

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE VETERINARIA**



**DETERMINACIÓN DE *Leptospira interrogans* EN
ROEDORES PLAGA EN EL MERCADO MUNICIPAL DE
PANAJACHEL, SOLOLÁ, GUATEMALA MEDIANTE LA
PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)**

SANDRA VERÓNICA MIRANDA SIPAQUE

Médica Veterinaria

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



**DETERMINACIÓN DE *Leptospira interrogans* EN
ROEDORES PLAGA EN EL MERCADO MUNICIPAL DE
PANAJACHEL, SOLOLÁ, GUATEMALA MEDIANTE LA
PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

SANDRA VERÓNICA MIRANDA SIPAQUE

Al conferírsele el título profesional de

Médica Veterinaria

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO:	M.Sc. Carlos Enrique Saavedra Vélez
SECRETARIA:	M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo
VOCAL I:	Lic. Zoot. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II:	M.Sc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III:	M.V. Carlos Alberto Sánchez Flamenco
VOCAL IV:	Br. Javier Augusto Castro Vásquez
VOCAL V:	Br. Juan René Cifuentes López

ASESORES

M.V. Héctor Eduardo Fuentes Rousselin
M.V. Luis Alfonso Morales Rodríguez
M.V. Blanca Josefina Zelaya de Romillo

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

DETERMINACIÓN DE *Leptospira interrogans* EN ROEDORES PLAGA EN EL MERCADO MUNICIPAL DE PANAJACHEL, SOLOLÁ, GUATEMALA MEDIANTE LA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título de:

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO A:

- A Dios:** Por guiarme en mi camino y darme luz cuando la necesité.
- A mis padres:** Carlos Miranda y Sandra Sipaque de Miranda, por apoyarme siempre, por su gran amor y paciencia.
- A mamita Cruz:** Por su cariño y por ser una persona trabajadora, sencilla y agradecida con Dios. Sé que nos cuidas desde el cielo.
- A mis hermanos:** Irene, Blanca, Carlos (QEPD) y Ángel de Jesús (QEPD), por estar conmigo en este largo camino.
- A mis sobrinos:** Samantha, Ernesto, David, Isaac y Katherine, por ser parte importante de mi vida.
- A mis abuelitos:** Por darme su cariño y apoyo.
- A mis bisabuelos:** Mamita Cata (QEPD) y Papito Alfonso (QEPD), por enseñarme a ser una persona sencilla y humilde.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por guiarme en esta etapa de vida y darme las herramientas para seguir adelante.

A mis padres: Por su gran amor, por corregirme en el momento preciso, por darme la oportunidad de seguir estudiando, por enseñarme que hay que seguir adelante a pesar de los obstáculos, son mi motivo de inspiración para seguir luchando, por acompañarme siempre y gracias por aceptar todos los animales que lleve a casa. Gracias por todo!!!

A mamita Cruz: Por las enseñanzas de vida compartidas, por su amor a nosotros y enseñarnos a ser fuertes. Siempre estarás conmigo.

A mis hermanas: Por su cariño y ayudarme siempre que las necesité.

A mis asesores: M.V. Luis Morales, M.V. Héctor Fuentes y M.V. Blanca Zelaya de Romillo, por su gran apoyo y amistad.

Al Depto. de Microbiología de la FMVZ-USAC: Por abrirme las puertas y apoyarme.

A la M.V. Cecilia Marcos: Por su amistad sincera.

A todos los que en este camino me acompañaron, apoyaron y brindaron su amistad...

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	
3.1 General	4
3.2 Específicos.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	
4.1 Leptospirosis.....	5
4.1.1 Definición.....	5
4.1.2 Sinónimos.....	5
4.1.3 Antecedentes.....	5
4.1.4 Agente etiológico	8
4.1.5 Clasificación de leptospira	11
4.1.6 Epidemiología y distribución	12
4.1.7 Reservorios	18
4.1.8 Mecanismos de infección	20
4.1.9 Manifestaciones clínicas en el hombre	22
4.1.10 Manifestaciones clínicas en los animales	23
4.1.11 Diagnóstico.....	26
4.1.12 Prevención y control	28
4.1.13 Tratamiento	29
4.2 Especies de ratas y ratones urbanos de Guatemala	29
4.2.1 <i>Rattus norvegicus</i>	30
4.2.2 <i>Rattus rattus</i>	31

4.2.3	<i>Mus musculus</i>	31
4.2.4	Distribución y aspecto de los tres principales roedores comensales.....	33
4.2.5	Señales de infestación por los tres principales roedores comensales.....	34
4.3	Método de PCR	36
4.3.1	La técnica de PCR.....	37
4.3.2	El análisis de las muestras	39

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1	Materiales.....	41
5.1.1	Recursos humanos.....	41
5.1.2	Materiales de campo	41
5.1.3	Materiales de laboratorio	42
5.1.4	Recursos químicos	44
5.1.5	Recursos biológicos	44
5.1.6	Área de trabajo	45
5.2	Metodología	45
5.2.1	Diseño de estudio.....	45
5.2.2	Muestreo.....	45
5.2.3	Captura de los roedores plaga	45
5.2.4	Sacrificio de los roedores plaga.....	46
5.2.5	Necropsia y toma de muestras	46
5.2.6	Traslado de las muestras	47
5.2.7	Preparación de las muestras y método de PCR.....	47
5.2.7.1	Método de maceración	47

5.2.7.2	Método de PCR	47
5.2.7.3	Análisis de PCR	47
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
VII.	CONCLUSIONES	51
VIII.	RECOMENDACIONES	52
IX.	RESUMEN	53
	SUMMARY	54
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
XII.	ANEXOS	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de leptospira.....	11
Cuadro 2	Estudios realizados para diagnosticar la presencia y prevalencia y los métodos de diagnósticos utilizados.....	13
Cuadro 3	Número de casos reportados en los diferentes departamentos de Guatemala desde el año 2001 al 2010.....	17
Cuadro 4	Distribución y aspecto de los tres principales roedores comensales.....	33
Cuadro 5	Señales de infestación por los tres principales roedores Comensales.....	34
Cuadro 6	Total de roedores plaga capturados en el mercado de Panajachel, Sololá.....	62
Cuadro 7	Resultados obtenidos por medio de PCR para diagnóstico de <i>Leptospira interrogans</i> en riñones de los roedores plaga capturados en el mercado de Panajachel, Sololá.....	63
Cuadro 8	Abundancia relativa de roedores plaga en las distintas áreas del mercado de Panajachel, Sololá.....	64
Cuadro 9	Boleta de resultados.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Abundancia relativa de roedores plaga en las distintas áreas del mercado de Panajachel, Sololá.....	65
Figura 2	Mapa de Panajachel, Sololá.....	72

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por bacterias patógenas del género *Leptospira* (Cardona, *et. al.*, 2008). Las condiciones ambientales prevalentes en la mayoría de países tropicales y subtropicales de América como las lluvias abundantes, desborde de aguas residuales durante las inundaciones, suelos no ácidos y las altas temperaturas favorecen la transmisión (Vanasco, *et. al.*, 2007).

La infección del hombre y de los animales se produce por vía directa o indirecta, a través de la piel y de las mucosas bucal, nasal y conjuntival. La vía más común es la indirecta, a través de aguas, suelo y alimentos contaminados por orina de animales infectados (Acha, *et. al.*, 2003).

La prevalencia de esta zoonosis está en aumento, fuertemente relacionado con el descenso de la calidad de vida y trabajo de la mayoría de la población. De este modo no es considerada sólo de carácter ocupacional, sino también del ámbito social (Carneiro, *et. al.*, 2004).

Hay que considerar también la alta infestación por ratas de que son objeto los mercados de abastos en general, debido a la abundancia de alimento así como a la forma en que es depositado. Este conjunto de circunstancias condicionarían situaciones en virtud de las cuales las personas que laboran en los mercados estarían bastante expuestas a la leptospirosis (Herrer y Liceras, 1960).

La rata gris o de alcantarilla (*Rattus norvegicus*) y la rata negra o de los techos (*Rattus rattus*) son considerados reservorios ecológicos de la leptospirosis, no desarrollando síntomas de esta zoonosis (Carneiro, *et al.*, 2004).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para detectar el ADN de la *Leptospira* en muestras clínicas. La PCR puede ser empleada con muestras de tejido ante o post-mortem (OPS/OMS/ILS, 2008).

Se realizó el estudio en el mercado municipal de Panajachel, Sololá donde no se conoce la prevalencia de la enfermedad y no existe información de la población de roedores presentes, por lo que se pretendió determinar el estado epidemiológico de *Leptospira interrogans* en roedores plaga mediante la detección de individuos positivos a este agente por medio de la prueba de PCR. Cabe mencionar que este mercado es el único existente en el lugar, por lo que la afluencia de visitantes es alta.

II. HIPÓTESIS

- Los roedores plaga que deambulan en el mercado municipal de Panajachel, Sololá son portadores de *Leptospira interrogans*.
- La presencia de *Leptospira interrogans* en los roedores plaga muestreados es mayor al 50 %.
- La presencia de *Leptospira interrogans* no depende de la especie ni del sexo.

III. OBJETIVOS

3.1 General:

- Generar información sobre la epidemiología de la leptospirosis en roedores plaga en el mercado de Panajachel, Sololá.

3.2 Específicos:

- Determinar la presencia de *Leptospira interrogans* en roedores plaga capturados en el mercado de Panajachel, Sololá, mediante la prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- Determinar el efecto de especie del hospedero sobre la presencia de *Leptospira interrogans*.
- Determinar el efecto del sexo del hospedero sobre la presencia de *Leptospira interrogans*.
- Determinar la abundancia relativa de los roedores plaga en las distintas áreas del mercado de Panajachel, Sololá.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Leptospirosis

4.1.1 Definición

La leptospirosis es una enfermedad causada por 223 serovares de *Leptospira interrogans* (Stanchi, *et. al*, 2007). Es considerada como una de las enfermedades zoonóticas de mayor prevalencia (Dammert, 2005).

Afecta a los animales domésticos y silvestres siendo estos una fuente de infección para el hombre. Podemos definir a la leptospirosis como una zoonosis de diagnóstico complejo que provoca pérdidas económicas difíciles de cuantificar (Brihuega, 2008).

Es una enfermedad de importancia global y distribución mundial, pero es más frecuente en las áreas tropicales donde las condiciones para su transmisión son particularmente favorables. Los últimos brotes han permitido que aumente el interés como problema de salud pública, debido a que estos han producido formas letales y presentaciones clínicas poco frecuentes, como los casos de hemorragia pulmonar grave (Céspedes, 2005).

Es reconocida ahora en muchas regiones del mundo como una causa frecuente de síndromes febriles indiferenciados, confundiéndola muchas veces con enfermedades endémicas de cada región; se creía que la leptospirosis se circunscribía sólo en áreas tropicales, pero actualmente se reportan casos en ciudades con más frecuencia (Céspedes, 2005).

Se ha considerado siempre a la leptospirosis como una enfermedad asociada con la ocupación de las personas, sobre todo cuando la persona está en

contacto directo o indirecto con orina de animales infectados. Sin embargo, el fenómeno de globalización, los cambios climáticos, y las migraciones de animales y personas hacia nuevas zonas, han propiciado que la leptospirosis sea considerada en la actualidad como un problema latente para cualquier población (Céspedes, 2005).

4.1.2 Sinónimos

Enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cortadores de caña, fiebre del pantano, fiebre de barro y otros nombres locales; enfermedad de Stuttgart o fiebre canicola (en perros) (PAHO, 2001).

