

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

Detección molecular de *Leptospira interrogans* en aguas ambientales superficiales y de abastecimiento como factor de riesgo de Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala

Trabajo de investigación presentado por
Nancy Rebeca Say Rodríguez
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2008

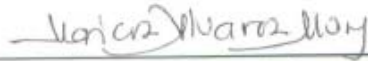
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Detección molecular de *Leptospira interrogans* en aguas
ambientales superficiales y de abastecimiento como factor de
riesgo de adquisición de Leptospirosis en la región de Escuintla,
Guatemala

Trabajo de investigación presentado por
Nancy Rebeca Say Rodríguez
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

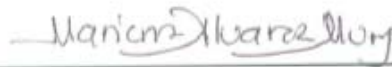
Guatemala
2008

Asesor (a):



Licda. Maricruz Alvarez

Terna evaluadora:



Licda. Maricruz Alvarez
Asesora de tesis



Licda. Shirley Sikahall
Evaluadora invitada



Pamela Pennington, Ph.D.

Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología

PREFACIO

La Leptospirosis es una enfermedad de distribución e importancia mundial. Sin embargo, en Guatemala no existe información sobre la enfermedad en el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) ni en otras instituciones de investigación. Debido a la falta de información sobre la Leptospirosis en nuestro país y la limitada información epidemiológica de la misma en el Área de Epidemiología del MSPAS, se desarrolló este estudio con el afán de poder colaborar con el desarrollo de un mejor sistema de información sobre la Leptospirosis en el país, específicamente del departamento de Escuintla.

Este proyecto fue ejecutado gracias a la ayuda del Área de Salud de Escuintla, con la importante participación de la Dra. Laura Figueroa y colaboradores. Otra participación significativa en este estudio fue la ayuda de la Lda. Shirley Sikahall y la Lda. María Luisa de López de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Deseo agradecer también a la ayuda incondicional de mi asesora, Lda. Maricruz Álvarez Mury, así como también al Dr. Wenceslao Arvelo; quienes me guiaron en la elaboración de este estudio. Agradezco también a mi Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología, Dra. Pamela Pennington por su ayuda y colaboración durante mi estudio.

Finalmente, deseo dedicar este estudio a Dios mi salvador, Él fue quien me dio la fuerza y la sabiduría para realizarlo y sin Él no soy nada. Quiero agradecer a mis padres, Manuel y Virginia, por todo el esfuerzo y sacrificio que realizaron, por su amor y ayuda incondicional. Además deseo agradecer a mis hermanos, por su ayuda y cariño. Deseo agradecer especialmente a Tono, por su amor, apoyo, paciencia y ayuda; a mis grandes amigas Luisa Duarte y Mabel Taracena, por acompañarme en esta gran experiencia, por su ayuda, paciencia y sincera amistad. Por último deseo agradecer a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida, pero que no menciono, muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO	v
LISTA DE CUADROS.....	ix-x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1-2
II. ANTECEDENTES	
A. Leptospirosis	3
1. Generalidades.....	3-4
2. Historia	4-5
3. Agente infeccioso: <i>Leptospira</i> spp	5
a. Clasificación y taxonomía	5-9
b. Etiología de <i>Leptospira</i> spp	10
4. Aspectos clínicos	10-12
a. Leptospirosis anictérica	12-13
b. Leptospirosis icterica	13-14
c. Invasión ocular	14
d. Otras complicaciones	14-15
e. Infección latente o crónica	15
5. Patología	15-16
6. Patogénesis	16
a. Producción de toxinas	17
b. Adhesión	17
c. Mecanismo inmune	18
d. Proteínas de superficie	18-19
e. Inmunidad	19
7. Epidemiología	19-28
B. Métodos de detección, cultivo e identificación	29-30
1. La reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	30-31
2. Diagnóstico molecular	32-35
3. Tipificación molecular	35-37

III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

A. Objetivo general.....	38
B. Objetivos específicos.....	38
C. Hipótesis.....	38
D. Variables	39
E. Diseño experimental.....	39
F. Justificación	39

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Descripción del sitio de estudio	40-42
B. Selección de la muestra	43
C. Obtención de la muestra	44
D. Comité de ética.....	44
E. Análisis de la muestra.....	45
1. Cuantificación de células de <i>Leptospira</i> y controles	45-47
2. Extracción de ADN.....	47
a. Soluciones	47
b. Extracción de ADN.....	47-48
3. Amplificación por PCR.....	48
a. Soluciones	49
b. Cebadores y tamaño del producto amplificado por PCR.....	49-50
c. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50-53
4. Visualización de producto amplificado por PCR en gel de agarosa.....	53
a. Soluciones	53
b. Electroforesis	53-55
5. Análisis estadístico.....	55
6. Mapeo	55
V. RESULTADOS.....	56-74
VI. DISCUSIÓN.....	75-77
VII. CONCLUSIONES.....	78
VIII. RECOMENDACIONES	79
IX. BIBLIOGRAFIA	80-83
X. APÉNDICES	

Anexo 1: autorización para la utilización de fichas de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en el Centro de Salud de Escuintla.	84
Anexo 2: ficha de consentimiento para análisis de <i>Leptospira</i> spp. en agua.....	85
Anexo 3: formulario para revisión expedita entregado al comité de ética.....	86-88

Anexo 4: procedimiento normado de operación de Nivel de Bioseguridad Tipo II.....	89-91
Anexo 5: tamaño de muestra calculado para distintos niveles de confianza.....	92
Anexo 6: mapas de información geográfica de los sitios muestreados en el departamento de Escuintla.	93-94
Anexo 5: encuesta realizada a las personas en los diversos municipios muestreados de Escuintla al momento del muestreo.	95-96

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Serogrupos y algunos serovares de <i>L. interrogans</i> sensu lato	6-7
2. Genomoespecies de <i>Leptospira</i> y la distribución de serogrupos	8
3. Genomoespecies asociadas con serogrupos	9
4. Brotes de Leptospirosis asociados con agua	25-26
5. Factores de riesgo asociados en el brote de febril hemorrágicos, personal de la DAS de Escuintla, 2003	27
6. Pruebas serológicas específicas de género para el diagnóstico de Leptospirosis ..	30
7. Municipios de Escuintla, Guatemala	40
8. Mezcla de reacción para PCR	51
9. Casos sospechosos de Leptospirosis en todo el departamento de Escuintla para los años 2005 al 2007	57
10. Distribución de casos sospechosos por genero para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en los municipios de Escuintla, Guatemala	57
11. Distribución de casos sospechosos por edad para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en los municipios de Escuintla, Guatemala	58
12. Concentración total de células de <i>L. interrogans</i> serovar icterohaemorrhagiae en diversas diluciones seriadas realizadas	60
13. Porcentaje y total de muestras amplificadas por los cebadores utilizados para control interno y para la detección de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp. en muestras de agua provenientes de fuentes de agua de casas de casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005-2007 en varios municipios de Escuintla, Guatemala	63
14. Positividad de muestras para especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp. en muestras de agua provenientes de fuentes de agua en casas de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005-2007 en varios municipios de Escuintla, Guatemala	68
15. Distribución por genero y edad de las muestras positivas obtenidas en distintas fuentes de agua de las casas de casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005-2007 para varios municipios muestreados del departamento de Escuintla, Guatemala	69
16. Coeficiente de correlación de Spearman entre la positividad de muestras de agua para la presencia de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp. y el numero de casos sospechosos para Leptospirosis por municipio en el departamento de Escuintla, Guatemala; con un nivel de confianza del 95%	72
17. Prueba para correlación de rango significativa con un nivel de confianza del 95% para el coeficiente de correlación de Spearman entre la positividad de muestras de	

agua para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. y el número de casos sospechosos para Leptospirosis por municipio en el departamento de Escuintla, Guatemala; con un nivel de confianza del 95%.....74

18. Nivel de confianza con respecto al tamaño de la muestra disponible para el análisis de positividad de muestras de agua para especies patogénicas de *Leptospira* spp., para la población de casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005-2007 en distintos municipios del departamento de Escuintla, Guatemala.....92

19. Encuesta sobre uso y contacto cotidiano de distintos tipos de fuentes de agua en los sitios muestreados 95

LISTAS DE FIGURAS

Figura	Página
1. Naturaleza bifásica de la Leptospirosis y relevantes investigaciones de las diferentes etapas de la enfermedad	12
2. Hibridación de los cebadores oligonucleótidos en el ADN molde al inicio de un PCR	31
3. Necesidades básicas insatisfechas en el departamento de Escuintla hasta 1994	42
4. Límite de detección para la curva estándar realizada con la cepa de <i>L. interrogans</i> serovar <i>icterohaemorrhagiae</i>	61
5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN para la detección de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp	64-65
6. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN para la detección de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp	65-66
7. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN para la detección de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp	67
8. Distribución geográfica de muestras positivas para la presencia de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp. en el departamento de Escuintla.....	71
9. Distribución del coeficiente de correlación de Spearman para la positividad de muestras de agua para la presencia de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp. en los municipios del departamento de Escuintla, Guatemala.....	73
10. Carta de autorización del Área de Salud de Escuintla, Guatemala	84
11. Localización y datos fisicoquímicos del agua de los sitios muestreados en el departamento de Escuintla	93
12. Localización y datos fisicoquímicos del agua de los sitios muestreados en el departamento de Escuintla	94
13. Frecuencias de respuestas obtenidas para la encuesta realizada sobre uso y contacto cotidiano de distintos de fuentes de agua en los sitios muestreados	96

RESUMEN

En este estudio se realizó una detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en muestras de aguas superficiales ambientales y de abastecimiento en casas de pacientes sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en el departamento de Escuintla, Guatemala.

Se realizó un muestreo de agua en los municipios del San Jose, Masagua, Escuintla, Tiquisate, Santa Lucía Cotzumalguapa, San Vicente Pacaya, La Democracia, Sinquinalá y Palín; del departamento de Escuintla. La detección de la bacteria en el agua se hizo utilizando métodos moleculares por medio de la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Para la estandarización del protocolo de detección se utilizó una cepa de *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae como control positivo, para la cual se usó una curva estándar y así lograr determinar la sensibilidad del método de detección. También se utilizó una cepa de *Leptospira samaranga* Patoc I como control negativo.

Se logró una detección de tres especies patogénicas y una especie patogénica intermedia de *Leptospira* spp., en agua proveniente de pozo, un río y un arroyo en los municipios del San Jose, Tiquisate y La Democracia. Los resultados fueron estadísticamente significativos obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.85 ($p < 0.05$).

Finalmente, se logró cumplir con los objetivos de este estudio y demostrar que al menos para el día muestreado, el agua si constituye un factor importante de riesgo de infección para Leptospirosis en el departamento de Escuintla.

I. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una de las enfermedades zoonóticas más ampliamente distribuida alrededor del mundo. Esta enfermedad es causada por algunas bacterias espiroquetas del género *Leptospira*. Las fuentes de infección para esta enfermedad son por contacto directo o indirecto con orina de animales infectados. Los hospederos más comunes de la bacteria son mamíferos pequeños silvestres, ratas y animales domésticos. Se ha reportado que una de las fuentes de riesgo de infección más significativa es cualquier tipo de contacto con agua contaminada, ya que las leptospiras pueden sobrevivir en suelo y agua por días o hasta semanas. Se han reportado diversos casos de brotes en todo el mundo, pero es más común en países con climas tropicales y templados. El ambiente óptimo de la bacteria es un clima templado y cálido, y se ha reportado que en condiciones de lluvia, inundaciones, huracanes y terremotos, los casos clínicos de Leptospirosis aumentan en la región donde se den cualquiera de los fenómenos climáticos mencionados.

La enfermedad comprende un amplio rango de síntomas, desde signos asintomáticos hasta presentar cuadros graves como el síndrome de Weil, que se encuentra caracterizado por la aparición de ictericia y fallo renal. Para el diagnóstico de esta enfermedad existen un rango amplio de pruebas, pero ninguna de ellas ha probado ser la ideal. Las leptospiras pueden ser detectadas por medios de cultivo y otras pruebas microbiológicas, por distintas pruebas basadas en serología, microscopía y métodos moleculares. De todas estas técnicas, las de mejor sensibilidad y especificidad son los métodos moleculares, la serología y las pruebas de inmunofluorescencia. Estas pruebas no solamente se aplican al diagnóstico clínico, sino que muchas de ellas han sido utilizadas para la detección de leptospiras en agua, suelo y animales infectados. Debido a las características epidemiológicas de esta enfermedad, Guatemala no es un país exento de la enfermedad y se han descrito casos en toda la región. Las condiciones ambientales y socioeconómicas del departamento de Escuintla, lo hacen ser una región muy susceptible a la Leptospirosis, por lo que es de importancia epidemiológica la detección de leptospiras patogénicas en aguas superficiales y de abastecimiento en esta región.

Para este estudio se realizó una detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. por medio de extracción de ADN de muestras de agua obtenidas de las casas de pacientes sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en el departamento de Escuintla. Para la detección específica de la bacteria se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, para finalmente visualizar el ADN amplificado por medio de electroforesis en geles de agarosa. Para el estudio se usó una cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae como control positivo para el método de detección. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de bioseguridad de nivel tipo II.

Se comprobó la presencia de tres especies patogénicas verdaderas y una especie patogénica intermedia de *Leptospira* spp. en muestras de aguas de abastecimiento y ambientales superficiales en casas de pacientes de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 del departamento de Escuintla, Guatemala. Se determinó la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en los municipios del San Jose, Tiquisate y La Democracia. Con esta detección se determinó una relación significativa entre el número de casos sospechosos para Leptospirosis por municipio de Escuintla y la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. detectadas en las muestras de agua tomadas por municipio.

II. ANTECEDENTES

A. Leptospirosis

1. Generalidades. La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia mundial que afecta a los humanos en todos los continentes, tanto en contextos urbanos como rurales y en climas templados y tropicales. Tradicionalmente la Leptospirosis se ha considerado una enfermedad ocupacional o que esporádicamente ocurre en zonas rurales (Ferro *et al*, 2006). La Leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas llamadas leptospiras que son transmitidas directa o indirectamente de animales a humanos, por lo tanto es una zoonosis. La transmisión de humano a humano ocurre raramente (OMS 2003).

La Leptospirosis ocurre en todo el mundo, pero es más común en áreas tropicales y subtropicales con altas tasas de lluvia (*idem*). Se han reportado brotes recientes en Nicaragua, Brazil, India, el Sudeste de Asia y los Estados Unidos, y más recientemente en muchos países como resultado de la competición EcoChallenge Sabah 2000 en Malaysia. El Landmark Institute of Medicine reportó en *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States* que la Leptospirosis fue utilizada como ejemplo de una infección que ha causado una morbilidad significativa en el pasado en personal militar instalado en áreas tropicales (Levett 2001).

Muchos de los intereses internacionales están resurgiendo por la Leptospirosis desde que grandes cantidades de casos se han reportado principalmente en Centro y Sur América como resultado de las inundaciones por excesivas lluvias relacionadas al fenómeno de El niño. Sin embargo, la ocurrencia de grandes brotes de Leptospirosis seguidas por inundaciones severas no es un fenómeno nuevo y no se encuentra restringido a regiones tropicales (*idem*).

La enfermedad se encuentra principalmente en lugares donde exista contacto entre humanos y orina de animales infectados que se encuentra contaminando el ambiente. La incidencia de la enfermedad alrededor del mundo se encuentra entre aproximadamente

0.1-1 por 100,000 personas por año en climas templados, y es de 10-100 por 100,000 personas en trópicos húmedos. Durante los brotes y en presencia de grupos de alto riesgo a exposición, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar las 100 por 1000,000 personas al año (OMS 2003).

2. Historia. El espectro de la enfermedad humana causada por leptospiras es extremadamente amplio, desde una infección subclínica hasta presentar un síndrome severo de infección a múltiples órganos con alta mortalidad. Este síndrome, la Leptospirosis icterica con fallo renal, fue reportada primero hace 100 años por Adolf Weil en Heidelberg (Levett 2001). Weil describió la Leptospirosis como una enfermedad en 1886, y por ello el síndrome icterico se conoce como enfermedad de Weil, tradicionalmente atribuida a la infección transmitida por ratas causada por los serovares icterohaemorrhagiae y copenhageni (OMS 2003).

La Leptospirosis fue reconocida como un peligro ocupacional en la cosecha de trigo en la China ancestral, y se le conoció con el nombre japonés de akiyami o fiebre otoñal que persiste actualmente. En retrospectión, claras descripciones de la ictericia por leptospiras es reconocida aparentemente en los inicios del siglo XIX, algunos años antes de la descripción de Weil. Se ha sugerido que *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae fue introducida en el occidente de Europa en el siglo XVIII por la extensión hacia el oeste de un rango de *Rattus norvegicus* desde Eurasia (Levett 2001).

La etiología de la Leptospirosis fue demostrada independientemente en 1915 en Japón y Alemania. En Japón, Inada e Ido detectaron las espiroquetas y específicamente encontraron anticuerpos en la sangre de los mineros japoneses con ictericia infecciosa, y dos grupos de médico alemanes estudiaron a soldados alemanes afectados por la “enfermedad francesa” en las trincheras del nordeste de Francia. Uhlenhuth y Fromme, y Hubener y Reiter detectaron espiroquetas en la sangre de cerdos de guinea inoculados con la sangre de soldados infectados. Desafortunadamente, estos grupos se involucraron tanto en argumentos que pasaron por alto las primeras publicaciones en inglés y alemán de artículos por el grupo de Inada, que esencialmente publicaron sus resultados iniciales por

8 meses. La confirmación de la ocurrencia de Leptospirosis en la frontera francesa fue obtenida rápidamente en la publicación del trabajo de Inada en Europa. Dada la inicial controversia sobre la nomenclatura, es irónico que el organismo fue descrito cerca de 10 años antes. Stimson demostró por tinciones con plata la presencia de cúmulos de espiroquetas en los túbulos renales de un paciente que fue reportado fallecido por fiebre amarilla. Las espiroquetas tenían extremos en forma de gancho y Stimson las llamó *Spirochaeta interrogans* porque recordaban signos de interrogación. Desafortunadamente, estas observaciones fueron pasadas por alto por muchos años (*idem*).

La importancia de la ocupación como un factor de riesgo fue reconocido recientemente. El rol de la rata como una fuente de infección humana fue descubierto en 1917, mientras que el potencial de enfermedad por leptospiras en perros fue reconocida, pero claras distinciones entre la infección canina con *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae y canicola tomó varios años. La Leptospirosis en la ganadería fue reconocida algunos años después. Muchas monografías proveyeron información extensiva en el temprano desarrollo del conocimiento de la Leptospirosis (*idem*).

3. Agente infeccioso: *Leptospira* spp

a. Clasificación y taxonomía. Según el Centro Nacional para Información de Biotecnología o NCBI por sus siglas en inglés (National Center for Biotechnology Information), la taxonomía de *Leptospira* se encuentra de la siguiente manera:

Identificación de taxonomía: 171

Dominio: Bacteria

Reino: Procariota

Clase: *Spirochaetes*

Orden: *Spirochaetales*

Familia: *Leptospiraceae*

Género: *Leptospira* (NCBI 2007).

Para 1989, el género *Leptospira* fue dividido en dos especies, *L. interrogans* que comprende todas las cepas patógenas, y *L. biflexa* que incluye todas las cepas saprofitas aisladas del ambiente. *L. biflexa* fue diferenciada de *L. interrogans* por su crecimiento a 13 °C y crecimiento en presencia de 8-azaguanina (225 mg/mL) y por el defecto de *L. biflexa* a formar células esféricas en cloruro de sodio 1 M (Levett 2001).

