al Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación.

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa con síntomas parecidos a la gripe o el dengue que puede llegar a causar la muerte, se transmite por una bacteria que se encuentra en las ratas y ratones que al orinar la transmiten a humanos y animales domésticos como los perros, cerdos y vacas. Además se transmite por agua contaminada con orina de animales infectados. Esta enfermedad aumenta con las lluvias debido a que los ríos crecen y causan inundaciones, provocando que el agua se contamine y ayudando a la bacteria a entrar por la piel, nariz, ojos y boca de animales y personas.

Se obtendrá una muestra de sangre (3 mL) que será tomada en los primeros 7 días de iniciados los síntomas y signos compatibles con leptospirosis en pacientes sin tratamiento antibiótico previo. La prueba que se le hará será para ver si ha estado en contacto con la bacteria que causa la enfermedad, por lo que los resultados se le entregarán a la semana de realizada la toma de muestra.

En ningún momento la toma de muestra representará algún peligro para la salud. Por lo tanto, **el estudio no conlleva ningún riesgo. Le informamos al participante que no recibirá ningún beneficio económico ya que la misma es totalmente voluntaria, por lo que está en la libertad de no aceptar participar en el estudio o salirse de este cuando lo desee, sin ninguna responsabilidad.**

**Todos los datos personales son confidenciales** y solo lo sabrán los investigadores responsables del estudio. Los resultados no serán impresos de ninguna manera que comprometa el anonimato de los participantes, sin embargo estos pueden ser utilizados para otros estudios.

#### A quién contactar en caso de preguntas:

Br. Karen Natareno, Br. Astrid Hernández y Br. Nalleli de León, investigadoras



## Anexo 8. Ficha epidemiológica

	<b>Universidad de San Carlos de Guatemala</b> <b>Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia</b> <b>Escuela de Química Biológica</b> <b>Departamento de Microbiología</b>		
<b>Aislamiento e identificación de <i>Leptospira interrogans</i> en pacientes atendidos en el Hospital Infantil de Infectología y Rehabilitación</b>			
<b>INSTRUCCIONES:</b> 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: __/__/__			
<b>A. Datos generales del paciente:</b>			
Nombre completo: _____			
Edad: _____	Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>		
Residencia: _____			
<b>B. Detalles clínicos:</b>			
<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: _____	
<b>C. Ha tenido contacto con:</b>			
<input type="checkbox"/> Ganado bovino	<input type="checkbox"/> Ratones	<input type="checkbox"/> Perros	
<input type="checkbox"/> Ganado porcino	<input type="checkbox"/> Gatos	<input type="checkbox"/> Otros: _____	
<b>D. Estuvo en contacto con agua de:</b>			
<input type="checkbox"/> Aguas residuales	<input type="checkbox"/> Ríos	<input type="checkbox"/> Lagos	<input type="checkbox"/> Otros: _____
<b>E. Ha realizado viajes en los últimos 15 días:</b>			
<input type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Dentro del país, especifique: _____	
especifique: _____		<input type="checkbox"/> Fuera	del país,

Karen Lorena Natareno Vásquez  
Autora

Astrid Lucía Hernández Estrada  
Autora

Bertha Laura Nalleli de León Ramos  
Autora

Licda. María Luisa García de López  
Coordinadora y asesora

Licda. Leticia del Carmen Castillo Signor  
Co-asesora

Lic. Martin Gil  
Revisor

Licda. Alba Marina Valdés de García, M. Sc.  
Directora Escuela de Química Biológica

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.  
Decano