4.1.3 Antecedentes

Probablemente Lacereaux (“Leçons de la pitié”) hizo en 1802, la primera descripción clínica de leptospirosis mientras que en 1883 Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias denominándolo tifus hepático (“typhus hepaticque grave ou bénin”) (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

Tres años después, en 1886, Mathieu en Francia y Weil en Alemania describen cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de agresión renal. Goldschmidt en 1887 propuso el nombre de Enfermedad de Weil (Aguinaga. *et. al.*, 2000). En 1905 Stimson identificó espiroquetas en los túbulos renales de un paciente al que se le diagnóstico fiebre amarilla (Dammert, 2005).

Es en 1914 que los japoneses Inada e Ido encuentran una espiroqueta en el hígado de cobayos infectados con sangre de enfermos mineros febriles. En el cobayo aparecieron fenómenos hemorrágicos y es por esta razón que los investigadores japoneses llamaron al agente encontrado *Spirochaeta*

icterohaemorrhagiae. El mismo equipo japonés encontró la relación de este microorganismo con las ratas de desagüe y al estudiarlas encontraron que el 40% de esas ratas eran portadoras de la *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

En 1917 y 1918 Noguchi estudió varias muestras aisladas en diferentes lugares y propuso la creación del género *Leptospira* (Aguinaga, *et. al.*, 2000). En 1922 Eodsworth informó el primer caso en seres humanos adecuadamente documentado con aislamiento del agente (Dammert, 2005).

En Perú, el Instituto Nacional de Salud Pública inició los estudios epidemiológicos en animales. Entre 1955 y 1957 Herrer estudió perros y gatos infectados por leptospiras y encontró que el 46.4% de los 444 perros estudiados de Lima y Callao presentaban anticuerpos con títulos positivos. Además en 26 de los 435 perros (6,4%) en los que se consiguió hacer cultivo de triturado de riñón, se aisló al microorganismo (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

Continuaron los estudios de la leptospirosis en Perú y nuevamente Herrer y Licerias mostraron en 1960 sobre la base de cultivo de riñón, que las ratas (*Rattus norvegicus*) que infestaban los mercados de abastos de la ciudad de Lima presentaban una incidencia de infección entre 38.3 y 54.5 dependiendo del mercado estudiado (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

En Guatemala el primer caso humano de leptospirosis fue detectado y confirmado por Torres M. en 1980. El serogrupo correspondiente al *L. interrogans*, serovariedad *copenhageni* fue confirmado en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta -CDC- (Zelaya, *et. al.*, 2008).

En el 2003, Orantes J., realizó en Guatemala un estudio prospectivo en 90 pacientes que ingresaron con sintomatología sugestiva de leptospirosis, a la

emergencia del Hospital General San Juan de Dios. En dicho estudio comparó la microscopía de campo oscuro, la prueba de látex y la de ELISA IgM, para la detección de leptospirosis. Determinó que el 73.3%, que fueron positivos (reactivos) con la prueba de ELISA IgM para leptospirosis, seguida del 14.4% positivos para citomegalovirus y el 6.6% de positividad, incluía hepatitis A, B, C, dengue y mononucleosis infecciosa. Debido a lo anterior se explica porque cuando se trata de pacientes con enfermedades febriles agudas, es frecuente que la prueba de ELISA IgM, presente reacciones cruzadas y de resultados falsos positivos, por lo que es indispensable confirmarlos con la prueba MAT, recomendado por la OPS como el estándar de oro. (Zelaya, *et. al.*, 2008).

Por otro lado, en el 2003, en la aldea de El Milagro, municipio de Masagua, departamento de Escuintla, se reportó un brote de leptospirosis que ocurrió después de las inundaciones causadas por el río Escalante. (Zelaya, *et. al.*, 2008).

En el año 2005, en Guatemala se estandarizó la prueba de aglutinación microscópica MAT para el diagnóstico de leptospirosis humana (Zelaya, *et. al.*, 2008).

En el 2007, determinaron la presencia de anticuerpos de *Leptospira interrogans* en 30 muestras de sueros de perros de dos clínicas ubicadas en la zona 18 de la capital de Guatemala, 7 fueron positivas a *Leptospira interrogans* por la prueba de aglutinación microscópica (MAT) (Zelaya, *et. al.*, 2008).

4.1.4 Agente etiológico

En 1962 la subcomisión de Taxonomía de las leptospirosis de la Organización Mundial de la Salud, acordó dividir a estas bacterias en dos especies: *L. interrogans* (patógenos para los humanos) y *L. biflexa* (no patógenos), basándose en su comportamiento bioquímico, en la capacidad de infectar

animales, resistencia a la acción de los iones de cobre bivalentes, en sus características biológicas y en las exigencias de cultivo (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

La unidad de agrupación taxonómica es el serovar o serotipo. Los serovares son agrupados por sus afinidades antigénicas (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

La leptospira presenta la siguiente clasificación taxonómica:

- División: *Procariotes*
- Clase: *Schizomicetes*
- Orden: *Spirochaetales*
- Familia: *Leptospiraceae*
- Género: *Leptospira*
- Especies: *L. interrogans*, *L. biflexa* (Dammert, 2005).

Desde mediados de la década de 1980, las especies de leptospiras aisladas de animales y humanos fueron diferenciadas en base a estudios de hibridación con DNA-DNA llamándolas *L. interrogans* sensu stricto (en el sentido estricto) (ahora llamada *L. interrogans*), *L. kirschneri*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. inadai*, *L. fainai* y *L. alexanderi*. Los serogrupos fueron igualmente distribuidos en las especies: por ejemplo el serogrupo Pomona, comprende los serovares *kunning*, *mozdok* y *tsaratsovo*, las cuales pertenecen a la especie *L. kirschneri*, mientras que las restantes siete serovares de este grupo pertenecen a otras tres especies. Esto lleva a una confusión desde el punto de vista clínico, por lo que continúa utilizándose la clasificación serológica (Stanchi, *et.al*, 2007).

Actualmente, la clasificación del género *Leptospira* está basada en la homología del ADN y está dividido en 17 especies; definido en 70% de homología y 5% de divergencia en el ADN, el avance en la biología molecular ha permitido

también secuenciar su genoma que consiste de dos cromosomas circulares (Céspedes, 2005).

No obstante, esta clasificación coexiste con la clasificación serológica antigua; debido al problema en la clasificación, los nuevos aislamientos de *Leptospira* deben caracterizarse por pruebas moleculares y serológicas (Céspedes, 2005).

La leptospira es de forma helicoidal, aeróbico obligatorio, presenta en uno o ambos extremos una curvatura en forma de gancho, tiene una gran movilidad que le viene dada por un axostilo, el cual está formado por dos filamentos axiales insertados en un disco o protuberancia al final del cuerpo citoplasmático y cuyo extremo libre está unido a la región media de la bacteria estas características se observan en microscopio electrónico. Tiene un diámetro aproximado de $\sim 0,25\mu\text{m}$ y una longitud variable entre $6-25\mu\text{m}$ y puede pasar por membranas de filtración de poro $0,22\mu\text{m}$, ésta característica hace que la *Leptospira* sea observable únicamente en un microscopio de campo oscuro o de contraste de fase, y además que no se pueda colorear con anilinas (Céspedes, 2005).

La leptospira se cultiva en medios artificiales, las cuales podrían contener 10% de suero de conejo ó 1% de suero albúmina bovina y tween 80, a un pH 6.8 – 7.4; el crecimiento óptimo es entre 28 y 30°C . Para evitar la contaminación del medio se puede adicionar antibióticos o intercalantes como el 5-fluorouracil y sulfato de neomicina para hacerlo selectivo. Los medios comúnmente usados son el Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris medium (EMJH) el cual contiene 1% BSA y Tween 80; Korthoff's y Fletcher's (Céspedes, 2005).

4.1.5. Clasificación de leptospira (CUADRO 1)

Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa de referencia
Leptospiras patógenas			
<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>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>Pomona</i>	Mozdok	5621
<i>L. meyeri</i>	<i>Semarang</i>	Semarang	Velrad Semarang 173
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Ballum</i>	Ballum	Mus 127
	<i>Ballum</i>	Castellonis	Castellon 3
	<i>Javanica</i>	Javanica	Veltrat Bat 46
	<i>Sejroe</i>	Sejroe	M 84
	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi	Perepicilin
<i>L. weilli</i>	<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>Semarang</i>	Saopaulo	Sao Paulo
Leptospiras saprófitas			
Genomospecies 3	<i>Holland</i>	Holland	Waz Holland (P438)
<i>L. biflexa</i>	<i>Semarang</i>	Patoc	Patoc I
<i>L. wolbachii</i>	<i>Codice</i>	Codice	CDC

(Brihuega, 2008)

4.1.6 Epidemiología y distribución

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, con mayor incidencia en las zonas tropicales que en las regiones con climas cálidos como la costa; actualmente su transmisión ocurre con mayor frecuencia en zonas donde hay expansión poblacional, especialmente en países en vías de desarrollo (Céspedes, 2005).

Se desconoce su real incidencia, debido a la falta de conocimiento de la enfermedad, a la gran proporción de infección subclínica que puede pasar desapercibida, y que los métodos diagnósticos no están disponibles en las áreas endémicas. En estudios desarrollados en la selva del Perú (regiones de Loreto y Madre de Dios), se halló una proporción muy alta (20- 30%) con evidencia serológica de leptospirosis aguda en pacientes con síndrome febril indiferenciado (Céspedes, 2005).

La distribución de la leptospirosis se ha clasificado en dos grandes grupos: a) Leptospirosis rural: asociada a actividades agroganaderas y recreativas que impliquen el contacto con medios acuáticos (ganaderos, agricultores y excursionistas) y b) Leptospirosis urbana: la población expuesta corresponde a grupos profesionales u ocupacionales (veterinarios y zootecnistas, recolectores de basura, obreros de saneamiento, personal de zoológicos y/o zocriaderos, jardineros, etc.) (Dammert, 2005).

Actualmente, la leptospirosis se ha observado en personas ajenas a los grupos anteriores como lo son niños, amas de casa, estudiantes, profesionales y turistas. La incidencia de la enfermedad es mayor en adultos jóvenes del sexo masculino comprendidos entre los 20 y 40 años (Zelaya, *et. al.*, 2008).

La prevalencia de esta zoonosis está en aumento, fuertemente relacionada con el empeoramiento de las condiciones de vida y trabajo de la mayoría de la población. De este modo no es considerada sólo de carácter ocupacional, sino también del ámbito social (Dammert, 2005).

El número de casos reportados en el mundo entero no es preciso pero se calcula que la incidencia de casos se encuentra en un rango de 0.1 a 1 personas por 100,000 personas al año en climas templados y de 10 a 100 personas por 100,000 en países que van desde climas húmedos a tropicales (Zelaya, *et. al.*, 2008).

En países vecinos como México, Cuba, Honduras, Nicaragua, El Salvador y Costa Rica, a la leptospirosis le confieren una gran importancia en medicina tanto humana como veterinaria, dada la manera en que afecta la salud del ser humano y de los animales y a su repercusión en la economía (Zelaya, *et. al.*, 2008).

La leptospirosis en Guatemala ha sido estudiada en humanos, animales y en el agua; en el siguiente cuadro se mencionan algunos de los estudios realizados para diagnosticar la presencia, prevalencia y los métodos de diagnósticos utilizados:

CUADRO 2. Estudios realizados para diagnosticar la presencia, prevalencia y los métodos de diagnósticos utilizados

Título de estudio/ Entidad encargada	Fecha de realización/ Publicación	Lugar de realización	Especie estudiada/ Sustrato	Método de diagnóstico	Resultados obtenidos
Dr. Alfonso Toledo/ Fac. Ciencias Med., USAC	1947	Hospital Militar, Guatemala	Un caso humano sospechoso.	Examen de orina en fondo oscuro.	No pudo comprobar si era leptospirosis.