Ambas espiroquetas tanto *L. interrogans* y *L. biflexa* se encuentran divididas en numerosos serovares definidos por la aglutinación de absorción cruzada con un antígeno homólogo (Woo *et al.* 1997). Más de 60 serovares de *L. biflexa* han sido identificados. Para la especie de *L. interrogans* más de 200 serovares han sido identificados; y serovares adicionales han sido aislados pero aún no han sido publicados válidamente. Los serovares que son antigénicamente relacionados han sido agrupados tradicionalmente en serogrupos. Mientras que los serogrupos no tienen una base taxonómica, han proporcionado información útil para el entendimiento epidemiológico. Los serogrupos de *L. interrogans* y algunos serovares comunes se muestran en el cuadro 1 (Levett 2001).

Cuadro 1: Serogrupos y algunos serovares de *L. interrogans* sensu lato.

Serogrupo	Serovar (es)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe.
Hebdomadis	Hebdomadis, jules, kremastos.
Autumnalis	Autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes.
Grippotyphosa	Grippotyphosa, canalzonae, ratnapura.
Canicola	Canicola
Australis	Australis, bratislava, lora
Pomona	Pomona.
Javanica	Javanica.
Sejroe	Sejroe, saxkoebing, hardjo.
Panama	Panama, mangus.
Cynopteri	Cynopteri.
Sjasiman	Djasiman.
Sarmin	Sarmin.
Mini	Mini, georgia.
Tarassovi	Tarassovi.
Ballum	Ballum, aroborea.
Celledoni	Celledoni.
Louisiana	Louisiana, lanka.
Ranarum	Ranarum.

Continuación de cuadro 1: Serogrupos y algunos serovares de *L. interrogans* sensu lato.

Serogrupo	Serovar (es)
Manhao	Manhao.
Shermani	Shermani.
Hurstbridge	Hurstbridge.

(Levett 2001).

La familia *Lestospiraceae* pertenece al orden *Spirochaetales*, y se divide en tres géneros *Leptospira*, *Leptonema* y *Turneria*. *Leptospira* se ha subdividido en 250 serovares por medio de la prueba de microaglutinación. Los serovares se clasifican en grupos serológicos por la presencia de antígenos comunes. Taxonómicamente *Leptospira* se clasifica en 12 especies, que se ordenan en tres grupos: patógenas, intermedios y saprófitos. La taxonomía molecular está en progreso y va a sustituir eventualmente al sistema de serovares (Sáenz y Rodríguez 2004).

La taxonomía de leptospiras patogénicas ha sido recientemente reorganizada debido a los estudios realizados en homología de ADN, patrones polimórficos y tipificación por ARNr. Las siete especies en que se reorganizó el género *Leptospira* son: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. inadai* and *L. kirschneri* (Parma *et al.* 1997).

La clasificación fenotípica de las leptospiras ha sido reemplazada por la clasificación genotípica, en la cual un número de genomoespecies incluyendo todas las especies de serovares para *L. interrogans* y *L. biflexa*. La heterogeneidad genética fue demostrada hace algún tiempo y los estudios de hibridación de ADN permitieron la definición de 10 genomoespecies de *Leptospira*. Una genomoespecie adicional, *L. kirschneri* fue agregada después. Luego de un estudio extensivo de cientos de cepas, investigadores del Centro de Control de Enfermedades, CDC por sus siglas en inglés (Center for Disease and Control), recientemente definieron 16 genomoespecies de *Leptospira* que incluían las descritas anteriormente y adicionaron cinco nuevas genomoespecies, una de las cuales fue llamada *L. alexanderi* Una especie adicional *L. fainei*, ha sido descrita y contiene un nuevo serovar denominado hurstbridge. Los estudios de hibridación de ADN también han

confirmado el estatus taxonómico del género monoespecífico *Leptonema*. Las genomoespecies de *Leptospira* no corresponden a las dos especies más conocidas *L. interrogans* y *L. biflexa*, y sus respectivos serovares patogénicos y no patogénicos (cuadro 2) (Levett 2001).

Cuadro 2: Genomoespecies de *Leptospira* y distribución de serogrupos.

Especies	Serogrupos
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin.
<i>L. noguchi</i>	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona.
<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis, Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Tarassovi, Sarmin, Shermani, Cynopteri, Pomona, Grippotyphosa, Sejroe, Javanica.
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica.
<i>L. wolbachii</i>	Codice.
<i>L. biflexa</i>	Semarang, Andamana.
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge.
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Trassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis.
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae.
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe.
<i>L. inadai</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, tarassovi, Manhao, canicola, Panama, javanica.
<i>L. parva</i>	Turneria.
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini.

(Levett 2001).

Así, ningún serogrupo o serovar puede predecir la especie de *Leptospira* (cuadro 3). Además, estudios recientes han incluido múltiples cepas de algunos serovares y han

demostrado la heterogeneidad genética entre serovares. Adicionalmente, las características fenotípicas utilizadas formalmente para diferenciar *L. interrogans* de *L. biflexa*, no diferencian genomoespecies (*idem*).

Cuadro 3: Genomoespecies asociadas con serogrupos.

Serogrupo	Genomoespecies
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgepetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgepetersenii</i>
Codice	<i>L. wobachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Gripotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Semaranga	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgepetersenii</i> , <i>L. inadai</i>

(Levett 2001).

b. Etiología de *Leptospira* spp. Las leptospiras son espiroquetas aerobias espirales ajustadas usualmente de 0.1 x 6 μm a 0.1 x 20 μm , pero ocasionalmente los cultivos contienen células mucho mayores. La amplitud helicoidal es aproximadamente de 0.1 a 0.15 μm y el ancho es de aproximadamente 0.5 μm . Las células tienen un extremo puntiagudo o pueden ser ambos extremos, esto les da un gancho característico. Dos filamentos axiales (falgo periplásmico) con inserciones polares están localizados en el espacio periplásmico. La estructura de las proteínas flagelares es compleja. Las leptospiras exhiben dos formas distintas de movimiento, el movimiento translacional y no translacional (Levett 2001). Las leptospiras tienen una doble membrana en común con otras espiroquetas, en las cuales la membrana citoplásmica y la pared de peptidoglicanos están estrechamente asociadas y solo son delineadas por una membrana exterior. Los polisacáridos de las leptospiras tienen una composición similar a la de las bacterias gram negativas, pero tienen una actividad endotóxica menor (Sáenz y Rodríguez 2004).

Las leptospiras son aerobios obligados con una temperatura óptima de crecimiento de 28 a 30 °C. Producen catalasa y oxidasa y crecen en medios simples enriquecidos con vitaminas (vitamina B₂ y B₁₂ que son factores de crecimiento), ácidos grasos de cadenas largas y sales de amoníaco. Los ácidos grasos de cadenas largas son utilizados solamente como una fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación de ácidos grasos (Levett 2001).

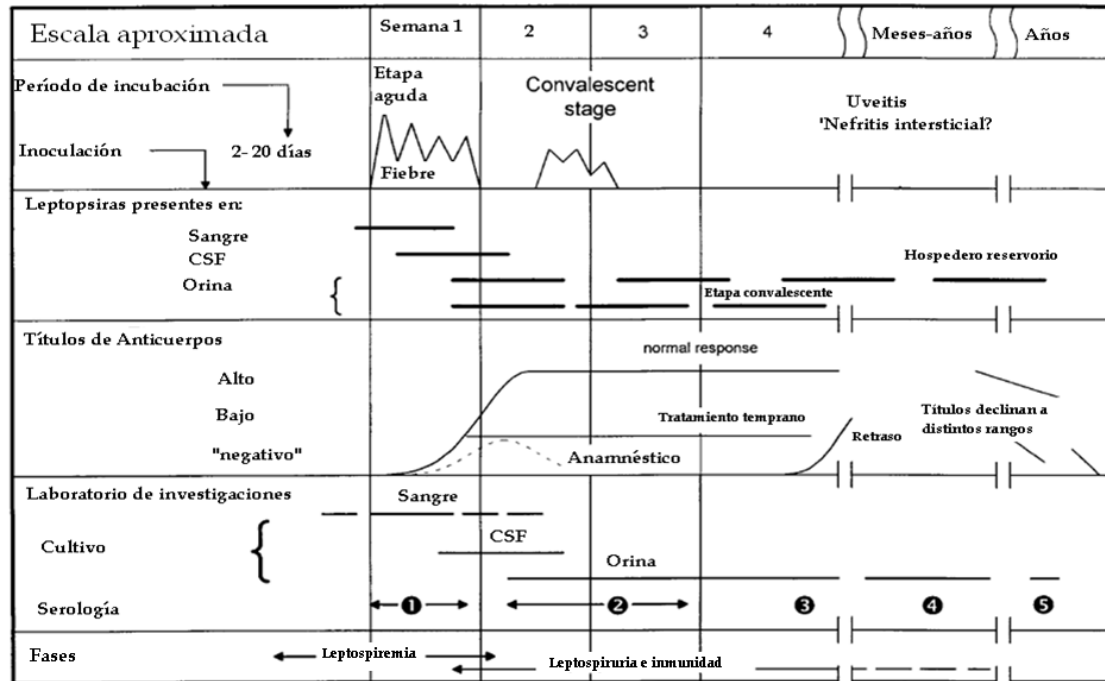
4. Aspectos clínicos. La Leptospirosis ha sido descrita como una zoonosis. El espectro de síntomas es extremadamente amplio; el clásico síndrome de la enfermedad de Weil representa fácilmente esta amplitud y constituye un ejemplo de los casos más severos de la Leptospirosis (Levett 2001). Algunos de los síntomas extremos que puede mostrar la Leptospirosis son hemorragias pulmonares, fallo renal e ictericia; pero usualmente la enfermedad permanece asintomática o con síntomas moderados (Johnson *et al.* 2004). Formalmente se consideró que síndromes clínicos distintos estaban asociados con algunos serogrupos específicos. Sin embargo, esta visión fue cuestionada por algunas

autoridades, y estudios más intensos en los pasados 30 años han refutado esta hipótesis. Una explicación de muchas de las asociaciones observadas puede ser encontrada en la ecología de la manutención de animales hospederos en una región geográfica. Una región con una rica variedad de fauna puede albergar una gran cantidad de serogrupos, en comparación a una región con pocos animales hospederos. En humanos, la Leptospirosis severa es frecuentemente pero no invariablemente causada por los serovares del serogrupo icterohaemorrhagiae. Los serovares específicos involucrados dependen mucho de la locación geográfica y la ecología de los hospederos locales (Levett 2001).

La Leptospirosis tiene dos formas de presentación clínica: anictérica (90%) y la forma icterohemorrágica o enfermedad de Weil (10%), pudiendo haber estados intermedios de la enfermedad (Abuauada *et al.* 2005). El periodo de incubación de la Leptospirosis oscila entre 2 y 30 días, siendo en promedio 5-12 días. Todas las presentaciones clínicas de esta enfermedad empiezan de igual manera e inicialmente es imposible saber si se trata de una forma leve o grave de Leptospirosis, porque la lesión inicial puede estar influenciada, entre otros factores, por la virulencia del serovar infectante, la magnitud del inoculo, el estado nutricional del paciente y el tiempo que se tarde en iniciar el tratamiento adecuado. Alrededor del 15% de las infecciones cursan de forma subclínica, solo evidenciadas por una seroconversión. Entre las personas que desarrollan manifestaciones clínicas, el 90% tiene una forma leve anictérica y el 5-10% poseen el síndrome de Weil. En la forma icterica, los síntomas descritos para los pacientes anictéricos son más intensos y prolongados (Sáenz y Rodríguez 2004).

Los signos clínicos pueden incluir alta fiebre, depresión aguda, ictericia, y en algunos casos puede causar la muerte, con lesiones en el hígado y riñones (Scarcelli *et al.* 2003). La presentación clínica de la Leptospirosis es bifásica (figura 1), con la fase aguda o septicémica que dura alrededor de una semana, y la fase inmune caracterizada por una producción de anticuerpos y excreción de las leptospiras en la orina. Muchas de las complicaciones de la Leptospirosis están asociadas con la localización de las leptospiras en el tejido durante la fase inmune y así ocurre durante la segunda semana de la enfermedad (Levett 2001).

Figura 1: naturaleza bifásica de la Leptospirosis y relevantes investigaciones de las diferentes etapas de la enfermedad. Los especímenes 1 y 2 sirven para diagnóstico por serología en la fase aguda, 3 es una muestra en fase convalescente que puede facilitar la detección de respuesta inmune retrasada, y 4 y 5 son muestras que pueden proveer información epidemiológica como los serogrupos infecciosos presuntivos.



(Levett 2001).

a. Leptospirosis anictérica. La gran mayoría de infecciones causadas por leptospiras son subclínicas o de severidad moderada y los pacientes probablemente no busquen atención médica. Una pequeña porción de las infecciones, presentan síntomas de una enfermedad febril. Otros síntomas incluyen escalofríos, dolores de cabeza, mialgia, dolor abdominal, sufusión conjuntival y menos común el salpullido. Este síndrome anictérico usualmente dura por una semana y su resolución coincide con la aparición de anticuerpos. La fiebre puede ser bifásica y puede haber una recurrencia cada tres ó cuatro días. El dolor de cabeza usualmente es severo parecido al producido por el dengue, con dolor retro-orbital y fotofobia. La mialgia afecta la cintura y muslos (Levett 2001).

El diagnóstico diferencial debe incluir infecciones virales comunes como influenza, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), y en los trópicos, el dengue; y además se deben de tomar en cuenta las causas bacteriana en una fiebre sin origen. Otras condiciones que se pueden confundir con la Leptospirosis anictérica incluyen la encefalitis, poliomyelitis, rickettsiosis, fiebre glandular (mononucleosis infecciosa), brucelosis, malaria, hepatitis viral y neumonitis. Las infecciones por hantavirus pueden ser consideradas también para el diagnóstico diferencial para pacientes con invasión pulmonar (Luchessi *et al.* 2004).

b. Leptospirosis icterica. Entre el 5 y 10 % de todos los pacientes con Leptospirosis tienen una forma icterica de la enfermedad, que es mucho más severa en la cual la evolución clínica es progresiva rápidamente. Los casos severos a menudo se presentan tarde en el curso de la enfermedad, y esto contribuye al alto rango de mortalidad, que varía entre 5 y 15 %. La ictericia que ocurre en la Leptospirosis no está asociada con la necrosis hepatocelular, y las funciones del hígado vuelven a la normalidad luego de la recuperación. Los niveles de bilirrubina en suero pueden ser altos y puede tomar semanas para que se normalicen. Usualmente ocurren disrupciones moderadas en los niveles de transaminasas y una elevación menor del nivel de fosfatasas alcalinas (Levett 2001).

Las complicaciones de la Leptospirosis severa enfatizan la naturaleza multisistémica de la enfermedad. La Leptospirosis es una causa común de fallo renal agudo (FRA), que ocurre en un 16 a 40 % de los casos. El nivel de amilasa en el suero es significativamente elevado si se presenta FRA, esto puede confundirse con pancreatitis, pero los síntomas clínicos de pancreatitis no son encontrados. La trombocitopenia (conteo de plaquetas de $<100 \times 10^9/L$) ocurre en $\geq 50\%$ de los casos y es una característica predictora significativa del desarrollo de un FRA. Sin embargo, la trombocitopenia en la Leptospirosis es temporal y no es resultado de una coagulación intravascular diseminada (*idem*).

La ocurrencia de los síntomas pulmonares en los casos de Leptospirosis fue notado por primera vez por Silverstein. Reportes subsecuentes han mostrado que la invasión

pulmonar puede ser una de las mayores manifestaciones de Leptospirosis es algunas agrupaciones de casos. La severidad respiratoria no está relacionada con la presencia de ictericia. Los pacientes pueden presentar estos síntomas pulmonares e ictericia con otro espectro de síntomas que van desde tos, disnea y hemoptisis (que puede ser moderada o severa), hasta un síndrome respiratorio en adultos. La hemorragia intra-alveolar fue detectada en la mayoría de los pacientes, incluso en la ausencia de síntomas pulmonares. La hemorragia pulmonar puede ser suficientemente severa para causar la muerte (*idem*).

c. Invasión ocular. Las manifestaciones oculares de la Leptospirosis severa fueron notadas en reportes recientes. La sufusión conjuntival se observa en la mayoría de pacientes, este síntoma en presencia de ictericia de la esclerótica se dice que es indicio de la enfermedad de Weil. La uveítis anterior, ya sea lateral o bilateral, ocurre luego de la recuperación de la enfermedad aguda en la mayoría de los casos. La uveítis puede estar presente por semanas, meses u ocasionalmente años luego de la etapa aguda. Se han reportado casos de perturbaciones visuales crónicas que persisten por 20 años o más luego de la etapa aguda (*idem*).

La incidencia de complicaciones oculares es variable, pero esto probablemente refleja la escala de gran tiempo en las que ocurren. En la mayoría de los casos la uveítis se presume que es un fenómeno inmune, pero leptospiras han sido aisladas de ojos de humanos y equinos, y más recientemente se ha encontrado ADN de leptospiras en humor acuoso por Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction). Uveítis posteriores a la enfermedad puede ocurrir como resultado de reacciones autoinmunes a una subsecuente exposición a las espiroquetas (*idem*).

d. Otras complicaciones. Se ha reportado que la infección aguda durante el embarazo ha causado aborto y muerte fetal. En casos reportados por Chung et al., las leptospiras fueron aisladas de fluido amniótico, la placenta y el cordón umbilical; los infantes estaban moderadamente enfermos y fueron descargados a las dos semanas de edad. En otro caso, un neonato desarrolló ictericia y murió dos días luego de su

nacimiento. Se han demostrado leptospiras en el hígado y riñones por tinción con plata, pero la evidencia serológica de las infecciones por leptospiras en la madre fue obtenida luego de dos semanas del parto. Las leptospiras han sido aisladas de leche humana, y en un caso es serovar hardjo fue probablemente transmitido de una madre infectada a su infante por medio de la leche materna (*idem*).

Complicaciones raras incluyen accidentes cerebrovasculares, rhabdomiolisis, trombocitopenia púrpura trombótica, colecistitis aguda, eritema nodoso, estenosis aórtica, síndrome de Kawasaki, artritis reactiva, epididimitis, aplasia de nervios, hipogonadismo masculino y síndrome de Guillain-Barré (*idem*).

e. Infección latente o crónica. Algunos reportes sugieren que la Leptospirosis puede inducir síntomas crónicos análogos a los que son producidos por otras infecciones por espiroquetas, como la enfermedad de Lyme. Sin embargo, existe poca evidencia que soporte esta hipótesis. La posibilidad de una infección crónica humana ha sido sugerida sin evidencia de infección por diagnóstico serológico. Un solo caso de meningitis retardada seguida de Leptospirosis icterica ha sido descrita, en este caso las leptospiras fueron aisladas del líquido cerebroespinal o cefalorraquídeo (LCR) y orina. Este paciente exhibía una respuesta de anticuerpos insignificante a la cepa de infección, sugiriendo la presencia de un defecto inmune (*idem*).

De las secuelas de la Leptospirosis aguda descrita anteriormente, la uveítis es una condición potencialmente crónica y es una reconocida secuela crónica de Leptospirosis en humanos y caballos (*idem*).

5. Patología. La Leptospirosis está caracterizada por el desarrollo de vasculitis, daño endotelial e infiltrados inflamatorios compuestos de células monocíticas, plasmáticas, histiocitos y neutrófilos (WHO, 2003). En una exanimación superficial, las hemorragias petequiales son comunes y pueden ser extensas, y los órganos se encuentran decolorados debido al nivel de ictericia. La histopatología es más marcada en el hígado, riñones, corazón y pulmones; pero otros órganos también pueden ser afectados de acuerdo a la

severidad de la infección individual. La estructura del hígado no se encuentra significativamente alterada, pero existe colestasis intrahepática. La hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer es evidente, y la eritrofagocitosis ha sido reportada. En los riñones, la nefritis intersticial es el mayor hallazgo, acompañado por una intensa infiltración celular compuesta de neutrófilos y monocitos (Levett, 2001). Las leptospiras son capaces de habitar en los riñones aún con concentraciones de NaCl de 0.85%, estas pueden ser vistas en los túbulos renales (Trueba *et al*, 2002). Por microscopia electrónica, los bordes de cepillo de las células tubulares son lisos y la membrana tubular base está engrosada, las células tubulares exhiben una depleción mitocondrial. Adicionalmente, cambios menores son vistos en los glomérulos, sugiriendo una base anatómica para proteinuria en Leptospirosis (Levett 2001).

Hallazgos patológicos en el corazón incluyen la miocarditis intersticial con infiltración de linfocitos y células plasmáticas, hemorragias petequiales (particularmente en el epicardio), infiltración mononuclear en el epicardio, efusiones pericardiales y arteritis coronaria. En los pulmones, la congestión pulmonar y la hemorragia son comunes, y la infiltración de espacios alveolares por monocitos y neutrófilos ocurre. Puede ocurrir también la membrana hialina, las leptospiras pueden ser vistas con células endoteliales en el septum interalveolar, y se adhieren a las células del endotelio capilar (*idem*).

En el músculo esquelético, particularmente de la pierna, la necrosis focal de las fibras del músculo aislado ocurre con infiltración de histiocitos, neutrófilos y células plasmáticas. Esta evidencia de miocitis está correlacionada con la intensa mialgia reportada por algunos pacientes (*idem*).

6. Patogénesis. El mecanismo por el cual las leptospiras causan enfermedad no son bien conocidos. Un sinnúmero de factores de virulencia han sido sugeridos, pero con pocas excepciones su rol en la patogénesis permanece sin esclarecer. Algunos de estos factores se describen a continuación (*idem*).

a. Producción de toxinas. La producción de toxinas por cepas patogénicas de leptospiras *in vivo* fue inferida por Arma y la actividad de la endotoxina fue estudiada en varios serovares. Las preparaciones de LPS de leptospira pueden desarrollar actividad biológica por endotoxinas pero de menor intensidad (Valenzuela y Vela 2003). El serovar Pomona es notable por la producción de enfermedad hemolítica en ganado, mientras que el serovar ballum produce síntomas similares en hámsteres. Las hemolisinas de diversos serovares han sido caracterizadas. Las hemolisinas de los serovares ballum, hardjo, Pomona y tarassovi son esfingomielinasas. Las cepas virulentas exhiben quimiotaxis hacia la hemoglobina. Se ha observado que el plasma previene las hemolisinas. La actividad de la fosfolipasa C ha sido reportado para el serovar canicola. Una hemolisina del serovar lai no está asociada con la actividad de las esfingomielinasas o fosfolipasas y se cree que es una proteína poro formadora (Levett 2001).

Las cepas de los serovares Pomona y conpenhageni elaboran una proteína citotóxica, y la actividad citotóxica ha sido detectada en el plasma de animales infectados. *In vivo*, estas toxinas muestran un típico efecto histopatológico con infiltración de macrófagos y células polimorfonucleadas. Una fracción de glicoproteína con actividad citotóxica fue recuperada del serovar conpenhageni. Una fracción similar del serovar canicola inhibe la Na⁺, K⁺ ATPasa (*idem*).

b. Adhesión. Se ha demostrado que las leptospiras se adhieren a las células epiteliales. Las leptospiras virulentas se adhieren a las células epiteliales renales *in vitro* y esta adhesión es incrementada por las concentraciones de sub aglutinación de anticuerpos homólogos. Las leptospiras son fagocitadas por los macrófagos en la presencia de anticuerpos específicos. La inhibición de la actividad de los macrófagos incrementa la sensibilidad a la infección. Las leptospiras virulentas se han asociado con neutrófilos, pero no son eliminadas. La fagocitosis ocurre solo en presencia del suero y complemento, sugiriendo que la envoltura exterior de las leptospiras posee un componente antifagocítico. La adherencia a neutrófilos, células epiteliales y plaquetas estimulada por LPS de leptospiras causa agregación y sugiere un rol en el desarrollo de trombocitopenia (*idem*).

c. Mecanismo inmune. La segunda fase de la Leptospirosis aguda también se refiere como fase inmune, en la cual la desaparición de un organismo del flujo sanguíneo coincide con la aparición de anticuerpos. La severidad clínica de la enfermedad frecuentemente aparece salirse de proporción de los hallazgos histopatológicos. La enfermedad mediada por inmunidad ha sido propuesta como un factor influyente en la severidad de los síntomas (*idem*).

Se ha postulado que la producción de complejos inmunes llevan a una inflamación del sistema nervioso central. Los niveles de los complejos inmunes circulantes fueron relacionados con la severidad de los síntomas. La patogénesis de la uveítis recurrente de equinos parece involucrar la producción de anticuerpos contra el antígeno de leptospiras que reacciona cruzadamente con los tejidos oculares. El daño retinal en los caballos con uveítis está relacionado a la presencia de linfocitos B en la retina. Los anticuerpos antiplaquetas han sido demostrados en la Leptospirosis humana. En la Leptospirosis y la septicemia, estos anticuerpos son dirigidos contra los criptantígenos expuestos en las plaquetas dañadas y no tienen un papel importante en el desarrollo de trombocitopenia. Otros anticuerpos han sido detectados en la enfermedad aguda, incluyendo anticuerpos anticardiolipina IgG y anticuerpos antineutrófilos citoplasmáticos. Las leptospiras virulentas inducen apoptosis *in vivo* e *in vitro*. En ratones, la apoptosis de los linfocitos es llevada a cabo por LPS que induce el factor alfa de necrosis de tumor o TNF- α por sus siglas en inglés. Se han reportado elevados niveles de citoquinas inflamatorias como TNF- α en pacientes con Leptospirosis (*idem*).

d. Proteínas de superficie. La membrana exterior de las leptospiras contienen LPS y varias lipoproteínas (proteínas de membrana exteriores, OMPs por sus siglas en inglés). El LPS es altamente inmunogénico y es responsable por la especificidad de serovares. Una relación inversa entre la expresión de OMPs transmembrana y la virulencia ha sido demostrada para el serovar grippotyphosa. La lipoproteína exterior de membrana LipL36 está regulada *in vivo* y no es reconocida por la respuesta inmune humoral en hámsteres infectados con leptospiras. Otras OMPs también se encuentran

reguladas *in vivo*. Los componentes de la membrana exterior pueden ser importantes en la patogénesis de la nefritis intersticial. Una proteína de unión a fibronectina es producida solo por cepas virulentas descritas recientemente (*idem*).

e. Inmunidad. La inmunidad a la Leptospirosis es primordialmente humoral en la naturaleza. La inmunidad pasiva puede ser conferida por anticuerpos solos. Un antígeno de serovar específico (F4) extraído de LPS, no posee actividad endotóxica e induce inmunidad protectora en conejos, cerdos de guinea y ratones. Un antígeno similar (TM) que inhibe la aglutinación por antisuero homólogo, fue demostrado ser distinto a F4, pero poseen epítomos comunes. La inmunidad está estrictamente restringida a los serovares homólogos o a un serovar relacionado. La especificidad de serovares está conferida por los antígenos de LPS. Muchos OMPs de leptospiras son altamente conservados, y el potencial para vacunas que pueden generar una inmunidad de protección amplia, ha sido sugerida en estudios recientes utilizando OmpL1 y LipL41, que inducen protección sinérgica (*idem*).

7. Epidemiología. La infección en los seres humanos ocurre directamente a través del contacto de las mucosas con orina de animales infectados o indirectamente a través del contacto con agua o suelos contaminados (Luchessi *et al.* 2004). Se encuentran cerca de 250 serovares capaces de vivir en la orina de animales infectados (Scarcelli *et al.* 2003). Anualmente ocurren diez millones de casos humanos alrededor del mundo (Ganoza *et al.* 2006). Los animales infectados pueden ser hospederos de mantenimiento o accidentales y, a su vez, portar y transmitir diferentes serovares de *Leptospira*. En todo el mundo la fuente más común de infección humana es la rata y su mayor frecuencia está en verano y otoño (Abuauada *et al.* 2005).

La prevalencia de diferentes serovares en una población humana depende del hospedero presente, de los serovares que este hospedero porte y también de las condiciones sanitarias locales, la ocupación y las prácticas de la población (Ferro *et al.* 2006). De acuerdo con lo anterior, la transmisión y la expresión clínica de la Leptospirosis puede variar según los contextos medioambientales y socioeconómicos. El

estudio de cada contexto, así como la vigilancia continua, son necesarios para determinar la magnitud del problema y las características epidemiológicas de la Leptospirosis que permitan el desarrollo e implementación de medidas de control efectivas (*idem*).

Se presume que la Leptospirosis es la enfermedad zoonótica más distribuida en el mundo. La fuente de infección en humanos es usualmente por contacto con orina de animales infectados, ya sea de forma directa o indirecta. La incidencia es significativamente alta en países con climas cálidos en comparación a regiones templadas, esto es debido a que las leptospiras sobreviven por más tiempo en un ambiente cálido y condiciones húmedas (Vinetz 2005). Sin embargo, los países más tropicales y en desarrollo proveen grandes oportunidades para la exposición de poblaciones humanas a animales infectados, ya sean animales silvestres, mascotas, animales de granja u otros. La enfermedad es estacional, con un pico de incidencia que ocurre en el verano u otoño en regiones templadas donde la temperatura es un factor limitante para la sobrevivencia de las leptospiras, y durante las estaciones lluviosas en regiones de clima cálido en donde la desecación rápida puede prevenir la sobrevivencia (Levett 2001). La Leptospirosis ocurre tanto en países industrializados como en países en desarrollo, pero es particularmente prevalente en países tropicales en donde las condiciones ambientales y socioeconómicas para la transmisión son particularmente favorables (Ganoza *et al.* 2006).

La incidencia de Leptospirosis reportada refleja la disponibilidad de los laboratorios de diagnóstico y el índice clínico de sospecho como la incidencia de la enfermedad. La vía usual de entrada de las leptospiras es a través de abrasiones o cortaduras en la piel o vía conjuntiva; la infección puede tomar lugar por piel intacta luego de una prolongada inmersión en agua, pero esto usualmente ocurre cuando las abrasiones pueden ocurrir. La transmisión por agua ha sido documentada y la contaminación puntual por suministros de agua ha provocado muchos brotes de Leptospirosis (cuadro 4), muchos de los brotes asociados a agua se dan luego de períodos de calor y clima seco en donde las leptospiras patogénicas presumiblemente se multiplican en charcos, ríos y arroyos de aguas frescas. Casos de Leptospirosis también se dan luego de extensas lluvias (Levett 2001). La inhalación de agua o aerosoles también puede provocar infección por las membranas

mucosas del tracto respiratorio. El agua y el suelo contaminado con la orina de animales infectados con leptospiras es una fuente de infección y por ello el rol del agua como vehículo de transmisión para miembros del complejo de *Leptospira* patogénica se conoce muy bien (Henry y Johnson 1978).

Raramente, la enfermedad también puede transmitirse por mordeduras de animales. La transmisión directa entre humanos ha sido demostrada en raras ocasiones. Sin embargo, la excreción de leptospiras en la orina humana meses luego de la recuperación también ha sido reportada. Se sabe que el bajo pH de la orina limita la sobrevivencia de las leptospiras luego de la excreción. La transmisión por relaciones sexuales durante la convalecencia también ha sido reportada (Levett 2001).

Los animales, incluyendo el ser humano, pueden ser hospederos definitivos, intermedios o accidentales. La enfermedad es mantenida en la naturaleza como una infección crónica en los túbulos renales de los hospederos intermediarios y definitivos. Un hospedero definitivo e intermedio es definido como una especie en la que la infección es endémica y es usualmente transferida de animal a animal o por contacto directo (*idem*). La infección es usualmente adquirida en edad joven y la prevalencia de la excreción crónica en la orina incrementa con la edad del animal. Otros animales (como humanos) pueden ser infectados directa o indirectamente con los hospederos definitivos o intermediarios (OMS 2003). Los animales pueden ser hospederos definitivos de algunos serovares, pero pueden ser hospederos accidentales de otros, la infección puede causar una enfermedad severa o fatal. El hospedero definitivo más importante son los mamíferos pequeños que pueden transferir la infección a animales domésticos, de granja, perros o humanos. La extensión en la cual la infección es transmitida depende de muchos factores que incluyen clima, densidad poblacional y el grado de contacto entre los hospederos incidentales y definitivos. Diferentes especies de roedores pueden ser reservorios de distintos serovares, pero las ratas son generalmente el hospedero definitivo para los serogrupos icterohaemorrhagiae y ballum, y los ratones son hospederos definitivos del serogrupo ballum. Los animales domésticos, son también hospederos definitivos o intermediarios, el ganado puede cargar serovares hardjo, pomona y grippotyphosa; los

cerdos pueden cargar los serovares pomona, tarassovi o Bratislava; las ovejas pueden cargar los serovares hardjo y pomona, y los perros pueden cargar el serovar canicola. Variaciones distintas en los hospederos definitivos y los serovares que llevan ocurren a través del mundo. Un conocimiento de los serovares prevalentes y sus hospederos definitivos es esencial para entender la epidemiología de la enfermedad en cualquier región (Levett 2001).

Las infecciones humanas pueden ser adquiridas de forma ocupacional, recreacional o por exposición ocasional (Sáenz y Rodríguez 2004). En Guatemala en el año 2003, se reportó un caso de defunción por Leptospirosis de una promotora de salud del área de Masagua, Escuintla; demostrando ser un caso de adquisición de Leptospirosis de forma ocupacional y exposición ocasional durante una inundación (Cifuentes 2003). Las leptospiras son capaces de sobrevivir en suelo, agua y el ambiente en general por varios meses (Ganoza *et al.* 2006). Animales infectados con leptospiras pueden contaminar el agua a través de la orina, y si en el agua se encuentran las condiciones ambientales propicias, esta puede constituir una fuente de infección (Gatti *et al.* 2004). La ocupación es un factor de riesgo importante para los humanos. El contacto directo con animales infectado puede provocar infecciones en granjeros, veterinarios, ganaderos, inspectores de salud, trabajadores de control de plagas, inspectores de carnes, y otros trabajos que requieran contacto con animales (Ganoza *et al.* 2006). El contacto indirecto es un factor importante para los agricultores, mineros, soldados, limpiadores de tanques sépticos, trabajadores en granjas de cultivo de peces y mariscos, trabajadores en ríos, agricultores de arroz, granjeros de bananos y caña de azúcar. Los mineros fueron el primer grupo de riesgo ocupacional en ser reconocidos para la Leptospirosis. La ocurrencia de la enfermedad de Weil en los agricultores fue reportada primero en 1930. El serovar icterohaemorrhagiae fue aislado en cerdos de guinea por inoculación de suero de pacientes, de ratas atrapadas en arroyos y de las orillas de los arroyos. Se cree que la presencia de detergentes en las aguas negras o de desecho pueden reducir la sobrevivencia de las leptospiras en charcos y arroyos, ya que las leptospiras son inhibidas por concentraciones bajas de detergente (Levett 2001).

Los trabajadores en granjas de cultivo de peces y mariscos fueron otro de los grupos con riesgo ocupacional para contraer Leptospirosis. El reconocimiento de los factores de riesgo y la adopción de medidas de prevención y control de roedores han reducido significativamente la incidencia de infecciones ocupacionales. Las granjas son otro factor de riesgo ocupacional en el mundo. El más alto riesgo está asociado con la ganadería asociada con el serovar hardjo, en particular por la manipulación de leche de las vacas. Casos humanos han sido asociados con la enfermedad clínica en el ganado, pero esto es invariable. Como se mencionó anteriormente, el ganado es hospedero definitivo o intermedio del serovar hardjo e infecciones con este serovar ocurren a través de todo el mundo. Muchos animales son portadores seronegativos. Luego de la infección, las leptospiras se localizan en los riñones y son excretadas intermitentemente en la orina (*idem*).

En Guatemala, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala se han realizado diversos estudios de tesis, en bovinos, porcinos, perros y ratas. se encontró que los bovinos en el occidente, y el norte del país presentan una prevalencia que va de 65 al 80 % en los años de 1980 y 1982. En el ganado porcino se encontró prevalencias en un rango que oscila de 23 a 54 % para la región central del país estudiando los departamentos de Santa Rosa y Guatemala en los años 1981 y 1986. La prevalencia en perros y ratas que habitan en la ciudad capital fue de 8.9 y 5.08 % respectivamente en 1983 y 1986 (Ríos 1999).

También existe un riesgo significativo asociado con exposición recreacional en deportes acuáticos que incluyen la natación, canoas, rafting de ríos, pesca en aguas dulces y otros deportes en donde la exposición es común (Ganoza *et al.* 2006). Un riesgo potencial de exposición puede ocurrir en una gran cantidad de individuos durante eventos de competición (Levett 2001).

Serovares patogénicos han sido aislados de agua en regiones tropicales y en los Estados Unidos, en donde los serovares icterohaemorrhagiae, dakota, ballum, pomona y grippityphosa han sido recuperadas. La sobrevivencia de leptospiras patogénicas en el

ambiente depende de muchos factores que incluyen el pH, la temperatura y la presencia de compuestos inhibidores. Muchos de los estudios han utilizado algunos serovares y diferentes metodologías, pero algunas conclusiones amplias se han obtenido. En condiciones de laboratorio, las leptospiras en agua a temperatura ambiente permanecen viables por muchos meses a un pH de 7.2 a 8.0, pero en los ríos de agua natural la sobrevivencia es menor y es prolongada a menores temperaturas (Trueba *et al.* 2004). La presencia de desperdicios domésticos disminuye el tiempo de sobrevivencia a horas, pero en lugares con oxidación en presencia de desechos de ganado, se pueden detectar leptospiras viables luego de semanas. Cuando el suelo está contaminado con orina de ratas infectadas u otros hospederos, las leptospiras sobreviven aproximadamente dos semanas, pero esta sobrevivencia depende del pH del suelo y condiciones de humedad (Levett 2001).

Muchos casos esporádicos de Leptospirosis en regiones tropicales son adquiridos a través de exposiciones ocasionales que ocurren durante actividades de la vida diaria. Muchas infecciones resultan de caminar descalzo en condiciones poco higiénicas o realizar jardinería con las manos desnudas. Los perros son reservorios significativos para las infecciones humanas en muchos países tropicales, y pueden ser importantes fuentes de brotes (*idem*).

Es posible que animales infectados estén presentes y tengan acceso a aguas superficiales, por lo tanto, es lógico asumir que el ambiente regularmente se encuentra contaminado con leptospiras patogénicas y por lo tanto el ambiente constituye un riesgo de infección. Así es imposible categorizar por estatus si la superficie del agua es segura porque no es posible coleccionar y examinar una muestra de agua que pueda ser representativa para un gran cuerpo de agua. Encontrar leptospiras patogénicas en el agua por cultivo o por PCR u otro método disponible, es una prueba de la ocurrencia de las bacterias en el agua en el tiempo y lugar del muestreo y confirma que existe un riesgo de infección. Sin embargo, si no se encuentran las leptospiras no significa necesariamente que están ausentes (OMS 2003).

Si la presencia de leptospiras patógenas resultan en infección puede no depender de un gran número de factores como la concentración de leptospiras, la duración de la exposición, la posibilidad de que puedan penetrar el cuerpo humano, etc. Si se sospecha la contaminación de agua superficial, una posible forma de asegurarse si puede haber contaminación es revisar el área alrededor del cuerpo de agua para la presencia de animales que puedan actuar como fuente de infección. Esto se aplica a todas las situaciones donde se sospecha transmisión (*idem*).

Cuadro 4. Brotes de Leptospirosis asociados con agua .