Químico biólogo Miguel Torres	1980	Guatemala	Primer caso humano documentado	Observación directa de leptospira en campo oscuro del plasma heparinizado y sedimento urinario, aislamiento del ag. etiológico en hemocultivos, pruebas de aglutinación.	Positivo
Fac. Med Vet. Y Zoot., USAC	1980 y 1982	Occidente y Norte de Guatemala	Bovinos	-----	Prevalencias de 65 a 80 %
Jaime Silva/ Estudio serológico de leptospirosis porcina en el Depto. de Santa Rosa	Mayo – Oct. 1981	Santa Rosa	Sueros sanguíneos de 250 porcinos	Macroaglutinación en placa	135 sueros positivos (54% prevalencia)
Fac. Med Vet. Y Zoot., USAC	1981 y 1986	Santa Rosa y Guatemala	Porcinos	-----	Prevalencias de 23 a 54 %
Estuardo Godoy/ Estudio histológico de leptospirosis en la rata domestica en diferentes municipios del Depto. de Guat.	1983	9 Municipios de Guatemala	177 roedores: <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Microtus agrestis</i>	Técnica de tinción de Giemsa	9 casos positivos (5.8% prevalencia)
Fac. Med Vet. Y Zoot., USAC	1983 y 1986	Ciudad capital de Guatemala	Perros y Ratas	Microaglutinación, microaglutinación en placa, determinación antigénica, determinación de	Prevalencias de 8.9% (perros) y

				anticuerpos y métodos histopatológicos.	5.08% (ratas)
Carmen Álvarez/ Estudio serológico de leptospirosis en perros de la ciudad de Guat.	1986	Ciudad capital de Guatemala	205 Perros	Prueba de microscopia de aglutinación- lisis	Prevalencia 8.09%
Ligia González/ Prevalencia de leptospirosis porcina en cerdos beneficiados en el rastro de Santa Catarina Pinula.	1986	Santa Catarina Pinula	260 muestras de cerdos	-----	134 muestras positivas (23.56% prevalencia)
Dr. Feliciano Lux Zapon/ Fac. Ciencias Med., USAC	1987	Hospital General de El Quiché	100 pacientes, de 1 a 60 años de edad	Seroaglutinación macroscópica en placa de 12 serotipos de <i>Leptospira</i> y cultivos en medio de Fletcher.	Prevalencia 69%
Juan Carlos Monge/ Leptospirosis en Guatemala	Nov. 1998 – 15 Mayo 1999	Registros médicos de toda la república	Humanos	Determinación de la IgM sérica, campo oscuro	25 casos positivos.
Ingrid Vides/ Determinación de la presencia de <i>Leptospira</i> sp. En la especie cotuza (<i>Dasyprocta punctata</i>) en un zoológico privado de la ciudad de	2005	Zoológico del IRTRA Petapa, Guatemala.	Cotuzas (<i>Dasyprocta punctata</i>)	Microaglutinación en campo oscuro	5 Cotuzas seropositivas, (25% prevalencia)

Guatemala.					
Ana Medina/ Determinación de la presencia de anticuerpos contra <i>leptospira interrogans</i> en cerdas de cinco granjas tecnificadas de Guatemala, utilizando la prueba de microaglutinación (MAT)	2008	5 Granjas de cerdas técnicas de Guatemala	50 Muestras de suero de cerdas	Prueba de microaglutinación (MAT)	14 positivas (28% prevalencia)
Dra. Blanca de Romillo/ Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.	2008	La Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.	199 Personas mayores de 15 años de edad, 46 perros, 12 bovinos; 33 suinos, 9 fuentes de agua para consumo humano.	Prueba de microaglutinación (MAT), Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Humanos 103/199 positivos (51.8%), perros 29/46 positivos (63%), bovinos 6/12 positivos (50%), suinos 15/33 positivos (45.45%); agua 14 /28 muestras positivas.
Raúl Díaz/ Determinación de la presencia de <i>Leptospira interrogans</i> en roedores sinantrópicos de la Aldea El	2011	La Aldea El Milagro, Masagua, Escuintla.	100 Ratas	Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Prevalencia 73%

Milagro, Masagua Escuintla utilizando la técnica de PCR					
---	--	--	--	--	--

De acuerdo a los reportes del laboratorio central del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, los casos de leptospirosis han aumentado, pero también hay que tomar en cuenta que no todos los casos son reportados. Podemos observar los departamentos que reportan casos de leptospirosis en el siguiente cuadro:

CUADRO 3. Número de casos reportados en los diferentes departamentos de Guatemala desde el año 2001 al 2010.

AÑO	No. DE CASOS	DEPARTAMENTO
2001	1	Guatemala
2002	6	Guatemala, Izabal San Marcos, Zacapa
2003	16	Escuintla, Guatemala Izabal, Zacapa Quiché
2004	2	Guatemala
2005	3	Escuintla, San Marcos Guatemala
2006	8	Chiquimula, Escuintla Guatemala, Petén Sacatepéquez
2007	9	Escuintla, Zacapa Guatemala

2008	8	Quetzaltenango Guatemala, Izabal
2009	13	Chiquimula, Suchitepéquez Escuintla, Guatemala Zacapa, Jutiapa
2010	6	Guatemala, Sacatepéquez

(Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, 2010)

4.1.7 Reservorios

Los reservorios de las leptospiras son animales que mantienen una relación de comensales con las bacterias y no sufren o sufren muy levemente la enfermedad; transfieren las leptospiras a sus crías en útero o el periodo neonatal, favoreciendo la cadena de transmisión. Los portadores son aquellos animales que mantienen las leptospiras viables y con capacidad de multiplicarse en sus riñones, excretándolas intermitentemente por la orina; muchos de estos pueden tener serología negativa. Los reservorios más importantes son mamíferos pequeños que pueden transmitir la infección a los animales domésticos y a los humanos (Céspedes, 2005).

Los reservorios de las leptospirosis son una serie de animales salvajes y domésticos. La serovariedad de la leptospira infectante varía de acuerdo con el animal afectado. En las ratas el serotipo característico es el *icterohemorrhagiae*, en los cerdos el *pomona*, en el ganado bovino *hardjo*, en los perros *canicola* y en los mapaches *autumnalis*. Sin embargo los serotipos no son necesariamente específicos de la especie animal y pueden aparecer diferentes serotipos en los

animales, por lo que es importante no solo el reservorio sino las características del medio ambiente (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

Otros reservorios han sido incriminados como portadores: venados, ciervos, ardillas, zorros, mapaches, marsupiales y leones de mar. Inclusive fueron encontrados anticuerpos en crotálidos. Las variedades que infectan a los reptiles y anfibios (ranas) al parecer no infectan al ser humano. En los reservorios la infección suele ser oligo o asintomática pero mantienen leptospiruria por largo tiempo y en algunas especies por toda la vida (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

También pueden ser reservorios primarios algunos animales silvestres como los zorrillos, cabras, conejos y murciélagos, mientras que el hombre es un mal reservorio; hecho que se explica porque los primeros tienen el pH de la orina alcalino, favoreciendo la sobrevivencia de la leptospira. Así se sabe que 1 ml de orina de vaca puede contener hasta 100 millones de microorganismos, a diferencia del hombre que tiene una orina relativamente ácida para la leptospira, constituyéndose en un huésped accidental. La excreción de la leptospira en la orina de los reservorios puede ocurrir por períodos prolongados y contaminar el ambiente (Dammert, 2005).

Los roedores son unos de los animales más importantes en la transmisión de la leptospirosis sobre todo la relacionada a las formas ictéricas y de mayor cuidado en el humano. La mayoría de ellos vive en ambientes silvestres en equilibrio con la naturaleza pero al producirse alteraciones de la misma como en el Fenómeno de El Niño, la redistribución del curso de las aguas por la lluvia excesiva llevó a la destrucción de sus madrigueras, acercándolos hacia el abrigo que la vivienda humana puede ofrecerles (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

Algunas especies que son llamadas roedores comensales o sinantrópicos se adaptan mejor a las condiciones ambientales creadas por el hombre (*Rattus* y

Mus). De esta manera *Rattus norvegicus* (rata de desagües), *Rattus rattus* (rata del tejado) y *Mus musculus* (ratón doméstico) deben ser reconocidos por sus características morfológicas y características de su comportamiento entendiendo las áreas donde buscan abrigo, la forma de su dinámica poblacional, cuáles son sus predadores naturales así como sus habilidades y comportamiento habitual (Aguinaga, *et. al.*, 2000).

4.1.8 Mecanismos de infección

Después de la primera semana de leptospiremia, las leptospiras se eliminan del organismo animal por vía urinaria, y contaminan el medio ambiente. La infección del hombre y de los animales se produce por vía directa o indirecta, a través de la piel y de las mucosas bucal, nasal y conjuntival. La vía más común es la indirecta, a través de aguas, suelo y alimentos contaminados por orina de animales infectados (Acha, *et. al.*, 2003).

Otras formas de transmisión de la infección entre animales de granja son la transmisión por vía congénita o neonatal. También ha sido reportada la transmisión sexual de leptospiras (OPS/OMS/ILS, 2008).

Las personas que trabajan con ganado están muchas veces expuestas a la orina de los animales, ya sea de modo directo o por aerosol, que puede contaminar sus conjuntivas, mucosa nasal o abrasiones en las partes descubiertas de la piel. También pueden infectarse en forma indirecta, al caminar descalzos en lugares donde los animales han orinado. En muchos países, los animales domésticos, sobre todo cerdos y bovinos, constituyen importantes reservorios de leptospiras y una fuente frecuente de infección para el hombre. Entre los animales de compañía, el perro es una fuente común de infección para el hombre por los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* (Acha, *et. al.*, 2003).

Hay que considerar también la alta infestación por ratas de que son objeto los mercados de abastos en general, debido a la abundancia de alimento así como a la forma en que es depositado. Este conjunto de circunstancias condicionarían situaciones en virtud de las cuales las personas que laboran en los mercados estarían bastante expuestas a la leptospirosis (Herrer y Liceras, 1960).

La infección puede ser adquirida durante la lactancia ya que las leptospiras contaminan la leche cuando el animal padece mastitis. En los seres humanos hay algunos datos recientes sobre esta forma de transmisión (Zelaya, *et. al.* 2008).

Las leptospiras patógenas (*L. interrogans*) no se multiplican fuera del organismo animal. Por consiguiente, para que se constituya un foco de leptospirosis es necesario que, además de animales portadores, existan condiciones ambientales favorables para la supervivencia del agente causal en el medio exterior. Las leptospiras requieren un alto grado de humedad ambiental, un pH neutro o ligeramente alcalino y temperaturas adecuadas. Terrenos bajos, anegadizos, receptáculos naturales o artificiales de agua dulce (lagunas, arroyos, embalses y otros) son favorables a su supervivencia, en tanto que el agua salina les resulta deletérea. La temperatura reinante en los países tropicales es un factor muy favorable para las leptospiras, pero esto no excluye que casos de leptospirosis se presenten en climas fríos, aunque con menos frecuencia (Acha, *et. al.*, 2003).

El agua es uno de los vehículos más importantes para su transmisión. En el hombre, los deportes acuáticos han hecho aumentar últimamente el número de casos de leptospirosis (Stanchi, *et. al.*, 2007).

La leptospira demostró ser muy sensible a ciertas bacterias ambientales que proliferan rápidamente en el agua. Estos estudios sugieren que la lluvia incrementa la posibilidad de supervivencia y posiblemente la multiplicación

de leptospira patógena en el medio ambiente, al diluir las sales y los metabolitos microbianos. Otros autores han encontrado que las corrientes de agua y los arroyos son mucho más peligrosos que acumulaciones de agua estática, posiblemente más ricas en bacterias ambientales y con mayores concentraciones de sales (Trueba, *et. al.*, 2002).