Lugar y año	No. De casos	Exposición	Fuente de infección	Serogrupo presuntivo
Lisbon, Protugal, 1931	126	Ingestión de agua de fuente	Contaminación por orina de rata	Desconocido
Grecia, 1931	31	Ingestión de agua en un café	Contaminación por orina de rata	Desconocido
Filadelfia, 1939	7	Nadar en un arroyo	Contaminación por orina de rata	Icterohaemorrhagiae; serovar icterohaemorrhagiae aislado de un caso
Georgia, 1940	35	Nadar en un arroyo	Contaminación por vacas muertas	Desconocido
Georgia, 1952	26	Nadar en un arroyo	Se sospecha de perros	Canicola
Rusia, 1952	No estimado	Nadar en un lago	Se sospecha de perros y/o ratas	Canicola
Japón, 1953	114	Nadar en un río	Se sospecha de perros	Canicola; serovar canicola aislado
Rusia, 1954	62	Ingestión y baño en agua de pozo	Contaminación por cerdos	Serovar pomona aislado
Dakota del sur, 1956	3	Nadar en un río	Desconocido	Pomona
Florida, 1958	9	Nadar en un arroyo	Contaminación por ganado y/o cerdos	Serovar pomona aislado
Iowa, 1959	40	Nadar en un arroyo	Contaminación por ganado	Serovar pomona aislado de casos humanos y ganado
Washington, 1964	61	Nadar en un cana	Se sospecha de ganado	Pomona; serovar pomona aislado de ganado

Continuación de cuadro 4: brotes de Leptospirosis asociados con agua

Lugar y año	No. de casos	Exposición	Fuente de infección	Serogrupo presuntivo
Tennessee, 1975	7	Nadar en un arroyo	Desconocido	Grippotyphosa
Buenos Aires, Argentina, 1976	10	Nadar en un canal de drenaje	Se sospecha de cerdos	Pomona; serovar pomona aislado de pacientes
Italia, 1984	35	Ingestión de agua de fuente	Erizo muertos en tanque	Australis
Missouri, 1985	4	Navegar con Kayacs durante época lluviosa	Desconocido	Djasiman
Morón, Cuba, 1986	6	Nadar en un canal	Se sospecha de perros	Canicola
Okinawa, Japón, 1987	22	Nadar en una piscina o entrenamiento en la jungla	Desconocido	Shermani
Kauai, Hawaii, 1987	8	Nadar en un río	Se sospecha de ganado	Australis; serovares Bangkok y bataviae aislados
São Paulo, Brazil, 1987	23	Nadar en una piscina con agua de río	Desconocido	Pomona
Illinois, 1991	5	Nadar en un arroyo	Desconocido; muchas especies de animales seropositivos	Grippotyphosa, serovar grippotyphosa aislado de pacientes y agua
Kauai, hawaii, 1992	8	Nadar en agua de lluvia	Desconocido	Australis, serovar Bangkok
Costa Rica, 1996	9	Baño en aguas blancas	Desconocido	Desconocido
Barbados, 1997	2	Nadar en un arroyo	Desconocido	Serovar bim aislado de un caso
Illinois y Wisconsin, 1998	74	Nadar en un río	Desconocido	Desconocido

(Levett 2001).

En Guatemala la Leptospirosis es una enfermedad de notificación obligatoria. Sin embargo la prevalencia e incidencia de la enfermedad por parte del Ministerio de Salud Pública posee pocos datos epidemiológicos del país. Se encuentran reportados únicamente 11 casos por sexo y género de Leptospirosis en Guatemala para el año 2007 (MSPAS 2008). Durante una inundación en el año 2003 en Masagua, Escuintla; se

reportaron 12 casos sospechosos de Leptospirosis y la defunción de una persona por la enfermedad. Estos casos fueron asociados fuertemente a dos tipos de contacto con agua contaminada, principalmente por contacto de manos con el agua y en segundo grado por la ingestión de agua (cuadro 5) (Cifuentes 2003). No se han reportado más casos de Leptospirosis en Guatemala además del mencionado en el año 2003.

Cuadro 5. Factores de riesgo asociados en el brote de febril hemorrágicos, personal de la DAS de Escuintla, 2003.

Factores de riesgo (IC 95%)	RR	Li-Ls	Valor de P
Agua contaminada	0.76	0.26-2.30	0.66
Camino sobre agua contaminada	0.77	0.18-3.34	0.75
Inmersión	0.77	0.18-3.34	0.75
Bebió de agua de agua posiblemente contaminada con las manos.	2.16	0.88-5.31	0.09
Uso zapatos de cuero	0.98	0.30-3.21	0.97
Se quitó el calzado usado	2.09	0.91-4.82	0.13
Lesiones en la piel	2.09	0.91-4.82	0.13

(Cifuentes 2003).

Un estudio realizado por Ríos Monge sobre la Leptospirosis en Guatemala, demostró que para el período comprendido entre 1998 a 1999 se contaba con 25 casos registrados de Leptospirosis, en donde las principales fuentes de infección fueron el contacto con orina de animales y con agua estancada y en un porcentaje significativo la fuente fue desconocida (Ríos 1999). Según el Programa de Control de Rabia y Zoonosis, y en el Sistema gerencial de Salud (SIGSA) del Ministerio de Salud Pública, se encuentran reportados únicamente 20 casos de Leptospirosis confirmada para el período de 1998 al 2001 (López 2001). Además, otros estudios realizados mostraron que luego de la tormenta tropical Mitch en Guatemala y el resto de Centro América, hubo un aumento de factores de riesgo y exposición a la enfermedad, y como consecuencia los casos aumentaron en la región, aunque no se tienen datos exactos. De acuerdo a reportes del Laboratorio Central del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, los casos de Leptospirosis aumentaron, reportándose un incremento en los departamentos de Escuintla, Izabal, Guatemala y El Progreso (Ríos 1999). Las características tropicales de Guatemala como el clima, la orografía, la red fluvial natural, las extensas áreas agrícolas,

además de las condiciones poco higiénicas en las que vive la población rural, constituyen factores predisponentes y favorecen la propagación de la Leptospirosis (López 2001).

Tres patrones epidemiológicos de la Leptospirosis han sido definidas por Faine. El primer patrón es que la enfermedad ocurre en climas templados donde pocos serovares están involucrados y las infecciones humanas casi siempre ocurren invariablemente por contacto directo con animales infectados a través de granjas de cerdos y ganado (Ochoa *et al.* 2001). El control por inmunización de animales y/o humanos es potencialmente posible. El segundo patrón ocurre en áreas tropicales húmedas en donde existen muchos serovares que infectan humanos y animales, y un gran número de especies de reservorios se encuentran, estos incluyen roedores, animales de granja y perros. La exposición humana no se encuentra limitada por ocupación pero los resultados son más frecuentes por contaminación ambiental, particularmente durante la estación lluviosa. El control de la población de roedores, el drenaje de áreas húmedas y la higiene ocupacional son necesarias para la prevención de la Leptospirosis humana (Johnson *et al.*, 2004). El tercer patrón comprende la infección a través de roedores en el ambiente urbano. Mientras esto es de menor significancia a través del mundo, es potencialmente más importante cuando la infraestructura urbana está dañada por guerras o desastres naturales. Este tipo de infección es raramente observada en países desarrollados (Levett 2001).

Las condiciones de insalubridad extrema por ausencia de saneamiento básico en los asentamientos humanos pobres de la periferia de las grandes ciudades constituyen un fuerte riesgo de epidemia (Ríos 1999).

La Leptospirosis es importante por su distribución mundial, por el compromiso de la salud humana y animal y por sus repercusiones económicas. Las posibilidades de intervención han sido estudiadas y se dispone de tratamientos para seres humanos y animales, de profilaxis con antibióticos y vacunas, y de medidas específicas de saneamiento básico (Ochoa *et al.* 2004).

B. Métodos de detección, cultivo e identificación

Dado el gran espectro de síntomas no específicos que puede presentar un paciente con Leptospirosis, se requiere un diagnóstico diferencial con otras condiciones, como influenza, meningitis viral, fiebre hemorrágica, entre otras. Por lo tanto, se necesita la confirmación por análisis de laboratorio (Luchessi *et al.* 2004).

Existen diversos métodos para la detección de leptospiras en muestras de pacientes y ambientales. Entre estas técnicas se encuentran las técnicas microbiológicas convencionales que incluyen medios de cultivo selectivos y presuntivos, tinciones y otras pruebas para determinar la identidad de la bacteria que se tiene en una muestra (OMS 2003). Sin embargo estos métodos son poco selectivos, poseen una baja sensibilidad y especificidad, además de ser tedioso el estudio con estos métodos (Doern 2000). También es factible la detección de leptospiras por métodos microscópicos por medio de la técnica de campo oscuro, pero esta técnica también resulta ser poco específica y no sirve para identificar especies, es poco sensible y se requiere de una persona muy entrenada para la detección (Noguchi 1919). Otros métodos más específicos los constituyen las técnicas de serología (cuadro 6), las cuales son bastante sensibles y específicas para identificar leptospiras en una muestra, las desventajas que se tienen con estos métodos radican en contaminación y reacciones cruzadas (Brendle y Alexander 1974). También existen las técnicas de inmunofluorescencia y fluorescencia que son bastante sensibles y específicas, pero tienen también tienen la desventaja de reacciones cruzadas y se necesita de alguien entrenado para estos análisis. Actualmente con el advenimiento de técnicas moleculares, la detección de leptospiras por medios moleculares como PCR y otras técnicas que involucran ADN, han demostrado ser altamente específicas y sensibles, aunque la desventaja es el costo de estas técnicas y la experiencia de una persona especializada en ellas (Luchessi *et al.* 2004). Para esta investigación, a continuación se detallan solo los métodos moleculares para detección de leptospiras, que son los métodos y técnicas de interés en este estudio.

Cuadro 6: Pruebas serológicas específicas de género para el diagnóstico de Leptospirosis.

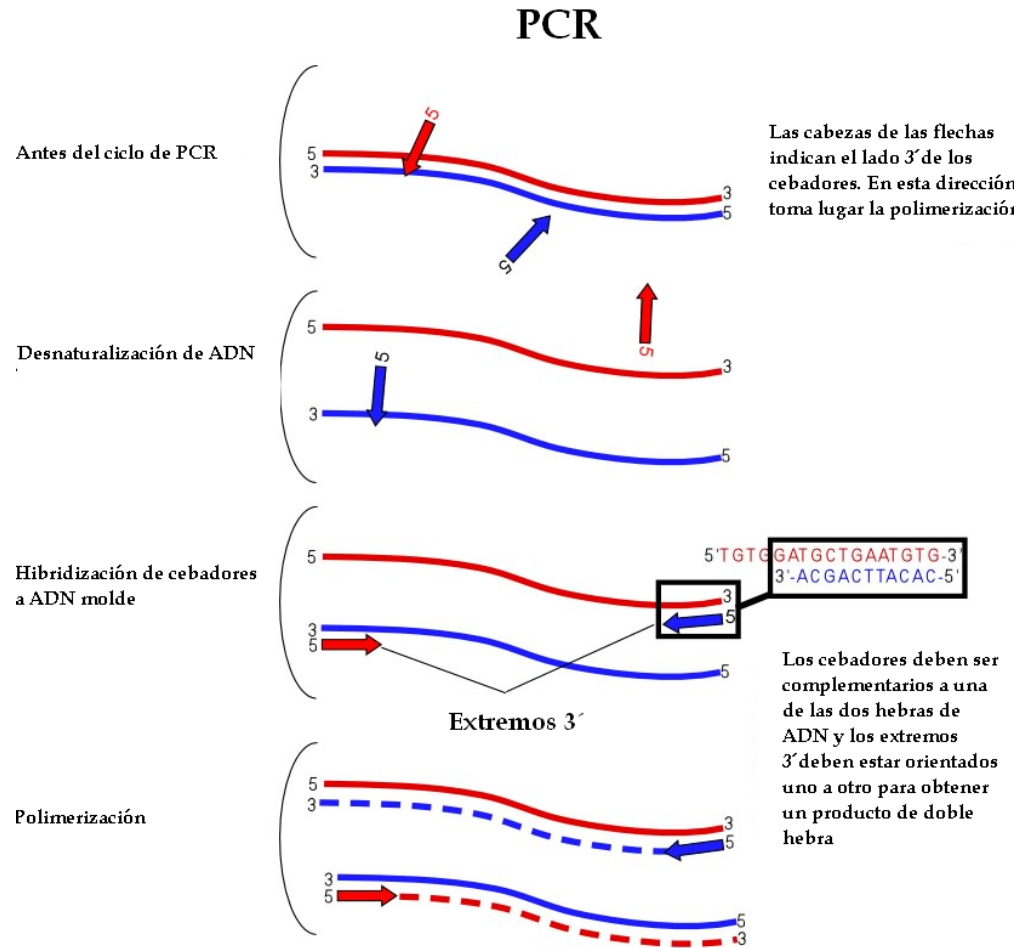
Prueba de fijación del complemento
Lisis eritrocitaria sensibilizada
Aglutinación microscópica en placa
Inmunofluorescencia
Prueba de aglutinación en placa Patoc
Hemaglutinación indirecta
Inmunoelectroforesis de conteo
ELISA
Aglutinación en micro cápsula
Dot-ELISA
IgM dipstick
Aglutinación en látex

(Levett 2001).

1. La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). La reacción en cadena de la polimerasa comprende una amplificación selectiva de una región escogida de una molécula de ADN. Cualquier región de cualquier molécula de ADN puede ser elegida, así se deben conocer las secuencias de los bordes de una región. Las secuencias en bordes deben ser conocidas en orden para poder llevar a cabo un PCR, dos oligonucleótidos deben hibridizar la molécula de ADN, uno de ellos en cada hebra de la doble hélice (Figura 2). Estos oligonucleótidos que actúan como cebadores para la reacción de síntesis de ADN delimitan la región que va a ser amplificada (Brown 2001).

El PCR se utiliza para detectar ADN de leptospiras en muestras clínicas y ambientales; puede ser aplicado a sangre, orina, fluido cerebroespinal, muestras de tejido, agua, suelo, etc. El ADN amplificado de estas muestras puede ser fácilmente detectado en gel de agarosa. Adicionalmente, se pueden realizar otros métodos altamente específicos durante el PCR, como la utilización de marcadores durante la hibridización (OMS 2003).

Figura 2: Hibridación de los cebadores oligonucleótidos en el ADN molde al inicio de un PCR.



(Hendrickson, 2007).

El PCR debe preferiblemente ser combinado con un paso de hibridación y/o utilizar un par de cebadores anidados para asegurar la alta especificidad. Con la disponibilidad actual de termocicladores rápidos y los kits de reacciones listos para realizar, el PCR es un método rápido que puede usarse para un diagnóstico temprano de la Leptospirosis. Hasta la fecha, se han descrito varios métodos en base a PCR para la detección de leptospiras en todo tipo de muestras. Estos métodos utilizan como mayor objetivo en genes que codifica ARNr 16S. Otros blancos incluyen los genes *secY* y *flaB* para el juego de cebadores combinados G1/G2 y B64I/B64II, respectivamente según Gravekamp et al (*idem*).

2. Diagnóstico molecular. El PCR provee una buena base para la tipificación y el diagnóstico de las leptospiras. Los siguientes métodos pueden ser utilizados:

- Utilizar los cebadores deducidos para amplificar secuencias específicas de especies o cepas.
- Determinación de las secuencias de los productos de PCR.
- Aplicación de técnicas de RFLP a los productos de PCR.
- Utilización de cebadores en secuencias que tienen posiciones características en cepas en el genoma, como por ejemplo, elementos de inserción como el gen IS1500 y de aquí se generan patrones característicos de cepas en geles de agarosa.
- Se puede realizar un análisis por polimorfismo de conformación de una hebra (Single-strand conformation polymorphism, SSCP).
- Se puede realizar un PCR con cebadores arbitrarios (Arbitrary primed PCR, AP-PCR), o se puede realizar una amplificación al azar de ADN polimórfico (random amplification of polymorphic DNA, RAPD), también se puede realizar un PCR de baja astringencia (low stringency PCR, LS-PCR) (WHO 2003).

Las ventajas de utilizar métodos moleculares basados en PCR o bien el PCR es que estos métodos confirman rápidamente el diagnóstico en la fase temprana de la enfermedad, cuando la bacteria puede estar presente antes de que se obtengan títulos detectables de anticuerpos. Estos métodos también poseen desventajas y son que se requiere de equipo especial y un espacio en el laboratorio, además de personal muy capacitado. Estos métodos también pueden dar resultados falsos positivos en la presencia de pequeñas cantidades de ADN extraño que pueda contaminar las áreas de trabajo. También puede dar resultados falsos negativos como resultado de inhibidores que estén presentes en la muestra o el material que se examine. La validez de los datos de PCR dependen esencialmente de los controles de calidad incluidos en la prueba (*idem*).

Muestras de agua y suelo pueden ser cultivados y examinados para el cultivo de leptospiras patogénicas. Sin embargo, estas técnicas pueden requerir de muchas semanas o incluso meses para completarse y los resultados son así retrospectivos y se aplican solo al tiempo y al lugar donde las muestras fueron obtenidas. El PCR puede solucionar los problemas de tiempo, pero como se mencionó anteriormente tiene algunas desventajas. La sensibilidad del muestreo ambiental es bajo, pero es importante saber y tener presente que leptospiras saprofiticas pueden vivir en el ambiente, donde las leptospiras patogénicas pueden ser llevadas por animales y así interferir con la detección de leptospiras patogénicas (*idem*).

El ADN de leptospiras ha sido detectado en materiales clínicos por “dot-blotting” e hibridación in situ y otras técnicas basadas en PCR. Una prueba específica para los serovares patogénicos fueron realizadas para el serovar lai. Las pruebas específicas para el serovar hardjobovis fue desarrollada y aplicada para la detección en orina bovina, entre otras (Levett 2001).

El análisis por PCR puede ser aplicado para amplificar selectivamente secuencias específicas de ADN por más de 10^{17} veces. Así, el PCR es muy útil para la detección rápida de organismos involucrados en infecciones agudas, como la Leptospirosis. De hecho, los cebadores oligonucleótidos han sido desarrollados por muchos equipos de investigación y han sido utilizados para la detección específica de ciertos serovares de *Leptospira*. Gravekamp *et al.*, diseño dos pares de cebadores para una amplificación específica de leptospiras patogénicas. Con algunas modificaciones, este método ha sido aplicado al análisis de varias cepas aisladas en Argentina de agua, suelo y pacientes humanos (Luchessi *et al.* 2004).

Las técnicas moleculares basadas en PCR han sido desarrolladas con sucesos limitados. Estos métodos con PCR publicados a la fecha, involucran la amplificación de secuencias con función desconocida o, con pocas excepciones, se han utilizado para la identificación de una pequeña fracción de todos los posibles miembros del género *Leptospira*. Las secuencias de ADN parciales de productos de PCR de los genes del

ARNr 23S de las 23 cepas que representan las 6 genomoespecies de *Leptospira* y 8 cepas de *L. biflexa* han sido determinadas en algunos estudios, y las secuencias obtenidas pudieron ser identificadas para la diferenciación entre bacterias patógenas y saprofitas. Algunos estudios basados en PCR han desarrollado cebadores para la amplificación por PCR y conjuntamente se realizan otras pruebas moleculares para determinar la identidad del género, algunas de estos cebadores se encuentran marcados con fluorocromos u otros marcadores para poder realizar otros análisis posteriores a la amplificación (Woo *et al.* 1997).

Muchos pares de cebadores han sido descritos para la detección de leptospirosis por PCR, algunos de estos cebadores están basados en blancos de genes específicos, más frecuentemente los genes de la región 16S ó 23S del ARNr y elementos repetitivos, mientras otros cebadores han sido construidos de librerías genómicas. Sin embargo, pocos de estos cebadores han mostrado amplificar el ADN de leptospirosis de fuentes humanas o veterinarias, materiales clínicos y otros. Los cebadores descritos por Merien *et al.*, amplifican un fragmento de 331 pb del gen *rrs* (ARNr 16S) de leptospirosis patogénicas y no patogénicas, que en presencia de contaminación de especímenes con leptospirosis no patogénicas pueden producir un resultado falso positivo, mientras que los cebadores G1 y G2 descritos por Gravekamp *et al.*, no amplifican los serovares de *L. kirschneri*, necesitando el uso de dos pares de cebadores para la detección de todos los serovares patogénicos (Levett 2001).

Además de estos potenciales defectos, estos pares de cebadores han sido los más ampliamente utilizados para estudios clínicos. El ADN de leptospirosis ha sido amplificado de suero, orina, humor acuoso, líquido cefalorraquídeo y un número de tejidos obtenidos de necropsias. La detección del ADN de leptospirosis en orina bovina ha sido también investigada. Los cebadores que amplifican varios serovares del serogrupo Sejroe fueron descritos, y se desarrolló un método específico para el serovar hardjo genotipo hardjobovis (Parma *et al.* 1997). Un análisis basado en la secuencia de inserción IS1533 facilitó la detección e identificación de los serovares presentes en orina. Otro ensayo fue desarrollado para ser utilizados en muestras de orina porcina y bovina. Para solucionar el

problema de los inhibidores presentes en la orina bovina, se ha desarrollado ensayos de inmunocaptura por PCR para en serovar hardjo (Levett 2001).

Otros estudios basados en PCR han demostrado ser altamente específicos y sensibles (Oliveira *et al.* 2003). Sin embargo, una limitación en el diagnóstico de Leptospirosis por PCR es la inhabilidad de muchos ensayos de PCR para detectar un serovar infectivo. Esto no es significativo para un manejo de pacientes individuales, la identidad del serovar tiene un valor epidemiológico y en la salud pública. Las estrategias desarrolladas para superar este obstáculo han incluido la digestión con enzimas de restricción y el análisis posterior por PCR, el secuenciamiento directo de amplicones y el análisis de conformación de una sola hebra o SSCP por sus siglas en inglés. Las genomoespecies de leptospiras pero no los serovares individuales pueden ser diferenciados por un PCR seguido de una electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes y seguido de una tinción de plata, sin el paso adicional de purificación y desnaturalización. El PCR ha sido utilizado para distinguir los serovares patogénicos de los no patogénicos (Levett 2001).

3. Tipificación molecular

Debido a las dificultades asociadas con la identificación serológica de aislamientos de leptospiras, ha habido un gran interés en los métodos moleculares para la identificación y tipificación (Vitale *et al.* 2005). Los métodos empleados incluyen la digestión de endonucleasas de restricción (Restriction Endonucleases, REA), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP), ribotipificación, PFGE y una gran cantidad de acercamientos basados en PCR (Levett 2001).

EL ensayo REA ha sido estudiado extensivamente. Los genotipos distintos entre los serovares hardjo fueron tipificados por este método. Análisis posteriores por RFLP en los aislamientos del genotipo hardjobovis por REA, “Southern blotting” y PFGE han mostrado la existencia de múltiples clones genéticos que resultan de rearrreglos genómicos (*idem*).

La ribotipificación ha demostrado una razonable y buena correlación con la clasificación filogenética de leptospiras en 11 genomoespecies. Utilizando EcoRI para la digestión y ARNr 16S y 23S para *Escherichia coli* como sonda, se pudo realizar una gran base de datos. Muchos serovares tienen perfiles únicos, mientras otros serovares no pueden ser distinguidos de otros por ribotipificación, particularmente aquellos que se sabía que estaban relacionados cercanamente, como los serovares icterohaemorrhagiae y copenhageni. Los ribotipos de serovares con genomoespecies pueden ser agrupados juntos por posesión de fragmentos comunes. Esta base de datos se encuentra disponible en el sitio web del Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Ribotyping.html>). Esto ha demostrado discriminar precisamente entre el serovar hardjo y los genotipos hardjobovis y hardoprajitno. Un rango de otras pruebas ha sido utilizado para generar RFLPs. Una prueba basada en elementos de secuencias repetitivas para el serovar hardjo y genotipo hardjobovis fue también utilizado para detectar leptospiras en orina bovina. El PFGE ha probado ser útil para caracterizar los serovares de leptospiras. En contraste a esta aplicación en la tipificación de cepas de otros organismos, el PFGE ha mostrado que el genoma de los serovares de leptospira son remarcablemente conservados a través del tiempo y a través de distribuciones geográficas amplias. El análisis PFGE se ha convertido en un ensayo estándar para la caracterización molecular de aislamientos de leptospiras, y otros métodos de tipificación molecular pueden en el futuro ser validados contra este método (*idem*).

Un factor limitante en todos los métodos que analizan ADN cromosomal es el requerimiento para grandes cantidades de ADN purificado. Como un resultado, muchos métodos basados en el análisis por amplificación por PCR de secciones de ADN de leptospiras han sido empleados (*idem*).

La variación en la secuencia es también explotado en el análisis SSCP. Este análisis de los amplicones G1-G2 permitió la identificación de serovares entre algunas genomoespecies estudiadas. Una restricción en el uso de una secuencia posterior es la inhabilidad de los cebadores G1 y G2 para amplificar *L. kirschneri*. Una aplicación

alternativa de estos cebadores es su utilización en condiciones de baja astringencia, generando una mezcla de productos específicos y no específicos. Bajo estas condiciones, los cebadores G1 y G2 amplifican todas las especies, incluyendo *L. biflexa*. Los polimorfismos detectados permitieron la discriminación de serovares con la excepción de serovares cercanamente relacionados, incluyendo los serovares copenhageni e icterohaemorrhagiae (*idem*). Además, los cebadores G1 y G2 han mostrado ser efectivos para la detección de leptospiras en orina de ratas infectadas, pero no detectó todas las leptospiras que pudieron ser detectadas por ELISA en estudios realizados en Perú (Johnson *et al.* 2004).

La presencia de múltiples copias de secuencias de inserción ha sido utilizada para la identificación de serovares. Los métodos basados en el gen IS1533 tienen aplicaciones limitadas por la ausencia de esta secuencia de inserción en *L. interrogans* (*sensu stricto*) y *L. noguchii*. Por amplificación de estas secuencias entre copias adyacentes del gen IS1500, han sido distinguidos numerosos subgrupos entre los serovares pomona tipo kennewickii (Levett 2001).

Las huellas digitales de ADN utilizan cebadores arbitrarios han sido estudiadas intensamente, utilizando distintas condiciones y cebadores (OMS 2003). La comparación directa entre los resultados de estos estudios son así imposibles, pero es clara que la reproducibilidad es difícil para llevar a cabo sin una estandarización absoluta de un procedimiento experimental. Los perfiles son afectados marcadamente por la utilización de los cebadores, la cantidad y calidad del ADN molde y las condiciones de electroforesis. El más grande valor de las técnicas de cebadores arbitrarios permanece en su habilidad para diferencias entre aislamientos cuando un rango de potenciales serovares es limitado, permitiendo una identificación rápida de cepas aisladas recientemente. Cebadores arbitrarios para PCR fueron utilizados para derivar una serie de pruebas específicas de especies para la identificación de *L. interrogans* (*sensu stricto*), *L. borgpetersenii* y *L. kirschneri* por “dot blotting” (Levett 2001).

III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

A. Objetivo general

Detectar la presencia de *Leptospira* spp. patogénica en muestras de agua ambientales superficiales y de abastecimiento en casas de pacientes que presentaron Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 como un probable factor de riesgo de infección en Escuintla, Guatemala.

B. Objetivos específicos

1. Detectar *Leptospira* spp. patogénica por PCR en aguas ambientales superficiales en lugares cercanos y en las casas de personas que presentaron Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en la región de Escuintla, Guatemala.
2. Detectar *Leptospira* spp. patogénica por PCR en aguas de abastecimiento en lugares cercanos y en las casas de personas que presentaron Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en la región de Escuintla, Guatemala.
3. Determinar los municipios de Escuintla que presentan la mayor tasa de incidencia de *Leptospira* spp. patogénica en aguas de lugares cercanos y en casas de pacientes que presentaron Leptospirosis entre los años 2005 al 2007.

C. Hipótesis

Leptospira spp. patogénica se encuentra presente en fuentes de agua de abastecimiento y cuerpos de aguas ambientales superficiales dentro y en áreas próximas a la casa de pacientes sospechosos de Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala.

D. Variables

Variable independiente: Presencia o ausencia de *Leptospira* spp. patogénica.

E. Diseño experimental

El tipo de investigación es correlacional, y el diseño es experimental de tipo: cuasiexperimento.

F. Justificación

Guatemala es un país tropical en desarrollo. Las condiciones socioeconómicas y climáticas del país son ideales para el establecimiento de la Leptospirosis. Sin embargo, no se conoce la magnitud del problema debido a que el Ministerio de Salud Pública no cuenta con estadísticas epidemiológicas bien establecidas sobre la enfermedad.

Escuintla es un departamento de Guatemala con un clima muy cálido y sus condiciones socioeconómicas son bajas. Este departamento presenta muchos casos de síndromes ictericos no virales, que podrían ser causados por *Leptospira* spp. Este diagnóstico es difícil porque en los centros de salud del departamento no se cuentan con las técnicas de laboratorio para identificar el patógeno.

La identificación de las situaciones de riesgo, dadas principalmente por problemas de saneamiento ambiental y concentración de animales susceptibles de transmitir la enfermedad, así como el análisis integrado de toda la información recopilada permitirán determinar medidas de intervención efectivas. Escuintla posee varios afluentes de agua, por lo que el agua superficial ambiental y de abastecimiento que utiliza la población podría constituir un riesgo importante de infección para la Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Descripción del sitio de estudio

El Departamento de Escuintla se encuentra situado en la Región V o Región Central del país. Limita al Norte con los departamentos de Chimaltenango, Sacatepéquez y Guatemala; al sur con el Océano Pacífico; al Este con Santa Rosa; y, al Oeste, con Suchitepéquez. La cabecera departamental es Escuintla que se encuentra a 58 km de la ciudad de Guatemala, que se encuentra a una altura de 346.91 metros sobre el nivel mar, por lo que generalmente su clima es cálido. Escuintla se ubica en la altitud 14° y 18'03" longitud 90° 47'08" y cuenta con una extensión territorial de 4,384 kilómetros² que equivalen al 4% del territorio nacional. Los principales lugares poblados son: Escuintla, Santa Lucía Cotzumalguapa, Siquinalá, Tiquisate y San José. La jurisdicción departamental comprende 13 municipios cuya extensión territorial se observa en el cuadro 7 (MINECO 2007).

Cuadro 7: Municipios de Escuintla, Guatemala.

Municipio	Extensión territorial (Km²)
Escuintla	332
Santa Lucía Cotzumalguapa	432
La Democracia	320
Siquinalá	168
Masagua	448
Tiquisate	338
La Gomera	640
Guanagazapa	220
San José	280
Iztapa	328
Palín	88
San Vicente Pacaya	236
Nueva Concepción	554

(MINECO 2007).

En lo que respecta al tipo de suelo la zona central y sur del departamento está constituido de material arcilloso que forma zonas fangosas y pantanosas; en el sector cercano a la costa y al norte la mayoría de suelo está constituido de material volcánico. Este Departamento tiene dos áreas topográficas. En la primera sobresale la Sierra Madre, la cual posee conos volcánicos entre los cuales destaca el Volcán de Pacaya. Además, posee serranías complicadas y elevadas crestas, altiplanicies, desfiladeros y barrancos profundos, cráteres y lagunas; y la segunda, es conformada por una planicie que termina en el océano pacífico, la cual es llamada costa grande (*idem*).

Escuintla es irrigado por la vertiente de varios ríos, entre los cuales están: el río Michatoya, Guacalate, María Linda, El Naranjo, Coyolate, Nahualate y Madre Vieja. Estos ríos desembocan en el Océano Pacífico y recorren grandes extensiones del departamento. Por otro lado, en este departamento se forma el canal de Chiquimulilla el cual es navegado por varias embarcaciones, facilitando la comunicación con varias comunicaciones de este departamento y del departamento de Santa Rosa. Asimismo, existen algunas lagunas dentro de su territorio como la de Tecojate, Quitasombrero, Los Patos y Sipacate (*idem*).

El clima que predomina en la mayor parte del departamento es cálido, registrándose temperaturas entre 21 y 34° C promedio en la mayoría de los municipios, a excepción de los municipios de Palín, San Vicente Pacaya y parte de Guanagazapa, cuya región montañosa ya se considera del altiplano, donde se registran temperaturas entre 15 y 24° C promedio. Se observa una precipitación pluvial abundante durante los meses de mayo a octubre, mientras que en los meses de noviembre a abril se considera una época seca, aunque hay lluvias esporádicas; la humedad se encuentra en el 80%. Debido a su ubicación geográfica, el departamento de Escuintla cuenta con clima variable que va desde templado, hasta el cálido influyendo éstos en las diferentes zonas de vida del Departamento. Alberga dos tipos distintos de bosque. El área con cobertura forestal es de 228 kms², lo que representa aproximadamente el 5% del territorio del departamento (*idem*).

Los centros turísticos más importantes del departamento de Escuintla son las playas ubicadas en el litoral del Pacífico. Las más visitadas son la de Iztapa, San Jose, Sipacate, la Empalizada, Tecojate y el Semillero. Además existen diferentes sitios naturales y arqueológicos como potencial turístico, por ejemplo Las Grutas de San Pedro Mártir en Escuintla y sitios arqueológicos en San Lucía Cotzumalguapa, La Democracia, La Gomera y Tiquisate. En Escuintla se encuentran tres áreas protegidas que son: la Reserva Natural Privada Canaima en el municipio de San José; la Reserva Biológica “Sipacate Naranja” en el municipio de La Gomera; y la Reserva Biológica del Volcán de Pacaya, en el municipio de San Vicente Pacaya. Además, se han desarrollado en el departamento varios sitios de conservación de fauna y flora de carácter privado como: Auto Safari Chapín, Aqua Park, tortugarios, iguanarios y camaroneras en el litoral San José, Iztapa y en el parcelamiento El Naranja del municipio de la Gomera. Es importante mencionar el centro – escuela para la conservación de la iguana verde, la tortuga marina y el medio en que se desarrollan los mangales (*idem*).

Para el 2005, Escuintla contaba con 505,955 habitantes en todo el departamento, de los cuales posee vivienda o habitación particular unas 129, 208 personas. Existen varias necesidades básicas que se encuentran insatisfechas, estas se resumen en la figura 3 (*idem*).

Figura 3: necesidades básicas insatisfechas en el departamento de Escuintla hasta 1994.

Departamento/municipio	Número de hogares	Necesidades Básicas Insatisfechas 1994					
		Mala calidad vivienda	Hacinamiento	Sin agua potable	Sin servicio sanitario	Sin escolaridad	Insuficiencia de ingreso familiar
Total República	1,591,831	23	41	12	22	18	17
Departamento de Escuintla	78,080	20	42	6	23	14	14
Escuintla	18,637	14	34	4	10	10	9
Guanagazapa	1,700	39	54	11	31	21	24
Iztapa	1,974	10	51	2	38	13	14
La Democracia	2,678	23	43	4	16	15	16
La Gomera	7,480	11	47	5	18	17	17
Masagua	4,322	12	51	1	15	13	19
Nueva Concepción	9,911	12	49	8	52	17	21
Palín	3,746	28	40	11	14	15	11
San José	6,775	32	45	5	32	12	13
San Vicente Pacaya	1,909	21	42	17	59	10	13
Santa Lucía Cotzumalguapa	10,282	22	42	5	22	14	11
Siquinalá	1,822	21	45	7	13	13	12
Tiquisate	6,844	26	37	6	18	13	16

(MINECO 2007).

B. Selección de la muestra

El muestreo es de tipo no probabilístico de caso-tipo. Con colaboración y autorización del centro de salud de Escuintla, Área de Salud de Escuintla, Escuintla (ver anexo 1); se seleccionaron todas las fichas epidemiológicas nacionales de casos sospechosos de Leptospirosis humana desde los años 2005 al 2007 presentes en el centro de salud. Se eliminaron las fichas que no poseían una dirección exacta; las fichas que reportaron la misma dirección que otra ficha, se agruparon en un solo punto de muestreo. Se tomaron cada una de las direcciones de cada ficha y se procedió a buscar a los pacientes. En la casa del paciente se obtuvo un consentimiento para poder tomar la muestra de agua. A cada persona o paciente se le explicó quién es la persona que lo está entrevistando, cuál es el estudio, que se pretende realizar y finalmente se le pidió su consentimiento para tomar muestras de agua en su casa (ver anexo 2). En conjunto con la ficha de consentimiento se realizó una encuesta de entrevista personal de cuatro preguntas, a fin de averiguar con qué tipo de agua tenía contacto el entrevistado, la encuesta también se basó en un muestreo no probabilístico. En base al consentimiento se encuestó a cada persona sobre el contacto que tiene con distintas fuentes de agua (ríos, chorros públicos, pozos, etc), luego se procedió a muestrear todas las fuentes de agua indicados por el encuestado, esto determinó el total de muestras de agua por sitio muestreado.

Cuando los pacientes eran menores de 15 años, se procedió a explicar el estudio y obtener el consentimiento de personas mayores encargadas de la casa, en ningún momento se mencionó la presencia de la enfermedad en el paciente, para evitar romper la confidencialidad de la persona. Aquellas fichas epidemiológicas en las cuales no se encontró al paciente en la dirección que registró o no se encontró en la casa, se procedió a obtener un consentimiento de la casa vecina más cercana y realizar el procedimiento explicado anteriormente. Se eliminó las fichas del muestreo correspondiente al paciente o la persona entrevistada que no accedió a realizar la investigación, por lo tanto no entraron en el estudio.

C. Obtención de la muestra

Antes de tomar la muestra, se obtuvo la ubicación geográfica por medio de GPS (Garmin, GPS plus II) del sitio exacto donde se colectó cada muestra, los datos se obtuvieron en datos UTM y TRIP. Se tomaron 1000 mL de cada muestra de agua en cada sitio seleccionado. Se utilizaron frascos de plásticos transparentes de 1000 mL de capacidad. Para la toma de muestras de chorros, se procedió a abrir la manecilla y se dejó purgar el agua por 1 minuto, no fue necesaria la esterilización de la boquilla del chorro o del recipiente de muestra. Para la toma de muestras de aguas superficiales estáticas, pozos abiertos, pilas y pilas municipales o comunales, tinajas, recipientes, toneles, etc; la muestra se tomó 30 cm bajo la superficie del agua sumergiendo el recipiente para muestra. Para la toma de agua proveniente de charcos o aguas estancadas se tomó el agua directamente en la superficie con el recipiente para muestra. Para la toma de muestras de agua en ríos, arroyos, etc., se tomaron las muestras 30 cm bajo la superficie del agua con la boquilla del recipiente en dirección contraria a la corriente. Todos los frascos fueron rotulados debidamente con el lugar de colección, la fecha, hora, pH, temperatura y colector. El pH fue medido con papel indicador para pH (Merck); mientras que la temperatura fue medida con un termómetro de vidrio de 0-100 °C con una incertidumbre de ± 0.05 (Boeco).

D. Comité de ética

Antes de realizar el trabajo de muestreo y análisis de muestras, se procedió a solicitar la aprobación de protocolo por parte del Comité de Ética del Depto. De Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. El formulario puede observarse en el anexo 3. Se llenó el formulario de revisión expedita y se entregaron tres copias del mismo al director (a) del comité de ética. Se realizó el trabajo de muestreo y análisis hasta que se obtuvo la aprobación y visto bueno por parte de los miembros del comité.