4.1.9 Manifestaciones clínicas en el hombre

El período de incubación es usualmente de 5 -14 días, con un rango entre 2 y 30 días. Después de la infección, las leptospirosis aparecen en la sangre e invaden prácticamente todos los tejidos y órganos. Ellas son, subsecuentemente, eliminadas del organismo por la respuesta inmune del huésped, no obstante lo cual, pueden asentarse en los túbulos contorneados de los riñones y ser eliminadas en la orina por un período de pocas semanas a varios meses y ocasionalmente por un lapso mayor. Son luego eliminadas de los riñones y otros órganos aunque pueden persistir en los ojos por mucho más tiempo (OPS/OMS/ILS, 2008).

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

1. Enfermedad leve de tipo pseudogripal
2. Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias.
3. Meningitis/ meningo encefalitis
4. Hemorragia pulmonar con falla respiratoria (OPS/OMS/ILS, 2008).

El diagnóstico clínico es difícil por esta presentación variada y no específica; su confusión con otras enfermedades (dengue y otras enfermedades hemorrágicas), es particularmente común en los trópicos, además, las

presentaciones clínicas se pueden superponer en la medida en que la infección progresa (OPS/OMS/ILS, 2008).

El hombre es susceptible a un gran número de serotipos. La enfermedad se caracteriza por dos fases, la fase bacterémica, que dura 7 a 10 días, y la fase leptospirúrica, que dura entre una semana y varios meses. Las manifestaciones clínicas varían y tienen diferentes grados de severidad. Además, hay numerosos casos de infección inaparente o subclínica. En general, se distinguen dos tipos clínicos: icterica y anictérica. La ictericia grave o tipo hepatonefrótica, (enfermedad de Weil) es mucho menos frecuente que el tipo anictérica. Algunos autores estiman que la forma icterica se produce en aproximadamente el 10% de los casos. A menudo se asocia con la infección causada por *L. icterohaemorrhagiae*. Por otra parte, numerosas infecciones causadas por *L. icterohaemorrhagiae* pueden ocurrir en forma anictérica. En la forma clásica de la enfermedad de Weil, el inicio de los síntomas es súbito, con fiebre, dolor de cabeza, mialgias, conjuntivitis, náuseas, vómitos, y diarrea o estreñimiento. Petequias en la piel, hemorragias en el tracto gastrointestinal y la proteinuria son comunes. Hepatomegalia e ictericia, insuficiencia renal marcados con oliguria o anuria, azotemia y pueden desarrollar desequilibrio electrolítico (PAHO, 2001).

Han encontrado que las leptospiras pueden residir en el tracto genital (útero y oviductos) en mujeres embarazadas y no embarazadas. La infección del tracto genital puede indicar la posibilidad de transmisión sexual (PAHO, 2001).

4.1.10 Manifestaciones clínicas en los animales

Ganado: Al menos 13 serotipos se han aislado de bovinos. En las Américas, los serotipos predominantes en el ganado bovino son *pomona*, *hardjo* y *grippotyphosa*, a veces, se encuentran infecciones causadas por *canicola* e

icterohaemorrhagiae, así como por otros serotipos. Los serovares *pomona* y *hardjo* son universales (PAHO, 2001).

La infección puede causar una enfermedad aguda o subaguda o permanecer clínicamente inaparente. La enfermedad se manifiesta con una fiebre que dura cuatro o cinco días, causando anorexia, conjuntivitis, y diarrea. La leptospiremia comienza a desaparecer cuando se forman anticuerpos, y las leptospiras desaparecen por completo de la circulación sanguínea en aproximadamente una semana debido a la inmunidad humoral. Las leptospiras sobrevivientes se albergan en los túbulos de los riñones y la infección entra en una fase crónica. La leptospiruria arroja enormes cantidades de leptospiras en el medio ambiente exterior, en particular durante los primeros meses de la infección. La leptospiruria causada por *hardjo* es mucho más prolongada que la causada por *pomona*. El serovar *hardjo* (serogrupo *Sejroe*) en el ganado bovino se caracteriza por dos síndromes: (a) una reducción significativa en la producción de leche, y los abortos (b) terneros recién nacidos débiles que mueren poco después del nacimiento (PAHO, 2001).

Cerdo: Los serovares más a menudo aislados de cerdos en las Américas y en el resto del mundo son *pomona*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, así como *bratislava* y *muenchen* del serogrupo *Australis*. Los cerdos son un reservorio muy importante de *pomona*, con leptospiruria abundante y prolongada. La infección clínica varía de un rebaño a otro. En algunos casos, la infección se produce subclínica, aunque los animales pueden presentar una fiebre que dura unos pocos días, en otros, la infección produce síntomas tales como el aborto y el nacimiento de lechones débiles. Crecimiento lento de los lechones, ictericia, hemoglobinuria, convulsiones, también han observado trastornos gastrointestinales. En ocasiones, la meningitis y la sintomatología nerviosa están presentes. El aborto generalmente ocurre entre los 15 y 30 días después de la

infección. Los principales serotipos que causan abortos o lechones nacidos muertos son *pomona*, *tarassovi*, y *canicola* (PAHO, 2001).

Caballos: Los caballos reaccionan serológicamente a muchos serotipos prevalentes en el medio ambiente. *Pomona* se ha aislado de estos animales en los Estados Unidos, y *hardjo* se ha aislado en Argentina. En Europa, *sejroe*, *icterohaemorrhagiae*, y *canicola* se han aislado, así como *pomona*. La mayoría de las infecciones son asintomáticas. Puede presentarse fotofobia, lagrimeo, edema de la conjuntiva ocular, miosis e iritis en la fase aguda de la enfermedad. En la fase crónica, en el ojo se observan adherencias anteriores y posteriores, un cuerpo vítreo turbio, formación de cataratas, uveítis, y otras alteraciones oftalmológicas. En ocasiones hay abortos en yeguas infectadas. Opacidad corneal, que es con frecuencia una secuela de la fase aguda, se puede reproducir a través de la inoculación de leptospiras inactivadas de serotipos diferentes (PAHO, 2001).

Ovejas y cabras: epizootias en estas especies no son muy frecuentes. Varios serovares que parecen haber venido de otras especies animales en el mismo entorno han sido aislados de ovejas y cabras en países diferentes, por ejemplo, *hardjo* en Australia y Nueva Zelanda, *pomona* en los Estados Unidos y Nueva Zelanda, *grippotyphosa* en Israel, y *ballum* en Argentina. Al igual que en otras especies de rumiantes, la enfermedad se caracteriza por fiebre, anorexia y, en algunos animales, por la ictericia, hemoglobinuria, anemia, aborto, nacimiento de crías débiles o nacidas muertas e infertilidad. La virulencia de la serovariedad infectante y el estado del animal puede determinar la gravedad del cuadro clínico (PAHO, 2001).

Perros y gatos: Los serovares predominantes en los perros en todo el mundo son el *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. Además de estos serotipos, *pyrogenes*, *paidjan*, y *tarassovi* se han aislado en América Latina y el Caribe, y *ballum*,

grippotyphosa, *pomona*, *bratislava* se han aislado en los Estados Unidos. Serovares similares predominan en Europa. La infección puede ir desde asintomática hasta grave. La forma más grave es la hemorrágica, que se inicia repentinamente con una fiebre que dura de tres a cuatro días, seguido de rigidez y mialgias en las piernas traseras y hemorragias en la cavidad oral con una tendencia hacia la necrosis y faringitis. En una etapa posterior, puede causar gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda. La ictericia puede ocurrir con la infección por *canicola* o por *icterohaemorrhagiae*, en particular en las infecciones causadas por este último serovar. La tasa de letalidad se estima en 10%. La enfermedad rara vez ocurre en los gatos (PAHO, 2001).

Animales silvestres: Muchos animales salvajes, incluyendo roedores, se adaptan perfectamente a leptospiras y no presentan síntomas o lesiones (PAHO, 2001).

4.1.11 Diagnóstico

El diagnóstico de la leptospirosis comprende el diagnóstico clínico, bacteriológico, molecular y serológico. El aspecto clínico presenta variadas manifestaciones según especie y edad. El diagnóstico bacteriológico intenta detectar al agente etiológico. El diagnóstico molecular detecta el ADN del microorganismo, y el serológico investiga la presencia de anticuerpos (Brihuega, 2008).

Los estudios bacteriológicos identifican al microorganismo por métodos directos, mediante la observación en microscopio de campo oscuro, coloraciones argénticas, aislamiento del agente en cultivos especiales, inoculación en animales de laboratorio, inmunofluorescencia directa e inmunohistoquímica. El aislamiento es el diagnóstico confirmatorio y para su intento se cultivan fluidos y órganos en los medios especiales para leptospira (Fletcher, EMJH). El diagnóstico molecular

es útil para detectar leptospiras, sobretodo en materiales contaminados o de difícil aislamiento, o cuando las leptospiras no están viables (Brihuega, 2008).

La PCR (polimerasa chain reaction) identifica el ADN de manera específica con elevada sensibilidad y en corto período de tiempo a partir de cualquier material clínico. La PCR tiene como ventajas la confirmación rápida del diagnóstico en la fase inicial de la enfermedad y la detección del ADN del microorganismo, no dependiendo de la viabilidad del agente. Esta es una técnica muy sensible, pero la combinación de dos métodos directos de diagnóstico es mejor y debe ser asociado a la microaglutinación (MAT). El punto crítico de la técnica PCR es la etapa de extracción del ADN, debiéndose ajustar a los diferentes tejidos y fluidos (Brihuega, 2008).

El diagnóstico serológico es el diagnóstico más solicitado en caso de sospecha de leptospirosis los métodos utilizados son indirectos; hay diferentes técnicas de tamizaje y una técnica de confirmación. Los métodos de screening son prácticos, económicos y detectan anticuerpos en fase temprana. Pero tiene como desventaja, que no permiten determinar serovariedad, no miden la cinética de los anticuerpos y son menos específicos (Brihuega, 2008).

La técnica ELISA es útil para el diagnóstico temprano ante cuadros inespecíficos como leptospirosis, detecta infecciones recientes, es sensible y tiene buena concordancia con MAT. La MAT es la prueba de referencia (gold standard), pero se necesita personal entrenado, mantener el cepario y un chequeo del antígeno (Brihuega, 2008).

El apoyo del laboratorio es necesario para confirmar el diagnóstico, la leptospirosis es difícil de diferenciar desde el punto de vista clínico de un gran número de enfermedades. Los métodos de laboratorio ayudan a confirmar la leptospirosis en donde se sospecha la enfermedad en base a los aspectos

clínicos. Existen razones epidemiológicas y de salud pública; tales como determinar el serovar que está causando la infección, la probable fuente de infección, el reservorio potencial y su ubicación, todo lo que constituye a definir las estrategias de control (OPS/OMS/ILS, 2008).

4.1.12 Prevención y control

Por causa del gran número de serovares y fuentes de infección y las amplias diferencias en las condiciones de transmisión, el control de la leptospirosis es complicado y dependerá de las condiciones locales. El control puede ser alcanzado interviniendo el reservorio o reduciendo la infección en las poblaciones de animales reservorio tales como perros o ganado. El control de animales silvestres puede ser difícil. Las medidas preventivas deben estar basadas en el conocimiento de los grupos particularmente vulnerables a la infección y los factores epidemiológicos locales. La prevención y control deben dirigirse de la siguiente forma: a) la fuente de infección. b) la ruta de transmisión entre la fuente de infección y el huésped humano. c) la infección o enfermedad en el huésped humano (OPS/OMS/ILS, 2008).

Es importante establecer qué especies animales constituyen la fuente de infección en un área en particular, pues las medidas de control pueden entonces ser orientadas o dirigidas a las especies de animales reservorios locales. Tales medidas incluyen:

- La reducción de una determinada población animal reservorio, ej. Ratas.
- La separación de los animales reservorios de las viviendas humanas a través de cercas y mallas.
- La inmunización de perros y ganado.
- Eliminación de la basura y mantenimiento de la limpieza en las áreas alrededor de las viviendas humanas.