E. Análisis de la muestra

1. Cuantificación de células de *Leptospira* y controles. Se realizó una curva estándar con la cepas control de *Leptospira interrogans* serovar icterohemorrhagiae como controles positivos para los pares de cebadores G1/G2 y Lepto16Sf/Lepto16S1338r que se describirán mas adelante en este documento. Por otro lado, se utilizó *L. samaranga* Patoc I como control negativo para los tres tipos de cebadores que se utilizaron, a esta cepa no se le realizó curva estándar. Las cepas fueron donadas por el cepario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la universidad de San Carlos de Guatemala. No se logró obtener una cepa control de *L. kirshneri* como control positivo para el par de cebadores B64I/B64II.

Las cepas fueron trasladadas desde la Universidad de San Carlos de Guatemala en medio de cultivo EMJH colocado en viales de 1.5 mL sellados totalmente con Parafilm. Los viales con las cepas fueron transportados dentro de un tubo Corning de 50 mL sellado y dentro de una hielera sin hielo, posteriormente fueron llevadas al laboratorio de bioquímica de la Universidad del Valle de Guatemala.

Para la cuantificación y realización de la curva estándar, se utilizaron las cepas frescas realizando el procedimiento el mismo día en que se obtuvieron. Debido a que la bacteria *Leptospira* es patógena al ser humano y está clasificada como agente de nivel de bioseguridad tipo II, se elaboró un Procedimiento Normado de Operación (ver anexo 5) para el trabajo dentro del laboratorio con las bacterias. El protocolo realizado se detalla a continuación:

- a. Se desinfectó todo el lugar de trabajo con cloro 10 % y posteriormente con etanol al 70%.

- b. La campana de flujo laminar (Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet, modelo 36208/36209, tipo A) sólo se limpió con etanol 70% y luego se colocó la luz UV por 15 minutos antes de empezar a trabajar.
- c. Los viales con las cepas de *Leptospira* fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 minutos en una centrifuga sin refrigeración (Fisher Scientific).
- d. El sobrenadante fue descartado en un recipiente con cloro puro y se dejó reposar por 1 hora antes de descartarlo al lavadero con abundante agua.
- e. Al botón de células restante en cada vial luego de la centrifugación, se le agregó 1 mL de agua destilada y se agitó suavemente, esta solución constituyó la solución madre de bacterias.
- f. Las leptospiras fueron contadas utilizando una cámara de conteo Neubauer (Boeco), se colocaron 10 μ L del agua inoculada con las bacterias dentro de la cámara.
- g. La cámara de conteo fue colocada en un microscopio de campo oscuro (Leica) y las leptospiras se contaron manualmente con un aumento de 10 X.
- h. Se retiró la cámara Neubauer del microscopio y se colocó en un recipiente con etanol al 70% para su desinfección.
- i. A partir del conteo de la solución madre de leptospiras en el agua, se obtuvo el número de células correspondientes para 1 mL de la solución. A partir de esta solución madre de bacterias, se realizaron diluciones seriadas a un volumen final de 1 mL (1/10), desde 1 hasta 10^8 (Ganoza *et al.* 2006) con agua de chorro.
- j. A partir de la concentración de células/mL obtenidas después de la cuantificación de la solución madre de leptospiras, se calculó la concentración de células/mL en cada dilución realizada.
- k. Luego de haber realizado la cuantificación y las diluciones, todos los viales fueron incubados a 56 °C por 30 minutos para inactivar las bacterias (Viriyakosol *et al.* 2006).
- l. Todos los tubos fueron guardados a -20 °C hasta su utilización.

- m. Luego de haber trabajado se procedió a limpiar todo el material y el lugar de trabajo con cloro 10% y etanol al 70%. La campana luego de haber sido desinfectada con etanol, se dejó con luz UV por 15 minutos.
- n. Todos los materiales contaminados fueron colocados en un recipiente con cloro puro y se dejaron reposar por 10 minutos, luego se introdujeron en un recipiente con etanol al 70% por 10 minutos y finalmente se lavaron con abundante agua en el lavadero y fueron descartados en la basura.
- o. Los desechos bioinfecciosos fueron colocados en un descarte para desechos bioinfecciosos. El recipiente fue sellado y enviado para su incineración a la empresa ECOTERMO.

2. Extracción de ADN

a. Soluciones

- 1) Buffer de lavado L2: disolver 12.1 g de Tris en 800 ml de agua destilada. Agregar 8.1 ml 12N de HCl. Ajustar a 1 L con agua destilada. pH 6.4.
- 2) Buffer de lisis L6: Agregar 22 ml de EDTA 0.2 M, pH 8.0, y 2.6 g de Tritón X-100 a 1 L de Buffer L2.
- 3) 0.2 M EDTA, pH 8.0: disolver 37.2 g de EDTA y 4.4 g de NaOH en agua destilada en un volumen total de 500 ml de agua destilada.

b. Extracción de ADN

- 1) Se eliminó el agua sobrenadante de cada muestra obtenida de 1 L y se extrajo una alícuota de 100 mL tratando de obtener todos los sedimentos del recipiente de la muestra.
- 2) Se centrifugó cada tubo con la muestra a 10,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente (Ganoza *et al.* 2006).
- 3) Se eliminó el agua sobrenadante de la muestra y se obtuvo un volumen final de 4 mL en un vial estéril de 2 mL (2 mL de muestra por vial).

- 4) Se centrifugó cada tubo con la muestra a 10,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Se descartó el sobrenadante hasta que se obtuvo 1 mL en el vial.
- 6) Se colocó 100 μ L de muestra en un vial estéril y se agregó 900 μ L de buffer de lisis L6, se agitó en vórtex y luego se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 7) Se centrifugó por 5 minutos a 10,000 g y se descartó el sobrenadante.
- 8) Se agregó 500 μ l de buffer de lavado L2.
- 9) Se centrifugó por 2 minutos a 10,000 g y se descartó el sobrenadante.
- 10) Se repitió los pasos 8 y 9 dos veces.
- 11) Se lavó el botón de precipitado del fondo dos veces con 1 ml de etanol. Se centrifugó por 2 minutos a 10,000 g.
- 12) Se lavó el botón de precipitado del fondo una vez con 1 ml de acetona. Se centrifugó por 2 minutos a 10,000 g.
- 13) Se secó el botón de precipitado del fondo por 10 min a temperatura ambiente.
- 14) El ADN fue eluido con 125 μ l de agua destilada estéril.
- 15) Se centrifugó por 2 min a 10 000 g.
- 16) Se colectaron 100 μ l del sobrenadante con una micropipeta y se utilizó de 10–30 μ l para la reacción de PCR, esto solo cuando la muestra fue analizada inmediatamente.
- 17) Cuando la muestra fue analizada luego, se re suspendió el precipitado en 1 mL de buffer TE y se guardó a -20 °C hasta su utilización (OMS 2003).

3. Amplificación por PCR

El PCR fue realizado de acuerdo a Gravekamp *et al.* 1993, Bal *et al.* 1994 y Ganoza *et al.* 2006; con algunas modificaciones que se detallarán a continuación.

a. Soluciones

- 1) Buffer estándar de reacción, 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Tritón X-100. (Merck).
- 2) Taq ADN polimerasa, 500 u/μL (Gene Choice ®, CLP).
- 3) Master Mix completo para Taq ADN polimerasa, 1.1X, 1.5 mM MgCl₂, para 100 reacciones (Gene Choice ®, CLP).
- 4) Solución 25 mM MgCl₂ (Gene Choice ®, CLP).
- 5) Mezcla de dNTP's, 50 mM, 8x500ul (Gene Choice® nucleotides, CLP).

b. Cebadores y tamaño del producto amplificado por PCR. Para la amplificación de las cepas de *Leptospira* de las especies patógenicas *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, y *L. meyeri* (sólo cepa ICF) (Bal *et al.* 1994), se utilizaron los siguientes pares de cebadores:

- 1) Cebador G1 (Integrated DNA Technologies, IDT) : 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3'
- 2) Cebador G2 (IDT): 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG -3'
 - i. Tamaño de producto amplificado: 285 pb.
 - ii. Gen amplificado: *secY* y *flaB* (Gravekamp *et al.* 1993).

¹Para la amplificación de la cepa de *Leptospira* de la especie patógena *L. kirschneri* (Bal *et al.* 1994), se utilizaron los siguientes pares de cebadores:

- 3) Cebador B64I (IDT): 5'-ACT AAC TGA GAA ACT TCT AC-3'
- 4) Cebador B64II (IDT): 5'-TCC TTA AGT CGA ACC TAT GA-3'
 - i. Tamaño de producto amplificado: 563 pb.
 - ii. Gen amplificado: *secY* y *flaB* (Gravekamp *et al.* 1993).

¹ No se logró obtener una cepa control positivo para este par de cebadores. Sin embargo se utilizaron durante el estudio para obtener una posible amplificación en las muestras.

Para la amplificación de las cepas de *Leptospira* de las especies patógenicas, patógenicas intermedias y cepas relacionadas a especies patógenicas, *L. alexanderi* serovares Manhoa3; *L. interrogans* serovares icterohaemorrhagiae y canícola; *L. borgpetersenii* serovares ballum, hardjo/hardobovis y balcánica; *L. kirschneri* serovar cynopteri; *L. weilii* serovares celledoni, ecochallenge, sarmin, worsfold y celledoni; *L. noguchii* serovares fortbragg y panamá; *L. santarosai* serovares shermani y atlantae; *L. fainei* serovar hurstbridge; *L. inadai* serovares aguarana, kaup, y lyme (Ganoza *et al.* 2006), se utilizaron los siguientes pares de cebadores:

- 5) Cebador lepto16S11f (IDT): 5'-GGC GGC GCG TCT TAA ACA TGC-3'
- 6) Cebador lepto16S1338r (IDT): 5'-TGT GTA CAA GGT CCG GGA AC-3'
 - i. Tamaño de producto amplificado: 1200 pb.
 - ii. Gen amplificado: *ADNr16S* (Ganoza *et al.*2006).

Como control interno se realizó la amplificación del gen conservado ADNr 16S para la mayoría de bacterias comprendidas dentro del dominio Bacteria (Mangala *et al.* 2002). Se utilizaron los siguientes pares de cebadores:

- 7) Cebador UPBf (IDT) : 5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'
- 8) Cebador UPBr (IDT): 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTAATCCTGTT-3'
 - i. Tamaño de producto amplificado: 466 pb.

Como control para este par de cebadores, se llevó a cabo la amplificación de una cepa de *E. coli* en cultivo obtenida del cepario del laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, la cual fue tratada con el mismo protocolo de extracción de ADN descrito anteriormente.

c. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mezcla de reacción para el PCR se realizó para un volumen final de 50 μ L y se realizó como sigue, independientemente del par de cebadores que fueron utilizados:

1) En viales de 1.6 mL se agregaron los siguientes reactivos:

Cuadro 8. Mezcla de reacción para amplificación por PCR.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	n= 1
Agua para PCR			23.3 µL
Buffer	10 X	1 X	5.0 µL
MgCl ₂	25 mM	25 mM	6.0 µL
dNTP's	12.5 mM	25 mM	4.0 µL
Cebador delantero	100 pmol/ µL	100 µM	0.5 µL
Cebador reverso	100 pmolM/µL	100 µM	0.5 µL
Taq ADN polimerasa	5 u/ µL	5 u/ µL	0.2 µL
ADN			10 µL
Volumen final		50 µL	

(OMS 2003).

- 2) A todos los tubos se les agregó dos gotas de aceite mineral estéril con micropipeta (OMS 2003).
- 3) Se realizó la mezcla de reacción en una bandeja con hielo todo el tiempo y en una campana desinfectada. Se utilizaron las siguientes muestras experimentales y grupos control:
 - a) Control negativo: Mezcla de reacción más ADN de *L. samaranga* Patoc I.
 - b) Blanco: mezcla de reacción sin ADN, agregar 10 µL de agua para PCR.
 - c) Control positivo: Mezcla de reacción más ADN de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae.
 - d) Muestra: Mezcla de reacción con el ADN extraído previamente de las muestras de agua. Esta muestra fue amplificada con el par de cebadores G1/G2 en un tubo de reacción. En otro tubo de reacción fueron amplificadas igualmente con el par de cebadores Ba64I/Ba64II. En otro tubo de reacción la muestra también fue amplificada con el par de cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r.
 - e) Control interno: para confirmación de amplificación de las muestras, se utilizó como control interno el ADNr 16S de las bacterias de la microbiota presente en las muestras de agua. La muestra de agua fue amplificada con los cebadores UPBf y UPBr en un tubo de reacción adicional a las

reacciones de PCR realizadas con los cebadores G1/G2, Ba64I/Ba64II Y Lepto16S11f/Lepto16S1338r.

4) Se prepararon todos los tubos de control y muestras en tubos Eppendorf debidamente rotulados y fueron llevados a un termociclador (MJ Research, Inc. PTC-100TM Programmable Thermal Controller) con el siguiente programa para los cebadores G1/G2 y B64I/B64II:

- a) 10 minutos a 94 °C para desnaturalización.
 - b) 94 °C- 1.30 minutos.
 - c) 50 °C- 1 minuto.
 - d) 72 °C- 2 minutos.
 - e) 72 °C-10 minutos.
 - f) 4 °C-tiempo indefinido.
- } 34 ciclos

5) Se utilizó el siguiente programa para los cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r

- a) 5 minutos a 95 °C para desnaturalización.
 - b) 94 °C- 1 minuto.
 - c) 60 °C- 1 minuto.
 - d) 72 °C- 2 minutos.
 - e) 72 °C-10 minutos.
 - f) 4 °C-tiempo indefinido.
- } 35 ciclos

6) Se utilizó el siguiente programa para los cebadores UPBf/UPBr

- a) 10 minutos a 95 °C para desnaturalización.
 - b) 95 °C- 0.30 minuto.
 - c) 60 °C- 1 minuto.
 - d) 72 °C- 2 minutos.
- } 35 ciclos

- e) 72 °C-10 minutos.
- f) 4 °C-tiempo indefinido.

4. Visualización de producto amplificado por PCR en gel de agarosa

a. Soluciones:

- 1) TAE 50X: Se colocaron 242 g de Tris base en un recipiente, se adicionó 500 mL de agua destilada y se agregó 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL EDTA 0.5 M. Se aforó hasta 1 L.
- 2) TAE 1X: en un balón aforado de 1 L se colocaron 20 mL de TAE 50X y se aforó hasta llegar a 1 L.

b. Electroforesis

- 1) Se prepararon 40 mL de un gel de agarosa al 2.0 % (Biorad ®) en TAE 1 X.
- 2) Se disolvió la agarosa en TAE 1 X en baño de María.
- 3) Se dejó reposar la agarosa 5 minutos para enfriar.
- 4) Se volcó la solución en la bandeja de geles hasta que gelificó.
- 5) Se ubicó el gel en la cámara electroforética (Biorad, Mini-Sub® Cell GT) en posición correcta. Se llenó la cámara con 400 mL de buffer TAE 1 X hasta que se cubrió el gel.
- 6) Se preparó el ADN para el gel agregando 1 µL de buffer de carga para 5µL de ADN amplificado.
- 7) Se cargó 6 µL del ADN en el gel utilizando una punta de micropipeta de 0.5- 1.0 µL. En el primer pozo se colocó un marcador molecular de 1000 pb (Gene Choice ®, CLP). En el segundo pozo se colocó el control positivo, en el siguiente pozo se colocó el control negativo, en el siguiente pozo se colocó un control positivo para el control interno, en el siguiente pozo se colocó un blanco y en los siguientes pozos se colocaron las muestras. Para cada muestra se utilizaron cuatro pozos consecutivos al pozo donde se

coloco el blanco. En el primer pozo de muestra se colocó la muestra amplificada por el par de cebadores G1/G2, en el segundo pozo se colocó la muestra amplificada con los cebadores B64I/B64II, en el tercer pozo se colocó la muestra amplificada con los cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r, y en el último pozo se colocó la muestra amplificada con los cebadores de control interno UPBr/UPBf. En los pozos posteriores se fueron colocando en el mismo orden el resto de muestras. Cuando una muestra quedaba incompleta para las cuatro reacciones de amplificación mencionadas, se procedía a colocar la reacción de muestra faltante en el primer pozo de la segunda hilera de pozos del gel, luego de haber colocado los controles y blancos.

- 8) Se corrió el gel por 120 minutos a 100 mV en una fuente de poder (Biorad, PowerPac Basic™).
- 9) Cuando el gel termino de correr, se retiró el TAE 1X y se colocó el gel en una cámara oscura con 400 mL de solución de bromuro de etidio 625 ng/mL (Gene Choice®, CLP) por 5 minutos.
- 10) Se sacó el gel de la solución de bromuro de etidio y se colocó en una cámara con agua destilada por 5 minutos para desteñirlo.
- 11) El gel fue observado bajo un transiluminador de luz UV (Biodoc-it UV Imaging System).
- 12) La solución de bromuro de etidio se guardó en un recipiente cubierto con papel aluminio para ser utilizado nuevamente. El agua utilizada para desteñir el gel fue desechada en un recipiente rotulado con carbón activado y posteriormente se desechó en el lavadero dejando purgar el chorro de agua por 10 minutos.
- 13) Luego de haber observado el gel, este se descartó en un beaker de desecho conteniendo carbón activado. Cuando el recipiente se llenó de geles, se agregó más carbón activado y se procedió a colocar el beaker a calentar en una estufa cubierta con papel aluminio para evitar contaminación. Cuando todo el gel se disolvió se dejó solidificar. La masa solidificada fue desechada en una bolsa ziploc sellada y fue descartada en el basurero. Todo

el procedimiento mencionado que involucró contacto de bromuro de etidio fue realizado con doble par de guantes.

- 14) Una electroforesis se corrió para la curva estándar realizada con la cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae y otras electroforesis fueron corridas a las muestras posteriormente.

5. Análisis estadístico. El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del programa CIA (Confidence Interval Analysis). Para el análisis de la positividad de positividad de las muestras entre municipios del departamento de Escuintla, se realizó un análisis paramétrico por medio del coeficiente de correlación de Spearman, asumiendo que los datos obtenidos presentaban una distribución aproximadamente normal. También se hizo una prueba de significancia para la correlación de Spearman. Por otro lado, se obtuvo los promedios y desviaciones estándar para los datos de pH y temperatura de cada muestra obtenida, asumiendo una distribución normal de los mismos. El tamaño de la muestra fue obtenido con el calculador estadístico Open-Epi, presente en línea (<http://www.openepi.com/menu/openEpiMenu.htm>).

6. Mapeo. Todos los muestreos con su ubicación por GPS, resultados y otros datos encontrados en los lugares de muestreo fueron tabulados en una tabla en el programa EXCEL y se enviaron al Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica (SIG) y sensores remotos de la Universidad del Valle de Guatemala, para su ubicación en un mapa geográfico del departamento de Escuintla, Guatemala.

V. RESULTADOS

A. Muestreo

De un total de 48 fichas epidemiológicas para casos sospechosos de Leptospirosis, tomando en cuenta los criterios de selección mencionados en la sección de materiales y métodos; se obtuvo una muestra total de 23 fichas disponibles. Para un nivel de confianza del 95 % el tamaño de la muestra calculado fue de $n=22$. En el Cuadro 18 en el anexo 5 puede apreciarse el tamaño de la muestra calculado para varios niveles de confianza.

Se muestrearon en total 22 fichas epidemiológicas. Una de las fichas fue eliminada, debido a que la persona no deseó participar en el estudio. En el cuadro anterior se observa que aún con 22 fichas como muestras, el estudio tiene un nivel de confianza de al menos 97 %. En total se tomaron 24 muestras de agua, en todas las direcciones reportadas por las fichas epidemiológicas se obtuvo una sola muestra de agua que represento la única fuente de agua con la cual el entrevistado en el sitio de muestreo tenía un contacto cotidiano. Sin embargo, en uno de los puntos de muestreo se obtuvo tres muestras de agua representando tres tipos de fuentes de agua a las que tenía acceso cotidiano el entrevistado, estas se tomaron como submuestras para el sitio de muestreo, dando en total la recolección de 22 muestras y 2 submuestras. En el cuadro 9 puede observarse el número total de casos sospechosos que representa cada uno de los municipios muestreados de Escuintla.

Cuadro 9. Casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en los municipios de Escuintla, Guatemala.

Municipios que presentaron casos sospechosos para Leptospirosis	No. Casos sospechosos para Leptospirosis
Puerto San José	10
Tiquisate	4
Escuintla	2
La Democracia	1
Siquinalá	1
Masagua	1
Santa Lucía Cotzumalguapa	1
San Vicente Pacaya	1
Palín	1
Total	22

El municipio con mayor frecuencia de casos sospechosos para Leptospirosis para los años 2005 al 2007, fue el municipio del San Jose, siguiéndole Tiquisate y Escuintla, el resto de municipios mostraron una baja frecuencia. En los cuadros 10 y 11 se muestra la distribución por género y edad para el total de casos sospechosos de Leptospirosis en varios municipios de Escuintla.

Cuadro 10. Distribución de casos sospechosos por género para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en los municipios de Escuintla, Guatemala.

Municipio	Casos	Distribución de casos por género	
		Femenino	Masculino
Puerto San José	10	5	5
Tiquisate	4	2	2
Escuintla	2	---	2
La Democracia	1	---	1
Siquinalá	1	---	1
Masagua	1	---	1
Santa Lucía Cotzumalguapa	1	---	1
San Vicente Pacaya	1	1	---
Palín	1	1	---
Total (porcentaje)	22 (100%)	9 (40.90%)	13 (59.09%)

En el cuadro mostrado anteriormente puede observarse la distribución por generos observada para los casos sospechosos para Leptospirosis en distintas regiones de

Escuintla. Un 59.09% del total de los casos sospechosos de Leptospirosis son casos pertenecientes a personas del genero masculino, mientras que se obtuvo un 40.90% del total de los casos sospechosos de Leptospirosis para personas del genero femenino. No se evaluó en ningún momento factores de riesgo entre la adquisición de Leptospirosis a través del agua y la diferencia de género de los pacientes sospechosos para Leptospirosis.

Cuadro 11. Distribución de casos sospechosos por edad para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en los municipios de Escuintla, Guatemala.

Municipio	Casos	Distribución de casos por edad			
		De 0-20 años	De 21-40 años	De 41-60 años	De 61-80 años
Puerto San José	10	3	4	3	---
Tiquisate	4	1	1	---	2
Escuintla	2	1	---	1	---
La Democracia	1	1	---	---	---
Siquinalá	1	---	1	---	---
Masagua	1	1	---	---	---
Santa Lucía	1	1	---	---	---
Cotzumalguapa					
San Vicente	1	---	---	1	---
Pacaya					
Palín	1	1	---	---	---
Total (porcentaje)	22 (100%)	9 (40.90%)	6 (27.27%)	5 (22.72%)	2 (9.09%)

En el cuadro mostrado anteriormente puede observarse la distribución por edades observada para los casos sospechosos para Leptospirosis en distintas regiones de Escuintla. Del total de casos sospechosos, la mayor incidencia de Leptospirosis la presentaron pacientes comprendidos entre las edades de 0-20 años, mostrando un porcentaje total de un 40.90% en comparación al numero total de casos sospechosos obtenidos por municipios de Escuintla. También se puede observar que el municipio de San Jose cuenta con mayor número de casos sospechosos de Leptospirosis comprendidos entre los 21-40 años de edad. Para el resto de municipios con casos sospechosos de Leptospirosis no hubo mayor diferencia en la distribución de casos por edad, ya que eran los municipios que mostraban menor cantidad de incidencia de casos sospechosos de Leptospirosis. No se realizó un análisis de factores de riesgo sobre la adquisición de Leptospirosis y la distribución de edad para los casos sospechosos de Leptospirosis debido a la poca cantidad de datos obtenidos.

Un 59.09% del total de los casos sospechosos de Leptospirosis son casos pertenecientes a personas del genero masculino, mientras que se obtuvo un 40.90% del total de los casos sospechosos de Leptospirosis para personas del genero femenino. No se evaluó en ningún momento factores de riesgo entre la adquisición de Leptospirosis a través del agua y la diferencia de género de los pacientes sospechosos para Leptospirosis.

A cada muestra de agua tomada, se le tomó la temperatura y el pH de la fuente de muestreo. De esta manera se observó que en promedio las muestras de agua de los municipios muestreados de Escuintla, se obtuvo un pH promedio de 7.33 y una temperatura promedio de 29.91 ± 0.001 °C. En las Figuras 14 y 15 en el anexo 5, se puede observar la posición de los sitios de muestreo y el pH y temperatura que se determinó en cada sitio muestreado.

B. Encuesta

Durante la recolección de muestras, se hizo una encuesta para determinar el contacto y uso cotidiano con distintas fuentes de agua que poseía la persona entrevistada en el sitio de muestreo, las respuestas obtenidas a las cuatro preguntas realizadas pueden observarse en el Cuadro 19 y en la Figura 13 presentes en el anexo 7.

Un 55 % de las personas entrevistadas no tienen contacto con aguas superficiales ambientales según mostró la encuesta. También se observó que un 59 % de las personas entrevistadas en los sitios de muestreo consume agua entubada, un 18 % consume agua de pozo, el 13 % de los entrevistados consume agua embotellada y un 4.5 % consumía agua de río. La encuesta también mostró que de estas personas entrevistadas, un 59 % no le proporciona ningún tratamiento al agua que consume, un 32 % clora el agua, y el 4.5 % de personas entrevistadas hierve el agua.

Para determinar el contacto de los entrevistados con varios tipos de fuentes de agua se les preguntó sobre el tipo de fuente de agua que utilizan y con la cual tienen contacto

cotidiano. Un 27 % de los entrevistados dijo tener contacto con agua de pilas; también un 27 % tiene contacto cotidiano con agua de río. Un 23 % de los entrevistados hace uso y tiene contacto con agua de pozo, un 18 % de los entrevistados tiene contacto con otros tipos de fuentes de aguas distintas a las mencionadas. Por último, de los entrevistados, un 4.5 % tiene contacto con agua de chorros municipales y ninguno de los entrevistados acude y tiene contacto con pilas municipales.

C. Curva estándar y sensibilidad de detección por PCR

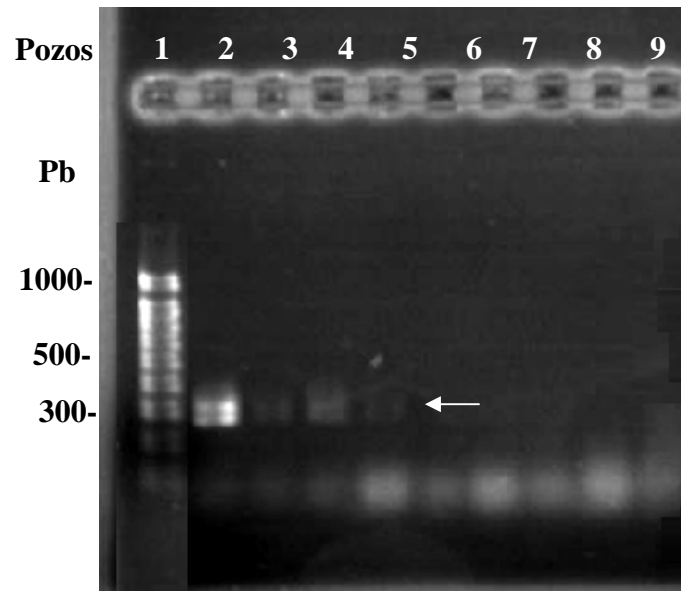
La cuantificación de células para la cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae realizada manualmente en microscopio de campo oscuro, determinó que la cantidad total de células presentes en 1 mL de solución madre de leptospiras era de 8.8×10^8 células/mL. Las concentraciones de células/mL para cada dilución seriada realizada se observan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Concentración total de células de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae en diversas diluciones seriadas realizadas.

Dilución	Concentración (células/mL)
Solución madre	8.8×10^8
1×10^0	8.8×10^7
1×10^{-1}	8.8×10^6
1×10^{-2}	8.8×10^5
1×10^{-3}	8.8×10^4
1×10^{-4}	8.8×10^3
1×10^{-5}	8.8×10^2
1×10^{-6}	8.8×10^1
1×10^{-7}	8.8×10^0

En el cuadro anterior se observa la concentración de células/mL de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae con las cuales se evaluó la sensibilidad del PCR para la amplificación de la bacteria utilizando el par de cebadores G1/G2; y visualizando los resultados por medio de un procedimiento de electroforesis en gel de agarosa al 2 %. En la Figura 4 se observa el límite de detección del PCR para la curva estándar realizada con los cebadores mencionados.

Figura 4. Límite de detección por medio de PCR para la curva estándar realizada con la cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae



A. El producto de la amplificación por medio de los cebadores G1/G2 corresponde a una banda de 285 pb. La flecha indica la última banda visualizada y el producto de la amplificación. **B.** Pozo 1: marcador molecular 100-1000pb (CLP, Gene Choice ®); pozo 2: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 solución madre con concentración 8.8×10^8 células/mL; pozo 3: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^0 con concentración 8.8×10^7 células/mL; pozo 4: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^{-1} con concentración 8.8×10^6 células/mL; pozo 5: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^{-2} con concentración 8.8×10^5 células/mL; pozo 6: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^{-3} con concentración 8.8×10^4 células/mL; pozos 7: control positivo (cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae) amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^{-1} con concentración 8.8×10^3 células/mL; pozos 8: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^{-4} con concentración 8.8×10^2 células/mL; pozo 9: cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae amplificada con cebadores G1/G2 dilución 1×10^{-5} con concentración 8.8×10^1 células/mL.

Como se puede observar en la electroforesis de agarosa realizada para evaluar el límite de detección del PCR para la detección de especies patogénicas de *Leptospira*, en este caso la cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae; el PCR detectó hasta una dilución $1 \cdot 10^{-2}$ correspondiente a una concentración de $8.8 \cdot 10^5$ células/mL.

No se llevó a cabo una evaluación del límite de detección del PCR para la amplificación con los cebadores B64I/B64II, debido a que estos sólo amplifican *L. kirshneri* y no se logró obtener una cepa de esta especie de bacteria como se mencionó anteriormente en la sección de materiales y métodos. Para el par de cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r sí se hizo una amplificación para la cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. Sin embargo, sólo se detectó la solución madre de leptospiros correspondiente a $8.8 \cdot 10^8$ células/mL (datos no mostrados).

D. Amplificación por cebadores

Se utilizaron dos pares de cebadores para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. No se tomó en cuenta los resultados obtenidos con el par de cebadores B64I/B64II, debido a la falta de un control positivo de *L. kirshneri*. Adicionalmente, se utilizó un par de cebadores (UPBr/UPBf) para la amplificación de la microbiota normal de las muestras de agua como control interno de todo el protocolo de detección para las especies patogénicas de *Leptospira*. En el Cuadro 13, puede observarse la frecuencia de amplificación de cada uno de los distintos pares de cebadores utilizados en el estudio. A continuación se detallan las especies y serovares de *Leptospira* spp. que amplifican los cebadores utilizados en este estudio.

1. Cebadores G1/G2 para la amplificación de una banda de 285 pb para las especies: *L. interrogans*, *L. borgepetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, y *L. meyeri* solo cepa ICF.
2. Cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r para la amplificación de una banda de 1200 pb para las especies: *L. alexanderi* serovares Manhoa3; *L. interrogans* serovares icterohaemorrhagiae y canicola; *L. borgepetersenii* serovares ballum,

hadrjo/harjobovis y balcánica; *L. kirschneri* serovar cynopteri; *L. weilii* serovares celledoni, ecochallenge, sarmin, worsfold y celledoni; *L. noguchii* serovares fortbragg y panamá; *L. santarosai* serovares shermani y atlantae; *L. fainei* serovar hurstbridge; *L. inadai* serovares aguarana, kaup y lyme.

3. Cebadores UPBr/UPBf, controles universales para la amplificación de una banda de 466 pb para los microorganismos miembros del dominio Bacteria.

Cuadro 13. Porcentaje total de muestras amplificadas por los cebadores utilizados para control interno y para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en muestras de agua provenientes de fuentes de agua de casas de casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005-2007 para varios municipios del departamento de Escuintla.

Pares de cebadores	Muestras amplificadas	Muestras no amplificadas	Total de muestras	Porcentaje de amplificación
G1/G2	4	20	24	16.66%
Lepto16S11f/Lepto16S1338r	1	23	24	04.17%
UPBr/UPBf	24	0	24	100.0%

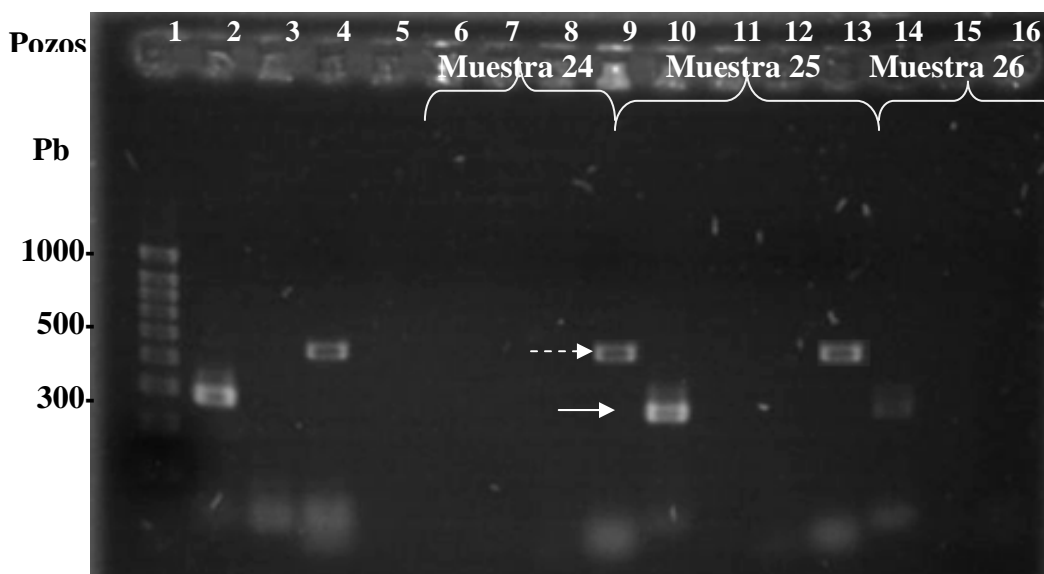
Cebadores utilizados: cebadores G1/G2 para la amplificación de *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, y *L. meyeri* solo cepa ICF. Cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r para la amplificación de *L. alexanderi* serovares Manhoa3; *L. interrogans* serovares icterohaemorrhagiae y canicola; *L. borgpetersenii* serovares ballum, hadrjo/harjobovis y balcánica; *L. kirschneri* serovar cynopteri; *L. weilii* serovares celledoni, ecochallenge, sarmin, worsfold y celledoni; *L. noguchii* serovares fortbragg y panamá; *L. santarosai* serovares shermani y atlantae; *L. fainei* serovar hurstbridge; *L. inadai* serovares aguarana, kaup y lyme. Cebadores UPBr/UPBf, controles universales para la amplificación de miembros del dominio Bacteria.

El cuadro mostrado anteriormente detalla el número de muestras que amplifiqué cada cebador utilizado y la frecuencia de amplificación. Es importante mencionar que como control positivo de toda la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. solo se utilizó la cepa de *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae para ambos pares de cebadores utilizados. El par de cebadores con mayor frecuencia de amplificación fueron los cebadores UPBr/UPBf que se utilizaron como control interno, demostrando que todas las muestras analizadas poseían ADN de bacterias presentes en la microbiota normal del agua. Además se logró detectar la presencia de alguna especie patogénica de *Leptospira* spp. amplificable por el par de cebadores G1/G2 correspondiente a un 75% de amplificación para el total de muestras positivas.

E. Detección de especies patogénicas de *Leptospira*

Durante el análisis molecular de las muestras realizadas, los resultados fueron visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2 %. Como se mencionó en la sección anterior, todas las muestras amplificaron positivamente para el control interno de la reacción, demostrando la presencia de ADN bacteriano en todas las muestras. Utilizando el par de cebadores G1/G2, se logró la amplificación específica de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en 4 muestras de agua (ver Cuadro 12 y Figura 6). Los resultados obtenidos por electroforesis de estas muestras puede observarse en las Figuras 7, 8 y 9. En estas figuras también puede apreciarse las bandas amplificadas como control interno de cada muestra.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. amplificadas con los pares de cebadores G1/G2 (amplificación de especies patogénicas de *Leptospira* spp), Lepto16S11f/Lepto16S1338r (amplificación de especies patogénicas intermedias de *Leptospira* spp.) y UPBr/UPBf (amplificación del dominio Bacteria).



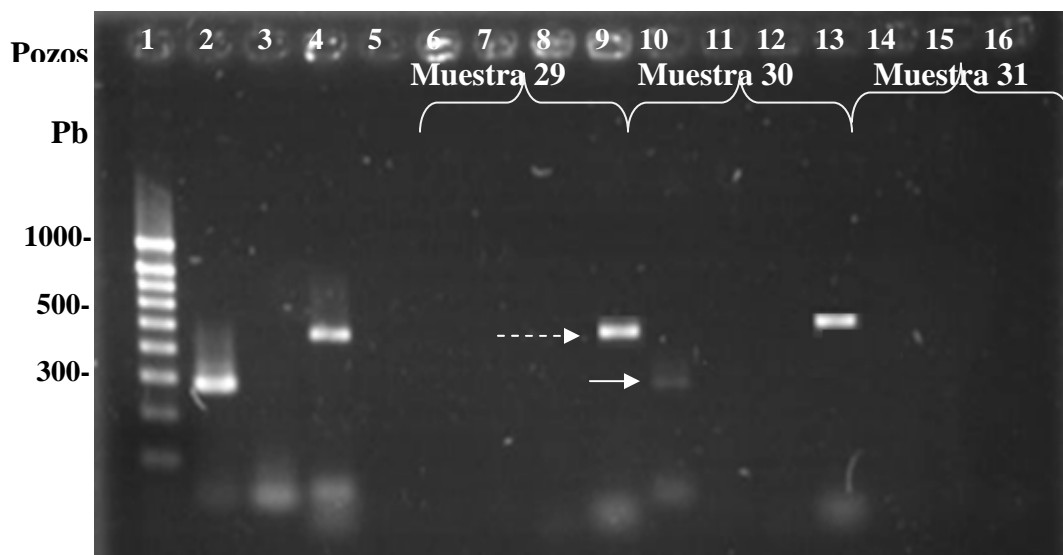
A. Las flechas indican la banda de 285 pb amplificados por los cebadores G1/G2. La flecha punteada indica la amplificación de una banda de 466 pb amplificados por los cebadores UPBr/UPBf. **B.** Pozo 1: marcador molecular 100-1000pb (CLP, Gene Choice ®); pozo 2: control positivo (cepa *L. interrogans* serovar

icterohaemorrhagiae) amplificada con cebadores G1/G2; pozo 3: control negativo (cepa *L. samaranga* Patoc I) amplificada con cebadores G1/G2; pozo 4: control positivo de control interno (*E. coli*) amplificado con cebadores UPBr/UPBf; pozo 5: blanco (mezcla de reacción y agua), pozos 6,10 y 14: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores G1/G2; pozos 8,12 y 16: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r; pozos 10 y 13: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores UPBr/UPBf.