- Motivación de las personas a no dejar alimentos a su alrededor, especialmente en áreas recreativas, en donde las ratas pueden estar presentes (OPS/OMS/ILS, 2008).

Existen distintas sustancias químicas de carácter leptospiricida: Fenol al 5%, alcohol al 70%, formol al 2%, ácido clorhídrico 2%, emulsión de creolina al 5%, sosa cáustica al 2%, solución al 0.05% de ácido sulfúrico durante 5 minutos. (Sandow y Ramírez, 2005). Los desinfectantes corrientes, los detergentes, el jabón y el pH inferior a 5 o superior a 8 afectan al microorganismo (Zamora y Riedemann, 1999).

4.1.13 Tratamiento

1. Las penicilinas, las cefalosporinas, la lincomicina y la eritromicina tienen actividad inhibitoria in vitro. En ensayo de doble ciegos en que los testigos recibieron placebo, se ha demostrado que la doxiciclina y la penicilina G son eficaces (Zelaya, *et. al.*, 2008).
2. Es necesario emprenderlo más tempranamente posible el tratamiento específico en forma rápida (Zelaya, *et. al.*, 2008).
3. Las tetraciclinas y los antibióticos del grupo de los macrólidos también son eficaces (Carter, 1989).

4.2 Especies de ratas y ratones urbanos de Guatemala

[Los roedores toman su nombre del latín "rodere" a roer.](#) Los roedores se diferencian de otros mamíferos por la forma y ubicación de sus dientes. Tienen solamente un par de incisivos en cada mandíbula. Los incisivos están separados de los molares por un espacio vacío (diastema) (Elias, 1984).

El estrecho contacto de los roedores plaga con el humano, su capacidad de penetrar en casi todos los edificios y su frecuente costumbre de dejar por doquier el rastro de su orina y excrementos, hacen de estos un transmisor ideal de enfermedades (Picco, 2003).

Los roedores (principalmente ratas y ratones) han sido un flagelo para el hombre durante la historia. Son animales altamente prolíficos y muy adaptables. Son causantes de una variedad de problemas; transmiten muchas enfermedades que pueden afectar al hombre y sus animales domésticos; causan daños a equipos, sistemas de riego, edificios, cables eléctricos y más; causan pérdidas que disminuyen la cantidad de alimento disponible para el hombre (Elias, 1984).

Los roedores plaga más importantes en productos almacenados en América Latina son los roedores cosmopolitas, del orden Rodentia, de la familia Muridae, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* y *Mus musculus* (Angel, 2008).

4.2.1 *Rattus norvegicus*

Llamada también rata gris, de alcantarilla o noruega (Elias, 1984; Dale, 2003).

Se diferencia principalmente de la rata negra porque su hocico es achatado o redondeado y sus orejas más pequeñas; nadan con gran habilidad por sistemas de alcantarillado y su habilidad de mantener la respiración las ayuda a transitar por cañerías hasta alcanzar baños y sifones de residencias; esto facilita el transporte de enfermedades y su dispersión en zonas habitadas (Elias, 1984).

4.2.2 *Rattus rattus*

Llamada también rata trepadora, de los techos, negra o de barco (Elias, 1984; Dale, 2003).

Aunque su color típico es negro, puede variar hacia tonos grisáceos. Su mayor habilidad consiste en trepar por superficies verticales, cuerdas de luz, techos, troncos de árboles, etc. Su capacidad de salto, le permite alcanzar alturas de un poco más de 1 metro desde una superficie plana; salta horizontalmente hasta 1.20 metros, facilitando con eso su acceso a lugares teóricamente imposibles de alcanzar (Elias, 1984).

La distribución actual de la rata noruega (*Rattus norvegicus*) y la rata negra (*Rattus rattus*) parece estar relacionada a dos factores: la competencia entre especies y la reacción de ambas a los diferentes climas. La rata noruega es más agresiva y se convierte en la especie dominante ante la rata negra; solamente en condiciones especiales viven ambas especies en una misma área. Parece que la rata noruega es definitivamente un animal de climas templados. Generalmente en los trópicos se encuentra solamente en las zonas de los puertos (Elias, 1984).

4.2.3 *Mus musculus*

Llamado también ratón doméstico, casero, pericote o laucha (Elias, 1984; Dale, 2003).

Probablemente es el mamífero más ampliamente distribuido en el mundo, se han capturado en plena tundra en regiones árticas; dentro de los edificios y sus alrededores los ratones domésticos ocupan una gran variedad de lugares; se han encontrado a 1,800 pies bajo la superficie en una mina de carbón. Comúnmente, por su tamaño se confunde como crías de las ratas, cuando en realidad son

animales diferentes. Su tamaño pequeño lo caracteriza y hace que pueda penetrar fácilmente por aberturas de 1cm de diámetro y ocultarse en orificios pequeños y difíciles de localizar; puede saltar hasta 30.5 cm y caer de alturas de 2.5 metros sin causarse daño; aunque no tienen igual capacidad de nadar como las ratas, pueden llegar a hacerlo si es necesario, además trepan fácilmente por superficies verticales ya sean de ladrillo o de madera y transitan por cables eléctricos o por cualquier otro conducto horizontal delgado (Elias, 1984).

En general los roedores son omnívoros y se adaptan a cualquier tipo de alimento, aunque cada especie tiene sus propias preferencias. La rata noruega (*Rattus norvegicus*) por ejemplo, tiene predilección por desperdicios del hombre y la rata negra (*Rattus rattus*) se inclina más por plantas o material vegetal si éste está disponible. Frutas, cereales, vegetales, pescado, carne y otras materias son utilizados según las condiciones en que se encuentren. Los ratones domésticos (*Mus musculus*) tienen una especial preferencia por cereales. La necesidad por agua varía entre especies pero la mayoría de roedores toman agua si ésta está disponible, a veces la dieta les proporciona agua adecuada para vivir (Elias, 1984).

Las ratas y ratones no tienen buena vista. Los sentidos más desarrollados son el tacto, el oído y el olfato. Aparentemente, el olfato les sirve para determinar la presencia de otras ratas y para localizar alimentos preferidos. El tacto es el sentido utilizado para orientarse con la ayuda de pelos del cuerpo y bigotes largos y sensibles. El oído es muy sensible y lo utilizan para percibir el peligro; sin embargo, se adaptan rápidamente a un determinado ruido constante por ejemplo maquinaria (Elias, 1984).

La presencia de roedores en casas, bodegas, graneros u otros lugares donde hay productos almacenados se indica por varios signos característicos incluyendo sonidos, excrementos, orina, manchas, sendas, huellas, roeduras, madrigueras, nidos y escondrijos de alimentos (Elias, 1984).

4.2.4 Distribución y aspecto de los tres principales roedores comensales (CUADRO 4)

	Rata noruega (<i>Rattus norvegicus</i>)	Rata de tejado (<i>Rattus rattus</i>)	Ratón doméstico (<i>Mus musculus</i>)
DISTRIBUCIÓN	Profusamente distribuida en las regiones templadas, tanto en zonas urbanas como agrícolas.	Mayor profusión en las regiones tropicales donde se la encuentra en todas las zonas urbanas y es común en las plantaciones y matorrales.	Se le encuentra en viviendas, almacenes de alimentos y construcciones agrícolas por todo el mundo. En algunas regiones viven libremente en campos.
ASPECTO			
Ojos	Relativamente pequeños.	Relativamente grandes.	Relativamente pequeños.
Orejas	Relativamente pequeñas y peludas.	Grandes, relativamente delgadas, pelos ralos.	Relativamente grandes, pelos ralos.
Nariz	Roma	Puntiaguda	Puntiaguda
Cola	Gruesa, más corta que la cabeza y el cuerpo sumados, a menudo de color oscuro en la parte superior del cuerpo y de color claro en la parte inferior.	Delgada, más larga que la cabeza y el cuerpo sumados, de color uniformemente oscuro.	Delgada, más o menos de la misma longitud que la cabeza y el cuerpo sumados, de color uniformemente oscuro.
Color	Generalmente de color gris pardo con el vientre más claro, alguna que otra vez,	Tres formas de color: negra con vientre gris, pardo con vientre gris, pardo	Generalmente pardo-gris ya sea con el vientre ligeramente más claro o blanco,

	de color negro o leonado.	con el vientre blanco.	alguna que otra vez de color negro o leonado.
Escala de peso del adulto	150 a 500 g.	120 a 350 g.	12 a 25 g.

(Jamieson y Jobber, 1974)

4.2.5 Señales de infestación por los tres principales roedores comensales (CUADRO 5)

	Rata noruega (<i>Rattus norvegicus</i>)	Rata de tejado (<i>Rattus rattus</i>)	Ratón doméstico (<i>Mus musculus</i>)
Deyecciones	Grandes (hasta de 2.5 cm de longitud), normalmente puntiagudas y a menudo en agrupamientos.	De tamaño mediano (hasta de 1.5 cm de longitud), romas, a menudo curvadas, esparcidas.	Pequeñas (hasta de 0.75 cm de longitud), generalmente muy esparcidas, pero pueden estar también concentradas en lugares preferidos. Sólo se las distingue de inmediato a menos que la especie sea muy abundante.
Sendas	A menudo claramente discernibles sobre el suelo a la intemperie, a través de hierba y matorrales. En lugares cerrados, tienden a correr junto a las paredes.	Menos visibles que las de la rata noruega, salvo a la altura del techado dentro de las construcciones.	Se las encuentra en objetos por los que a menudo cruza la especie. Las manchas debajo del entramado del techado son parecidas a las que deja la rata de

			noruega, aunque más pequeñas.
Manchas de tizne	Manchas grasosas que, en lugares cerrados, se encuentran a lo largo de las paredes, cerca del nivel del suelo; pero, debajo del entramado de los techados hay manchas curvas que no presentan ninguna solución de continuidad.	Encontradas principalmente a la altura del techo. Por lo general, las manchas debajo del entramado del techado aparecen en forma de curvas con solución de continuidad.	Cabe encontrarlas, tras una atenta inspección, en lugares polvorientos o en alimentos divididos en finas partículas.
Huellas de pies y cola	Particularmente manifiestas en hábitats muy húmedos y fangosos. En el interior de construcciones se las encuentra, comúnmente, en lugares polvorientos.	Corrientemente sólo se las encuentra en el interior de lugares cerrados a lo largo de la parte alta, cubierta de polvo, de paredes y cabos.	Pequeños (de 2 a 3 cm de diámetro), Sin que sean manifiestos. Abre galerías dentro de materias alimenticias ensacadas, en grietas de paredes y algunas veces en la tierra.
Agujeros de madriguera	De 6 a 8 cm de diámetro y dan a extensos sistemas de galerías.	Prefiere un modo de vida en el que haya de trepar, pero a veces excava galerías debajo de construcciones y rocas.	En pilas de materias alimenticias, desechos y la mampostería de las construcciones.
Nidos	Dentro de construcciones, en	Dentro de construcciones,	Nidos de unos 10 cm de diámetro, cuando

	materias alimenticias apiladas, desechos y oquedades de las paredes. A la intemperie, en galerías subterráneas.	generalmente a la altura del techado, a la intemperie en árboles, vegetación podrida y matorrales.	están bien contruidos.
--	---	--	------------------------

(Jamieson y Jobber, 1974)

4.3 Método de PCR

En 1986, Kary B. Mullis, un investigador de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico. Se trata de la reacción en cadena de la polimerasa, ya muy conocida como PCR, siglas provenientes del inglés *Polymerase Chain Reaction* (Satz y Kornblihtt, 1993).

La PCR en una prueba *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes períodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Rodríguez y Barrera, 2004).

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico,

posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención (Rodríguez y Barrera, 2004).

4.3.1 La técnica PCR

Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Puede ser, por ejemplo, ADN nuclear total (Satz y Kornblihtt, 1993).

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces (Satz y Kornblihtt, 1993).

La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización". En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "apareamiento" de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los *primers*, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa

desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers* (Satz y Kornblihtt, 1993).

Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizarla doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C y los 80° C y resiste más de dos horas a 93°C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados. Todo esto no hace más que confirmar la creciente popularidad de la PCR entre investigadores, médicos y bioquímicos clínicos (Satz y Kornblihtt, 1993).

Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. Obtener el mismo resultado utilizando las técnicas clásicas de clonado llevaría varios días de tedioso trabajo. Por otra parte, la técnica PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha: mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide (Satz y Kornblihtt, 1993).

4.3.2 El análisis de las muestras

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los *primers* que definen los extremos "derecho" e "izquierdo" de ese fragmento. Así, una vez que la reacción a finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico. Por otra parte, la identidad del producto puede ser confirmada mediante hibridación (unión complementaria) con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de bases esté contenida en el fragmento de interés. En este caso se procede así: el ADN fraccionado por electroforesis es desnaturalizado y luego transferido a una membrana de nitrocelulosa o *nylon*, que actúa como soporte sólido (*Southern blot*) y luego es puesto en contacto con la sonda, que se unirá al fragmento buscado ya que ha sido preparada de modo tal que resulta ser complementaria del mismo. También es posible colocar el ADN directamente en la membrana en forma de pequeñas manchas (*dot blot*) para su posterior hibridación con la sonda. La localización de las sondas radiactivas se logra, en ambos casos, mediante autorradiografías (Satz y Kornblihtt, 1993).

Una estrategia distinta para confirmar la identidad del fragmento replicado consiste en realizar dos reacciones de PCR consecutivas. Al finalizar la primera, una alícuota de la misma es sometida nuevamente al proceso de multiplicación tras haber colocado dos *primers* internos. Mediante el empleo de esta metodología, conocida como *nested* PCR (PCR anidada), la filiación de los fragmentos obtenidos queda confirmada por el hecho de que poseen tamaños previsibles (Satz y Kornblihtt, 1993).

En algunos casos, los productos amplificados poseen secuencias que son reconocidas y clivadas por ciertas enzimas llamadas endonucleasas de restricción. La determinación del tamaño al que quedan reducidos los fragmentos al ser puestos en contacto con la enzima de restricción adecuada indica que nos encontramos ante los segmentos de interés (Satz y Kornblihtt, 1993).

Para diseñar los *primers* que hacen posible replicar un fragmento de ADN mediante la técnica PCR es necesario conocer, en la mayoría de los casos, la secuencia de bases total o parcial de dicho fragmento. Por esta razón, aunque la PCR supera en sensibilidad y rapidez a las técnicas de clonado y de secuenciación convencionales, no se puede prescindir de la información brindada por las mismas (Satz y Kornblihtt, 1993).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos humanos

- 1 Estudiante tesista
- 3 Médicos Veterinarios asesores
- Técnicos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Administrador del mercado de Panajachel, Sololá

5.1.2 Materiales de campo

- 105 Trampas tipo jaula
- Cebos (tortillas, carne, salchichas, galletas, mantequilla de maní, pollo cocido, pollo frito, huevo cocido)
- Cámara de sacrificio (Hielera hermética de poliestireno expandido duroport®)
- 1 Plancha de poliestireno expandido (duroport®)
- Equipo de disección
- Tubos eppendorf 2 ml
- Hielera con hielo para el transporte de muestras
- 1 Mascarilla para gases con filtro de carbón
- Mascarillas descartables
- 1 Caja de guantes de látex
- Bata blanca
- Guantes de cuero
- Alfileres

- Algodón
- Toallas de papel
- Bolsas grandes
- Vehículo
- Combustible
- Equipo de computo
- Cámara fotográfica digital
- Útiles de oficina (lápices, bolígrafos, papel, masking tape, calculadora, entre otros)

5.1.3 Materiales de laboratorio

- Campana de seguridad
- Microcentrífuga para tubos Eppendorf (12,000 rpm)
- Baño de calentamiento calibrado a 98 °C
- Vortex para microtubos
- Termociclador
- Microondas
- Pesa digital
- Cámara y componentes para electroforesis
- Transiluminador UV
- Congelador calibrado a -20 °C
- Refrigeradora calibrada a 4 °C.
- 1 Balón volumétrico de 125 ml
- 1 Beaker de 100 ml
- 1 Pipeta de 10 ml
- Micropipetas de 0.5 – 10 µl
- Micropipetas de 5 - 50 µl
- Micropipetas de 10 - 100 µl

- Micropipetas de 50 - 1000 μ l
- Puntas de 0.5 – 10 μ l
- Puntas de 20 μ l
- Puntas de 100 μ l
- Puntas de 200 μ l
- Puntas de 1,000 μ l
- Tubos eppendorf de 2 ml
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Tubos eppendorf de 200 μ l
- Porta gel de agarosa
- Peines para gel
- Papel parafilm
- 1 Caja de guantes de nitrilo sin polvo
- Bolsas plásticas transparentes
- Papelitos estériles para pesar
- Bata blanca manga larga
- Soportes de duroport®
- Bajalenguas estériles
- Bandeja metálica
- Papel aluminio
- Gradillas
- Morteros
- Pistilos
- Tijeras
- Pizetas

5.1.4 Recursos químicos

- Cloro
- Cloroformo
- Medio de cultivo EMJH (Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris)
- 5 Furacilo
- Agua estéril para trabajos de ADN
- Agua destilada estéril.
- Buffer Tris-acetate-edta TBE 10 X (ó TAE 10 X)
- Buffer NL 10 X
- $MgCl_2$ 2.5 mM
- dNTP (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) 25 mM
- Primers específicos (*Leptospira interrogans*)
- *Taq* DNA polimerasa : 5 U / μ l
- Agarosa para ácidos nucleicos
- Bromuro de Etidio : 10mg / ml
- Marcador de peso molecular estándar de ADN (escalera)
- Colorante azul de bromo fenol
- Alcohol etílico

5.1.5 Recursos biológicos

- Los riñones de 74 roedores plaga atrapados en el mercado sujeto al estudio.
- Cepa de *Leptospira interrogans* sembrada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.1.6 Área de trabajo

Panajachel, Sololá se encuentra a una altitud de 1,573 msnm, con una extensión territorial de 22 km², es de clima templado, con temperaturas entre 12 °C y 18 °C. Se realizó el estudio en el mercado municipal de dicha localidad. (Mapa de Panajachel, Sololá, FIGURA 2)

5.2 Metodología

5.2.1 Diseño del estudio

Estudio descriptivo de corte transversal.

5.2.2 Muestreo

Se realizó el muestreo completamente al azar capturando 74 roedores plaga en las siguientes áreas del mercado: Carnicerías, pollerías, marranerías, área de frutas y verduras, área de abarrotes y granos básicos, área de comedores, área de ropa y zapaterías.

5.2.3 Captura de los roedores plaga

Se utilizaron 105 trampas tipo jaula de activación automática al momento de que el roedor tocara el cebo. Los cebos que utilicé fueron tortillas, carne, salchichas, galletas, mantequilla de maní, pollo cocido, pollo frito, huevo cocido. El material de las jaulas fue de alambre galvanizado, para evitar que los especímenes ya capturados las destruyeran.

Se colocaron 105 trampas en el mismo episodio de captura en las siguientes áreas: Carnicerías, pollerías, marranerías, área de frutas y verduras,

área de abarrotes y granos básicos, área de comedores, área de ropa y zapaterías. Para determinar la abundancia relativa de los roedores plaga, se utilizaron 15 trampas en cada una de las 7 áreas del mercado antes mencionadas.

Se ubicaron las trampas donde se observaron marcas o rastros de los roedores (grasa corporal, heces y roeduras), los días domingo, lunes y martes por la tarde-noche y se retiraron al día siguiente antes de que abrieran el mercado, hasta coleccionar 74 roedores plaga.

5.2.4 Sacrificio de los roedores plaga

Se sacrificaron los roedores en el municipio de Panajachel, en un local acondicionado para dicha actividad. Se introdujeron a los roedores en la cámara de sacrificio (hielera), cada uno dentro de su trampa. Se introdujo un algodón con cloroformo e inmediatamente se selló la cámara con su respectiva tapa y se esperó 20 minutos aproximadamente, para asegurarse que los roedores estuvieran muertos. Para no reducir el número de trampas se reutilizaron previa desinfección con cloro. Como medidas de bioseguridad se utilizó mascarilla antigases y guantes de cuero (Angel, 2008).

5.2.5 Necropsia y toma de las muestras

Se colocaron en decubito dorsal a los roedores sobre un cuadro de duroport®, sujetándoles cada extremidad con alfileres. Se realizó una incisión en el abdomen, se retiraron los órganos abdominales y se extrajeron los riñones (Parsonneault, 1999). Se conservaron los riñones en un tubo eppendorf con el medio EMJH + 5 furacilo y se refrigeraron. Al realizar la necropsia se utilizó mascarilla descartable, guantes de látex y equipo de disección.

5.2.6 Traslado de las muestras

Las muestras obtenidas, debidamente identificadas se transportaron conservando la cadena fría hacia el laboratorio de biología molecular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.2.7 Preparación de las muestras y método de PCR

5.2.7.1 Método de maceración

Se maceró el tejido en un mortero con un pistilo, añadiendo 1 ml del medio de cultivo EMJH, luego se centrifugó la muestra de 1,500 μ l en tubos eppendorf de 2 ml a 12,000 rpm/2 min (Fernández, 2007). Se utilizaron guantes de nitrilo sin polvo y bata blanca.

5.2.7.2 Método de PCR

Obtenidas las 74 muestras se realizó el método de PCR. Se utilizaron guantes de nitrilo sin polvo y bata blanca. El procedimiento está descrito en anexos.

5.2.7.3 Análisis de PCR

Los productos amplificados se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se visualizaron por fluorescencia de rayos UV en el transiluminador. El funcionamiento de electroforesis se lleva a cabo a 125 voltios, 90 mA; con una duración de 45 minutos (Fernández, 2007).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se capturaron 74 roedores plaga de la especie *Rattus rattus* (21 machos y 11 hembras) y *Mus musculus* (20 machos y 22 hembras) en diferentes áreas del mercado de Panajachel, Sololá, de los cuales se utilizaron los riñones como muestra para el diagnóstico. (Tabla 3).

Se realizó la técnica de PCR donde los resultados fueron negativos a *Leptospira interrogans*, por lo que no se pudo determinar la presencia, ni establecer los efectos de especie y sexo del hospedero (Tabla 4).

La mayor abundancia relativa que se obtuvo fue del 30% (22/74) (tabla 5 y gráfica 1), encontrada en las áreas de las marranerías. Al parecer esta preferencia es debida a la disponibilidad de alimento o bien porque usan como vía de paso esta zona. Otra razón que podría explicar este resultado es la cercanía de las marranerías con un área verde, lugar que los roedores podrían utilizar como refugio.

Los resultados negativos a *Leptospira interrogans* en el presente estudio puede deberse a varias razones:

La temperatura ambiental es un factor importante para su desarrollo. Reporta Raúl Díaz (2011), que en la Aldea El Milagro, del municipio de Masagua, Escuintla que tiene una temperatura promedio de 25 °C, encontró una prevalencia de leptospirosis del 73%. Esto sugiere que las temperaturas más bajas presentes en Panajachel, dificulten la subsistencia de *la Leptospira interrogans* en el ambiente.

El personal de la administración del mercado de Panajachel, Sololá comenta que los vendedores ubicados dentro del mismo limpian sus áreas de

trabajo con cloro o creolina. El uso de desinfectantes y jabones que varíen el pH del suelo y del agua, haciéndolos ácidos o alcalinos, afecta a la sobrevivencia de la *Leptospira interrogans*, (Zamora y Riedemann, 1999).

En contra posición, si no se realiza una desinfección correcta abra contaminación bacteriana en los locales. Trueba, *et. al.* (2002) observaron que la contaminación con ciertas bacterias ambientales destruye rápidamente a las leptospiras, esta demostró ser muy sensible a ciertas bacterias ambientales que proliferan rápidamente en el agua con lo que concluye la poca competitividad de las leptospiras frente a otros microorganismos.

Zamora y Riedemann (1999) describieron no haber obtenido resultados positivos en el tejido renal de roedores silvestres. Los riñones podrían no ser el tejido más adecuado para el diagnóstico de leptospira. Producto de los resultados del trabajo de Giraldo de León, *et. al.* (2002) quien concluye estar parcialmente de acuerdo con quien afirma que el riñón es la víscera más apropiada para el diagnóstico. De los 75 roedores que capturaron, pudieron demostrar que en orina la positividad es más baja que en órganos, siendo preferible el pulmón para el examen directo. Siendo la *Leptospira interrogans* una bacteria con requerimientos de oxígeno, su paso por el pulmón es parte de su patogénesis, en tanto que en la infección renal crónica, la excreción de leptospiras es baja y una proporción de las espiroquetas se elimina como complejo inmune, lo cual no permite su crecimiento en el cultivo (Giraldo de León, *et. al.*, 2002).

Se realizó el estudio cuando todavía predominaba la temporada seca, por lo que la ausencia de acumulo de agua, pudo afectar la diseminación de esta espiroqueta y por ende la presencia de esta en los roedores capturados. Zamora y Riedemann (1999), pudieron apreciar que la prevalencia varió notablemente de acuerdo a la estación del año en que se capturaron los roedores, siendo mayor en invierno. Otros estudios sugieren que la lluvia incrementa la posibilidad de

supervivencia y posiblemente la multiplicación de leptospira patógena en el ambiente, al diluir las sales y los metabolitos microbianos (Trueba, et al, 2002).

Como menciona Céspedes (2005), los roedores son reservorios de leptospiras patógenas, que mantienen una relación de comensales con las bacterias y no sufren la enfermedad o bien esta se desarrolla muy levemente. Sacsquispe, *et. al.* (2003) que obtuvieron resultados positivos a leptospira en roedores y perros con la técnica MAT, pero resultados negativos con cultivos renales en los mismos individuos.

VII. CONCLUSIONES

- Los roedores plaga que deambulaban al momento del estudio, en el mercado municipal de Panajachel, Sololá fueron negativos a *Leptospira interrogans*.
- Al momento de realizar la presente investigación no fue posible demostrar la presencia de *Leptospira interrogans*, ni la dependencia del efecto de la especie y del sexo de esta en los roedores plaga objeto de estudio.
- El área del mercado de Panajachel, Sololá con mayor abundancia relativa de roedores plaga fue el de las marranerías con un 30% (22/74).

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos estudios que incluyan la época seca y de lluvia, permitiendo establecer la influencia de los factores climáticos y su relación con la presencia o ausencia de *Leptospira interrogans*.
- Implementar por parte de las autoridades correspondientes, mecanismos para el control de roedores plaga que habitan en el mercado municipal de Panajachel, Sololá.
- Continuar con este tipo de estudio en otras zonas del país con la finalidad de obtener un mapa actualizado de la presencia de *Leptospira interrogans*, aumentando el tiempo del proceso de captura y con ello más sesiones de trampeo.
- Realizar estudios serológicos que permitan establecer si los roedores tienen anticuerpos que indiquen la exposición previa del hospedero a *Leptospira interrogans*, utilizando diferentes serovares como antígeno.
- Realizar otros estudios con el objeto de determinar la presencia de *Leptospira interrogans* en roedores plaga, en donde deberá incluirse el pulmón y otros órganos para el diagnóstico.
- Para obtener mejores referencias de la prevalencia, es recomendable realizar junto con PCR otras técnicas diagnósticas, como cultivos y MAT.
- Incluir a los perros que deambulan en el mercado municipal de Panajachel, Sololá, como objeto de estudio ya que los perros son posibles hospederos de *Leptospira interrogans* y poseen un estrecho vínculo con los humanos.

IX. RESUMEN

El presente estudio se realizó en el mercado de Panajachel, Sololá, capturando 74 roedores plaga, de la especie *Rattus rattus* (21 machos y 11 hembras) y *Mus musculus* (20 machos y 22 hembras), con el objeto de determinar la presencia de *Leptospira interrogans*, el efecto de especie y sexo del hospedero.

Los riñones obtenidos de los roedores plaga sujetos a estudio fueron negativos a *Leptospira interrogans* por medio de la prueba PCR, por lo que no se pudo determinar ninguno de los factores antes mencionados. La ausencia de esta puede deberse a varias razones como el pH del suelo y del agua, la temperatura ambiental, el uso de desinfectantes y jabones para la limpieza de los locales, el número de capturas realizadas y la época predominante del año en que se realizó el estudio.

Los resultados obtenidos sugieren que es necesario realizar más estudios, para abarcar ambas épocas del año, obtener mayor número de capturas y complementar con pruebas serológicas.

El área del mercado de Panajachel, Sololá con mayor abundancia relativa de roedores plaga fue el de las marranerías con un 30% (22/74).

SUMMARY

This study took place in Panajachel, Solola's market where 74 rodents plague were caught from the species *Rattus rattus* (21 males and 11 females) and *Mus musculus* (20 males and 22 females) with the purpose of determine the presence of *Leptospira interrogans*, in order to determinate the effect of the species and sex of the host.

The kidneys from the rodents plague were studied and got a negative result of *Leptospira interrogans* through the test PCR and any fact abovementioned before was gotten. The absence of it may be caused by pH of the ground and water, climate, disinfectant and detergent, the number of rodents that were caught and the predominant season of the year where this study took place.

The results obtain suggest that it is necessary more studies, in order to cover all the seasons of the year, obtain more capture and complement with serological tests.

The Panajachel, Solola's market largest rodents plague place, was in pork meat shop, with a 30% (22/74).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha, P; Szyfres, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3 ed. Estados Unidos, Organización Panamericana de la Salud. p. 112 – 119.
2. Aguinaga, A. *et. al.* 2000. Leptospirosis. (en línea). Consultado 25 oct. 2010. Disponible en <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/M%C3%B3dulo%20T%C3%A9cnico%20%20leptospirosis.PDF>
3. Angel, D. 2008. Determinación de la presencia de quistes de *Toxoplasma gondii*, en ratas o ratones de tres mercados municipales de la ciudad de Guatemala. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT, USAC/FMVZ. 48 p.
4. Blood, DC. *et. al.* 1982. 5 ed. México. Nueva editorial interamericana S.A. de C.V. p. 594 – 604.
5. Brihuega, B. 2008. Leptospirosis. (en línea). Consultado 03 mayo 2010. Disponible en http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/vet_enf_inf_tripod/lepto/leptovb.htm
6. Cardona, M. *et. al.* 2008. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. (en línea). Caracas, VE. Consultado 28 abr. 2010. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v28n1/art06.pdf>
7. Carneiro, M; *et. al.* 2004. Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: Estudio clínico y epidemiológico. *Revista chilena de infectología*, 21(4), 339-344. (en línea). Chile. Consultado 03 jun. 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-

10182004000400008&lng=es&tlng=es.10.4067/S0716-1018200400040008

8. Carter, G. 1989. Fundamentos de bacteriología y micología veterinaria. Trad. MR Vergés. Zaragoza, ES. Editorial Acribia, S.A. p. 238 – 241.
9. Céspedes, M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. (en línea). Consultado 25 oct. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/363/36322408.pdf>
10. Dale, W. 2003. Plagas Pests Medicas Veterinarias: Ratas y Ratones Plaga (en línea). Consultado 05 oct. 2010. Disponible en http://www.lamolina.edu.pe/profesores/wdale/ent_med_vet/2/PLAGAS%20PESTS%20M%C3%89DICAS%20VETERINARIAS.%20RATAS%20Y%20RATONES%20PLAGAS.%20VERSI%C3%93N%20%2001.T14.%20WILLIAM%20E.%20DALE%20PHD..pdf
11. Dammert, N. 2005. Leptospirosis: una revisión bibliográfica. (en línea). Consultado 25 oct. 2010. Disponible en http://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/Monografia_leptospira.pdf
12. Elías, D. 1984. Roedores como plagas de productos almacenados; control y manejo (en línea). Chile, FAO. Consultado 05 oct. 2010. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/x5052S/x5052S00.HTM>
13. Fernández, C. 2007. Protocolo para detección de leptospira por la reacción en cadena de la polimerasa. s. l. Laboratorio nacional de referencia de leptospirosis. 5 p.

14. Giraldo De León, G, *et. al.* 2002. Los roedores como reservorios de Leptospiras en plantales porcinos de la zona central cafetera de Colombia. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(1), 69-78. (en línea). Colombia. Consultado 03 jun. 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000100007&lng=es&tlng=es.10.4.0.67/S0301-732X2002000100007
15. Herrer, A. y Liceras, J. 1960. Leptospirosis en el Perú: III Encuesta serológica en el Mercado Central de Lima. *Rev. perú. med. exp. salud pública*. vol.13, n.1-2. pp. 108-112. (en línea). Perú. Consultado 03 jun. 2011. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341960000100009&lng=es&nrm=iso>.ISSN1726-4634
16. Jamieson, M; Jobber, P. 1974. Manejo de los alimentos: ecología del almacenamiento. vol. 1. Trad. R Palazón. México. Editorial Pax-México. p. 89-100.
17. Naranjo, E. 1995. Estimaciones de abundancia y densidad en poblaciones de fauna silvestre tropical. (en línea). México. Consultado 20 mar. 2011. Disponible en http://www.manejofauna_silvestre.org/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?Command=Core_Download&EntryId=5516&language=es-ES&PortalId=86&TabId=3469
18. OPS/OMS/ILS. 2008. Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. (en línea). Brasil. Consultado 24 abr. 2010. Disponible en <http://www.anlis.gob.ar/inst/iner/archivos/ManualLeptospirosis.pdf>
19. PAHO. 2001. Zoonoses and communicable diseases Common to man and animals: Bacterioses and mycoses. 3ed. Vol. 1. Washington, EU. PAHO. 395 p.

20. Parsonneault, E; Ward, J. 1999. Virtual Mouse Necropsy (en línea). Consultado 18 jul. 2010. Disponible en [http://icg.cpmc.columbia.Edu/cattorette/Protocol/ FilesInPdf/NCIVetp.pdf](http://icg.cpmc.columbia.Edu/cattorette/Protocol/FilesInPdf/NCIVetp.pdf)
21. Picco, N. 2003. Los roedores como transmisores de enfermedades zoonóticas. (en línea). Consultado 20 sep. 2010. Disponible en [http://www.quiveter.com/ ftp/articles/articulo550.pdf](http://www.quiveter.com/ftp/articles/articulo550.pdf)
22. Rodríguez, I; Barrera, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. (en línea). México. Consultado 07 jul. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/402/40270307.pdf>
23. Ruano, E. 2010. Leptospirosis: número de casos humanos del 2000 a la fecha confirmados, prueba de laboratorio que utilizan para diagnóstico, departamentos afectados y la posible fuente de infección. Guatemala, GT. Ministerio de salud pública y asistencia social. (Correspondencia personal)
24. Sacsquispe, R; *et. al.* 2003. Estudio preliminar de leptospirosis en roedores y canes en salitral, Piura-1999. *Rev. Perú. Med.exp. salud pública* (en línea). vol.20, n1. Perú. Consultado 12 mayo 2011. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v20n1/a08v20n1.pdf>
25. Sandow. K; Ramírez, W. 2005. Leptospirosis (en línea). Consultado 12 mayo 2011. Disponible en www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605/060501.pdf
26. Satz, M; Kornblihtt, A. 1993. La reacción en cadena de las polimerasas: El método y sus aplicaciones. (en línea). Consultado 07 jul. 2010. Disponible en <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion1.htm>

27. Sokal, R; Rohlf, J. Biometry. 3 ed. 1995. Editorial W. H. Freeman and Company. Estados Unidos. 869 p.
28. Stanchi, N; *et. al.* Microbiología Veterinaria: Leptospiras. 2007. Editorial Inter-Médica. Argentina. 572 p.
29. Trueba, G; *et. al.* 2002. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. *Rev Cubana Med Trop.* vol.54, n.1. pp. 11-14. (en línea). Cuba. Consultado 03 jun. 2011. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000100003&lng=es&nrm=iso. ISN1561-3054
30. Vanasco, N; *et. al.* 2007. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimo inmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. (en línea). Argentina. Consultado 26 abr. 2010. Disponible en http://www.bvd.org.ni/destacados/2007/LEPT_DX%20FASE%20SOLIDA_RPSP07.pdf
31. Zamora, J; Riedemann, S. 1999. Aislamiento y sobrevivencia de *Leptospiras* en tejido renal de roedores silvestres. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(1), 103-107. (en línea). Chile. Consultado 12 mayo 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1999000100011&lng=es&tlng=es.10.4067/S0301-732X1999000100011
32. Zamora, J; Riedemann, S. 1999. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile: Una revisión de los estudios efectuados en el país. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(2), 151-156. (en línea). Consultado 12 mayo 2011. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?Script=sci_arttext

<http://www.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.91.pdf>
&pid=S0301-732X1999000200001&lng=es&tlng=es.10.4067/S0301-732X1
999000200001

33. Zelaya, B. *et. al.* 2008. Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro, Masagua, Escuintla. (en línea). Consultado 10 jun. 2010. Disponible en <http://qifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.91.pdf>

XI. ANEXOS

**CUADRO 6: TOTAL DE ROEDORES PLAGA CAPTURADOS EN EL MERCADO
DE PANAJACHEL, SOLOLÁ**

ESPECIE	SEXO		TOTAL
	MACHO	HEMBRA	
<i>Rattus rattus</i>	21	11	32
<i>Mus musculus</i>	20	22	42
TOTAL	41	33	74

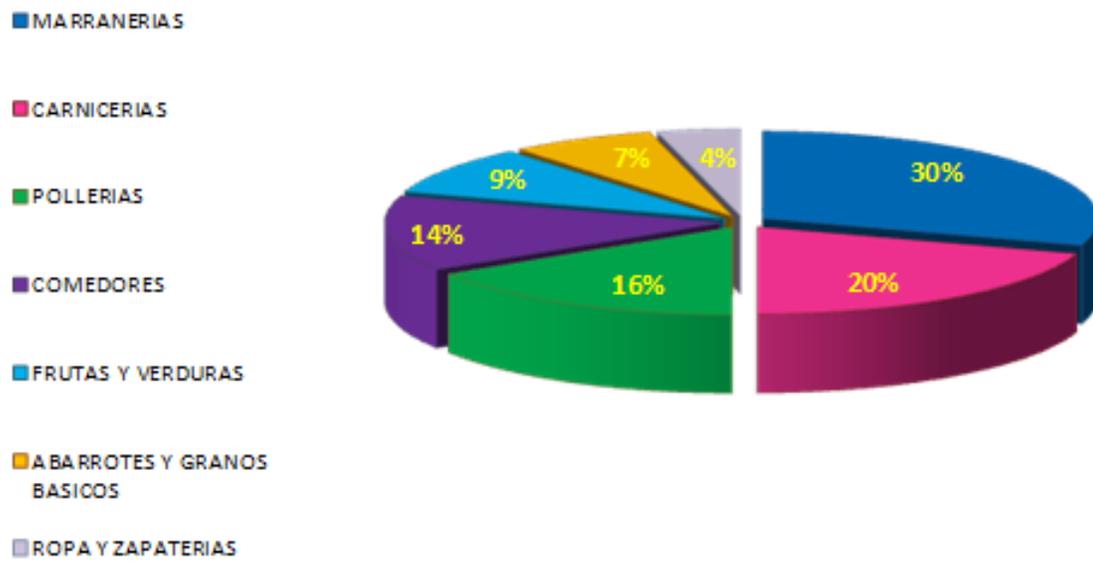
**CUADRO 7: RESULTADOS OBTENIDOS POR MEDIO DE PCR PARA
DIAGNÓSTICO DE *Leptospira interrogans* EN RIÑONES DE LOS ROEDORES
PLAGA CAPTURADOS EN EL MERCADO DE PANAJACHEL, SOLOLÁ**

ESPECIE	NÚMERO DE MUESTRAS	RESULTADO DE PCR
<i>Rattus rattus</i>	32	Negativo
<i>Mus musculus</i>	42	Negativo
TOTAL	74	Negativo

**CUADRO 8: ABUNDANCIA RELATIVA DE ROEDORES PLAGA EN LAS
DISTINTAS ÁREAS DEL MERCADO DE PANAJACHEL, SOLOLÁ**

AREA	ROEDORES CAPTURADOS	ABUNDANCIA RELATIVA
MARRANERIAS	22	30%
CARNICERIAS	15	20%
POLLERIAS	12	16%
COMEDORES	10	14%
FRUTAS Y VERDURAS	7	9%
ABARROTOS Y GRANOS BASICOS	5	7%
ROPA Y ZAPATERIAS	3	4%
TOTAL	74	100%

FIGURA 1: ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS ROEDORES PLAGA EN LAS DISTINTAS ÁREAS DEL MERCADO DE PANAJACHEL, SOLOLÁ



CUADRO 9: BOLETA DE RESULTADOS

BOLETA No.:					
FECHA:					
LUGAR:					
No. MUESTRA	AREA DE CAPTURA	ESPECIE	SEXO	NEGATIVO	POSITIVO

PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE PCR

Extracción de ADN

- Se extrajo 1 ml de cultivo a clasificar (sobrenadante) y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Para el control positivo, se colocó 1 ml de la cepa de *Leptospira interrogans* en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Se centrifugo a 12,000 rpm durante 15 minutos, se aseguró que los tubos estuvieran bien cerrados.
- Se descartó la fase líquida dejando el pellet (fase sólida).
- Se resuspendió el pellet en 100 µl de agua estéril para trabajos de ADN.
- Se colocaron los tubos en soportes de duroport® para que flotaran.
- Se introdujeron en el baño de calentamiento a 98 °C durante 15 minutos, utilizando agua destilada.
- Se llevaron rápidamente al congelador a -20 °C.
- Se conservaron los extractos de ADN a -20 °C, en un área libre de reactivos para ser utilizados posteriormente.

Preparación de la mezcla de reacción

- Se retiraron los reactivos de PCR del congelador de -20 °C. Se esperó que los mismos se descongelaran. La taq DNA polimerasa se mantuvo en el congelador hasta el momento que se utilizó e inmediatamente se llevó al congelador, para evitar que bajara su actividad.
- Se estableció el número de determinaciones, tomando en cuenta el control positivo y negativo.
- Se determinó el valor de cada reactivo de acuerdo al número de determinaciones, siguiendo los valores de la siguiente tabla:

Mezcla de reacción

No.	SUSTANCIA	Vol/tubo
1	Agua estéril para trabajo de ADN	13.8 μ l
2	Buffer NL 10 X	2.5 μ l
3	MgCl ₂ 2.5 mM	2.5 μ l
4	dNTP 25 mM	2
5	Primers 1 [10 pmol/ μ l] (LipL 32 (iniciador))	0.5 μ l
6	Primers 2[10 pmol/ μ L] (LipL 32 (reversa))	0.5 μ l
7	Taq DNA polimerasa 5 U/ μ L	0.2 μ l
	SUBTOTAL	22 μl
8	Muestra (ADN extraído)	4.5 μ l
	VOLUMEN FINAL	26.5 μl

- Se realizó el cálculo para determinar el volumen de cada reactivo en la mezcla:

El volumen de reactivo X el número de determinaciones.

- Se enumeraron los tubos de acuerdo al número de determinaciones.
- Se homogenizaron los reactivos antes de usarlos.
- Se preparó la mezcla en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron los reactivos según el orden de la tabla antes mencionada.
- Se preparó la mezcla en una campana de seguridad utilizando guantes de nitrilo sin polvo.
- Individualmente se resuspendieron 22 μ l de la mezcla con micropipeta en un tubo eppendorf de 200 μ l y se agregaron 4.5 μ l de muestra.
- Al control negativo, se le agregó 4.5 μ l de agua para trabajo de ADN.

- Se aseguró de cerrar bien los tubos y que no le quedaran burbujas, después se colocaron en el termociclador y se activó el programa de amplificación específico para *Leptospira interrogans*.

Programa del termociclador

Para un fragmento de 423 pb específico a *Leptospira interrogans*

Paso 1	94 °C	5 minutos.	
Paso 2	94 °C	55 segundos	} 35 ciclos
Paso 3	67 °C	40 segundos	
Paso 4	72 °C	45 segundos	
Paso 5	72 °C	7 minutos	
Paso 6	4 °C	Infinito	

- Se retiraron los tubos del termociclador y se llevaron al área de corrida de electroforesis y lectura.

Detección y visualización de los fragmentos amplificados

- Los productos de la PCR (amplicón) se analizaron mediante electroforesis submarina en geles de agarosa. Para ello se fundió agarosa en buffer Tris-acetate-EDTA (TBE) al 1 X.

Preparación del gel de agarosa al 2%

Agarosa-----1.0 gr.

Buffer TBE 1X----- 50 ml.

Para 50 ml de Buffer TBE 1X: 5 ml buffer TBE 10 X + 45 ml de agua para trabajo de ADN. (Para un gel)

- Se prepararon 300 ml de Buffer TBE 1X para su uso posterior.

Nota: La concentración del gel depende del tamaño del fragmento de ADN amplificado, y el volumen a preparar depende del tamaño del portagel a emplear.

- Se limpió previamente el portagel, se preparó y se colocaron los peines para formar los pocitos.
- Se fundió la agarosa preparada en el microondas por 40 segundos.
- Se colocó a temperatura ambiente hasta que dejó de emanar vapores (aprox. 56°C)
- Se agregaron 10 µl de Bromuro de Etidio y se agitó.
- Se adicionó en el portagel la agarosa preparada. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se retiraron cuidadosamente los peines del gel.
- Se introdujo el portagel con el gel en la cámara electroforética. La parte de los pocitos se colocó en el lado negativo (el ADN corre hacia el lado positivo).
- Se cubrió con el buffer TBE 1X sobrepasando la superficie del gel.
- Se prepararon las muestras de la siguiente forma:

- Se agregaron 2 μl de colorante azul de bromofenol por muestra sobre el papel parafilm (se utiliza si el buffer NL 10 X no trae adicionado el colorante).
- Se agregaron 10 μl de producto amplificado.
- Se mezclaron los 12 μl y serví en el pocito correspondiente del gel.
- También se utilizó en la mezcla de reacción buffer NL 10 X con el colorante adicionado, en este caso, se sirvió directamente en cada pocito correspondiente 12 μl del producto amplificado, sin agregar el colorante azul de bromofenol.
- En el primer pocito se colocó la escalera, en el segundo el control positivo, en los siguientes los productos amplificados y en el último pocito se colocó el control negativo.
- El funcionamiento de electroforesis se llevó a cabo a 125 voltios, 90 mA; con una duración de 45 minutos.

FIGURA 2: MAPA DE PANAJACHEL, SOLOLÁ

El mercado municipal está señalado.