En la figura anterior se observa la detección de alguna especie patogénica de *Leptospira* spp. en la muestra 25 y en la muestra 26 que fue amplificada solamente por el par de cebadores G1/G2. Ambas muestras pertenecen a muestras de agua tomadas en el municipio del San Jose. La muestra 25 provenía de un arroyo, mientras que la muestra 26 provenía de agua de un pozo. Ambas muestras tenían un pH de 7.0 y una temperatura de 30 ± 0.05 °C. Es importante mencionar que en la figura anterior no aparece el control positivo para el par de cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r, este control fue corrido en otro gel (dato no mostrado). Por otro lado, para correr el control positivo de este par de cebadores no fue suficiente para correr los geles de muestras que se analizaron, de esta forma solo se utilizó el dato cualitativo obtenido de la amplificación del control positivo que se logro observar en uno de los primeros geles elaborados durante el estudio.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. amplificadas con los pares de cebadores G1/G2 (amplificación de especies patogénicas de *Leptospira* spp), Lepto16S11f/Lepto16S1338r (amplificación de especies patogénicas intermedias de *Leptospira* spp.) y UPBr/UPBf (amplificación del dominio Bacteria).

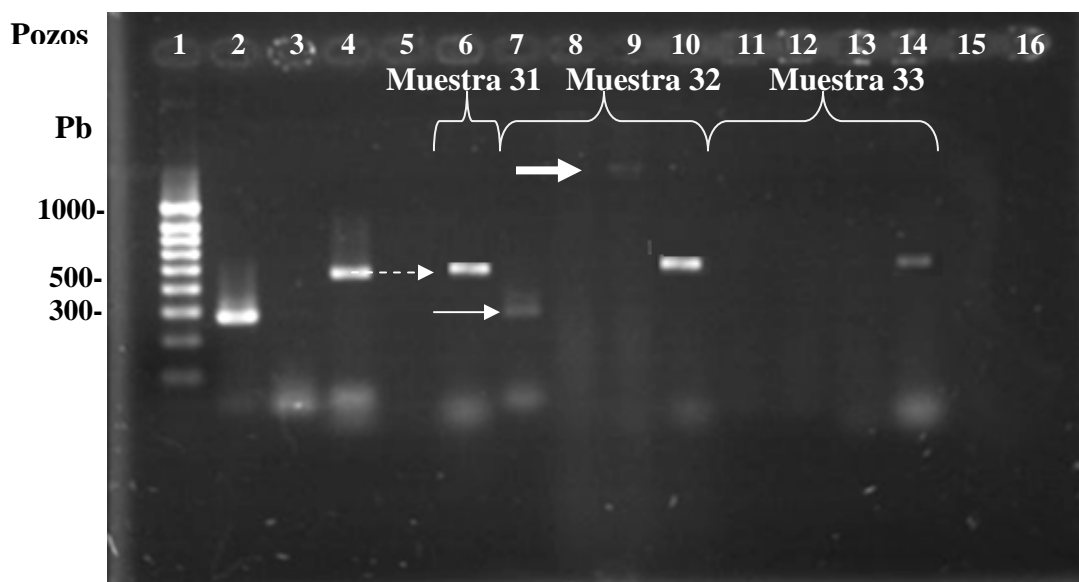
Continuación de figura 6.



A. Las flechas indican la banda de 285 pb amplificadas por los cebadores G1/G2. La flecha punteada indica la amplificación de una banda de 466 pb amplificadas por los cebadores UPBr/UPBf. **B.** Pozo 1: marcador molecular 100-1000pb (CLP, Gene Choice ®); pozo 2: control positivo (cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae) amplificado con cebadores G1/G2; pozo 3: control negativo (cepa *L. samaranga* Patoc I) amplificado con cebadores G1/G2; pozo 4: control positivo de control interno (*E. coli*) amplificado con cebadores UPBr/UPBf; pozo 5: blanco (mezcla de reacción y agua), pozos 6,10 y 14: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores G1/G2; pozos 8,12 y 16: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r; pozos 10 y 13: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores UPBr/UPBf.

En la figura anterior se observa la detección de alguna especie patológica de *Leptospira* spp. en la muestra 30 que fue amplificada solamente por el par de cebadores G1/G2. La muestra fue tomada en el municipio de Tiquisate y provenía de agua de un pozo con un pH de 6.0 y una temperatura de $26 \pm 0.05^\circ\text{C}$

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para muestras de ADN representativas obtenidas mediante el protocolo de extracción de ADN para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. amplificadas con los pares de cebadores G1/G2 (amplificación de especies patogénicas de *Leptospira* spp), Lepto16S11f/Lepto16S1338r (amplificación de especies patogénicas intermedias de *Leptospira* spp.) y UPBr/UPBf (amplificación del dominio Bacteria).



A. Las flechas no punteadas indican la banda de 285 pb amplificados por los cebadores G1/G2. La flecha gruesa indica una banda de 1200 pb amplificada por los cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r. Las flechas punteadas indican la amplificación de una banda de 466 pb amplificados por los cebadores UPBr/UPBf. **B.** Pozo 1: marcador molecular 100-1000pb (CLP, Gene Choice ®); pozo 2: control positivo (cepa *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae) amplificado con cebadores G1/G2; pozo 3: control negativo (cepa *L. samaranga* Patoc I) amplificado con cebadores G1/G2; pozo 4: control positivo de control interno (*E. coli*) amplificado con cebadores UPBr/UPBf; pozo 5: blanco (mezcla de reacción y agua estéril), pozos 7 y 11: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores G1/G2; pozos 9 y 13: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r; pozos 16, 10 y 14: ADN extraído de muestras de agua amplificadas con cebadores UPBr/UPBf.

En la figura anterior se observa la detección de alguna especie patogénica de *Leptospira* spp. en la muestra 32 que fue amplificada por el par de cebadores G1/G2 y por el par de cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r. La muestra fue tomada en el municipio de La Democracia y provenía de agua de un río con un pH de 7.0 y una temperatura de 28 ± 0.05 °C.

En el Cuadro 14 se puede observar la positividad de las muestras para especies patogénicas de *Leptospira* spp. en los distintos municipios de Escuintla que fueron muestreados.

Cuadro 14. Positividad de muestras para especies patogénicas de *Leptospira* spp. en muestras de agua provenientes de fuentes de agua en casas de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005-2007 en varios municipios de Escuintla, Guatemala.

Municipios de Escuintla muestreados	Casos sospechosos de Leptospirosis	Muestras positivas obtenidas de los casos sospechosos para Leptospirosis	Porcentaje de positividad para la presencia de especies patogénicas de <i>Leptospira</i> spp. por municipio
San José	10	2	20 %
Tiquisate	4	1	25 %
Escuintla	2	0	0 %
La Democracia	1	1	100 %
Siquinalá	1	0	0 %
Masagua	1	0	0 %
Santa Lucía			
Cotzumalguapa	1	0	0 %
San Vicente			
Pacaya	1	0	0 %
Palín	1	0	0 %
Total	22	4	18.18 %

En el cuadro anterior se observa la frecuencia de muestras positivas correspondientes a los municipios de Escuintla que fueron muestreados. Los municipios en donde se obtuvo muestras positivas corresponden a los municipios de San José, Tiquisate y La Democracia. El Municipio con mayor frecuencia de positividad de muestras fue el municipio de La Democracia, ya que la muestra tomada fue positiva para la única ficha de caso sospechoso de Leptospirosis en ese municipio. Para los municipios del San José y de Tiquisate había más números de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007. De estos casos se obtuvo al menos un 20 % para el municipio del San José y un

25 % de muestras positivas para el municipio de Tiquisate. En total, se obtuvo una positividad de un 18 % del total de muestras tomadas en todo el departamento de Escuintla.

En el cuadro 15 puede apreciarse la distribución por género y edad de las muestras que se obtuvieron positivas para los casos sospechosos de Leptospirosis muestreados por municipio en Escuintla.

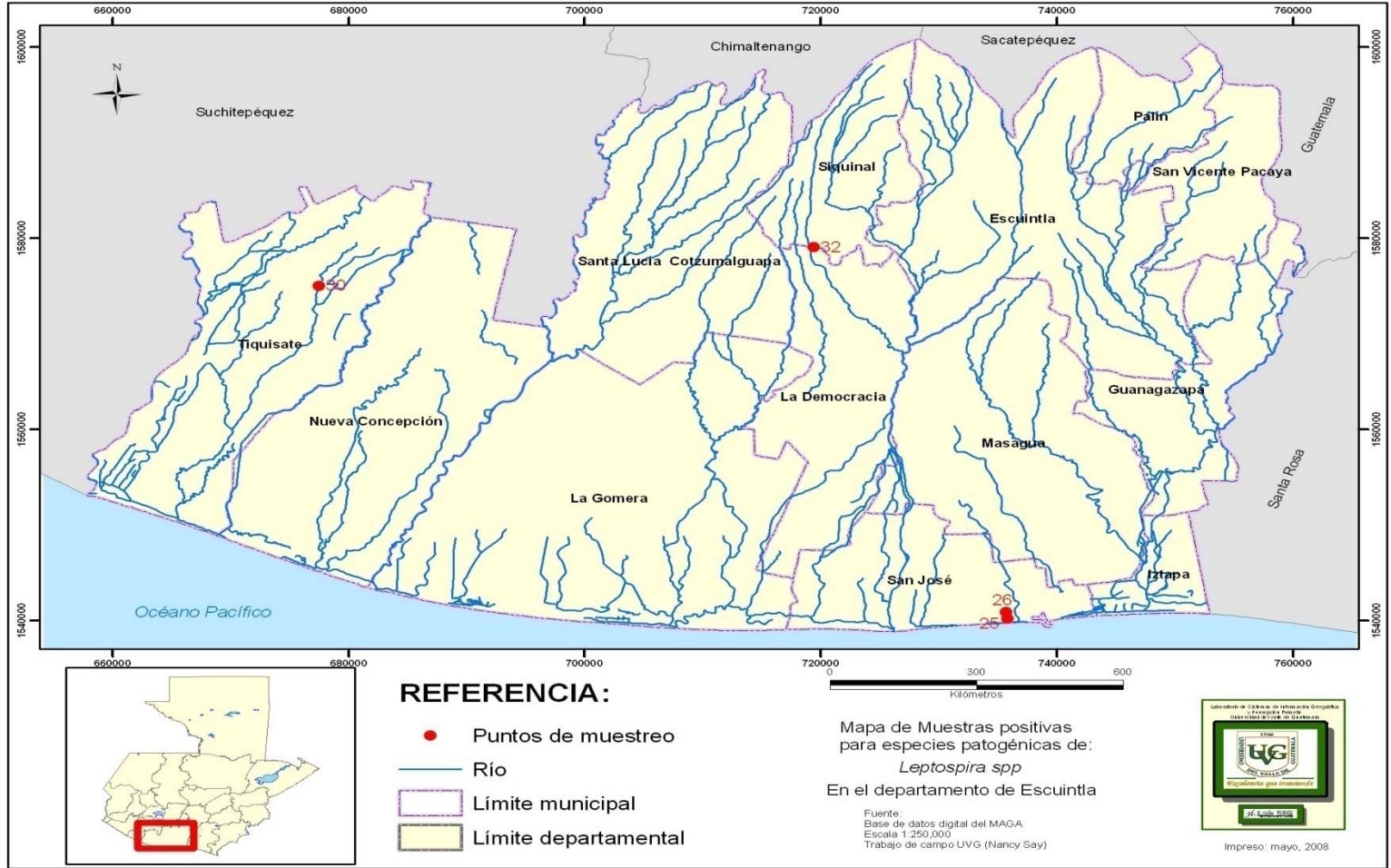
Cuadro 15. Distribución por género y edad de las muestras positivas obtenidas en distintas fuentes de agua de las casas de casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005-2007 para varios municipios muestreados del departamento de Escuintla, Guatemala.

Municipio	Casos sospechosos de Leptospirosis	Muestras positivas de los casos sospechosos para Leptospirosis	Distribución de casos por género para las muestras positivas		Distribución de casos sospechosos de Leptospirosis por edad para las muestras positivas obtenidas
			Femenino	Masculino	De 0-20 años
San José	10	2	2	---	2
Tiquisate	4	1	---	1	1
Escuintla	2	0	---	---	---
La Democracia	1	1	1	---	1
Siquinala	1	0	---	---	---
Masagua	1	0	---	---	---
Santa Lucia	1	0	---	---	---
Cotzumalguapa	1	0	---	---	---
San Vicente	1	0	---	---	---
Pacaya					
Palín	1	0	---	---	---
Total (porcentaje)	22 (100%)	4 (18.18%)	3	1	4

En el cuadro anterior se pueden observar las muestras positivas obtenidas por caso sospechoso de Leptospirosis para cada municipio muestreado de Escuintla. Para cada muestra positiva obtenida se muestra la distribución por género y edad de la casa del paciente sospechoso de Leptospirosis muestreado por municipio. Se puede observar que las dos muestras de agua positivas obtenidas para el municipio de San Jose, en ambas casas muestreadas, las personas sospechosas de Leptospirosis pertenecían al género femenino comprendidas entre los 0-20 años de edad. La única persona de género masculino comprendido también entre 0-20 años de edad de los casos sospechosos de Leptospirosis, se observó en el municipio de Tiquisate. Es interesante observar que todas las personas que representaban un caso sospechoso de Leptospirosis por municipio de Escuintla, estaban comprendidas entre los 0-20 años.

En la figura 8 puede apreciarse la localización geográfica exacta de los lugares muestreados que resultaron positivos para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en el departamento de Escuintla.

Figura 8. Distribución geográfica de muestras positivas para la presencia de especies patógenas de *Leptospira* spp. en el departamento de Escuintla.



En la figura anterior puede apreciarse la ubicación geográfica por Sistemas de Información Geográfica (SIG) de los puntos de muestreo en donde se obtuvo muestras positivas para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. Todas estas muestras se encuentran muy cercanas a afluentes de agua que se ramifican de un río principal del departamento.

F. Análisis Estadístico

El cálculo del coeficiente de correlación de Spearman (r_s) entre la positividad de las muestras obtenidas para especies patogénicas de *Leptospira* spp. y el número de casos sospechosos para Leptospirosis para varios municipios de Escuintla (observar Cuadro 12), puede observarse en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Coeficiente de correlación de Spearman entre la positividad de muestras de agua para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. y el número de casos sospechosos para Leptospirosis por municipio en el departamento de Escuintla, Guatemala; con un nivel de confianza del 95%.

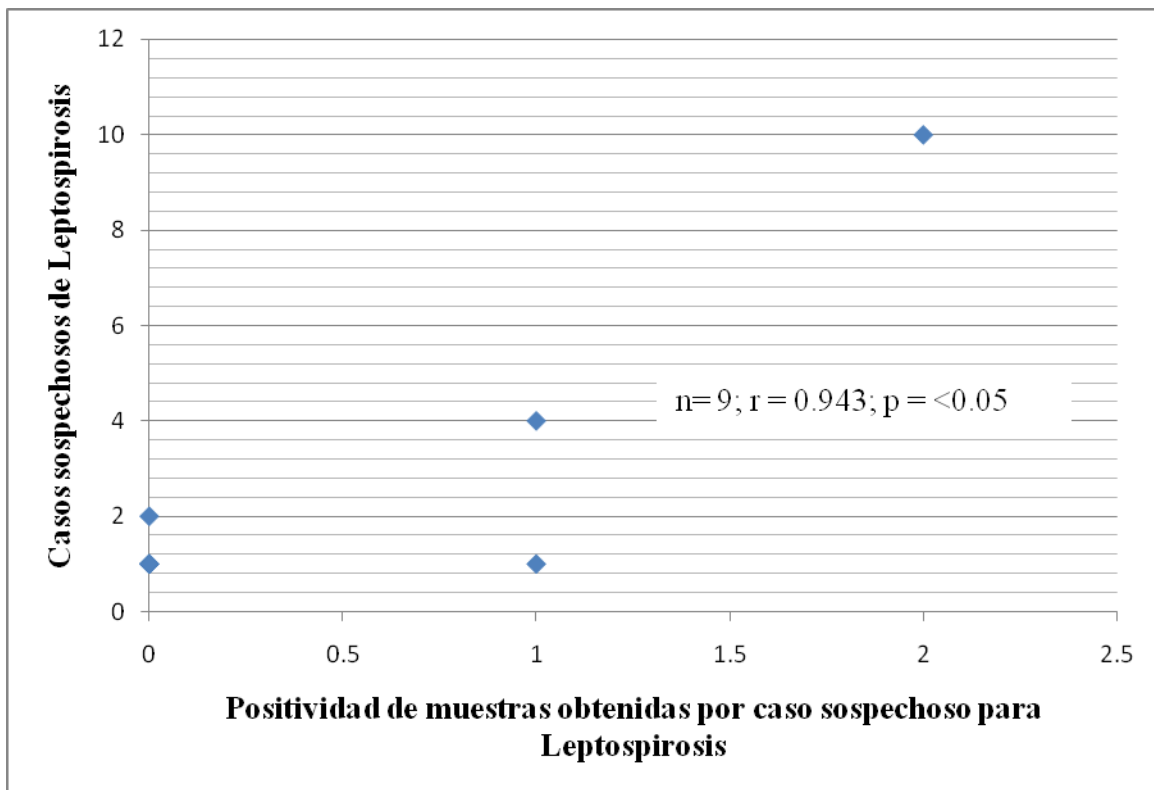
* r_s	0.663
Error estándar para el coeficiente de correlación transformado- z-	0.408
Intervalo de confianza ($p < 0.05$)	0.123; 0.900
Valor normal	1.650
n	9

*valores próximos a 1 indican una correlación fuerte y positiva. Valores cercanos a -1 indican una correlación fuerte y negativo. Valores cercanos a cero indican que no hay correlación lineal.

En el cuadro anterior se observa que se obtuvo un coeficiente de correlación de Spearman de 0.663, lo cual indica una importante correlación entre las dos variables utilizadas mencionadas anteriormente. Se obtuvo un intervalo de confianza de 0.123 a 0.900 para r_s con un nivel de confianza del 95 %.

En la Figura 12 puede observarse la distribución del coeficiente de correlación de Spearman realizado para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en el departamento de Escuintla.

Figura 9. Distribución del coeficiente de correlación de Spearman entre la positividad de muestras de agua para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. y el número de casos sospechosos para Leptospirosis por municipio en el departamento de Escuintla, Guatemala; con un nivel de confianza del 95%.



La figura anterior muestra la distribución obtenida para las muestras positivas obtenidas por casos sospechosos de Leptospirosis en los diferentes municipios de Escuintla muestreados. Se observa una buena correlación entre el número de casos sospechosos para Leptospirosis reportados por municipio y la positividad obtenida de las muestras para cada municipio de Escuintla.

Para probar la significancia de la prueba de rango de Spearman, se realizó una prueba para correlación de rango significativa. Los resultados pueden observarse en el cuadro 17.

Cuadro 17. Prueba para correlación de rango significativa con un nivel de confianza del 95% para el coeficiente de correlación de Spearman entre la positividad de muestras de agua para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. y el número de casos sospechosos para Leptospirosis por municipios en el departamento de Escuintla, Guatemala; con un nivel de confianza del 95%.

r_s	0.663
Desviación estándar	0.353
z	1.88
Error estándar para el coeficiente de correlación transformado-z-	0.408
Valor normal	1.650
α	0.05
Valor p obtenido	0.047

Se utilizó la hipótesis nula de que no había correlación de rango entre los casos sospechosos para Leptospirosis y la positividad de muestras obtenidas por municipios en el departamento de Escuintla. La hipótesis nula es rechazada ya que $z > 1.650$ y $p < 0.05$. Por lo tanto, si hay correlación entre el número de casos sospechosos por municipio de Escuintla y el número de muestras positivas encontrados por municipios.

VI. DISCUSIÓN

Como objetivo de este estudio se deseaba lograr la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en fuentes de agua superficiales ambientales y de abastecimiento en casas y lugares cercanos a las casas de pacientes sospechosos para Leptospirosis para los años 2005 al 2007 en el departamento de Escuintla, Guatemala. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, al menos un 18 % del total de las muestras fueron positivas para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. De este porcentaje, al menos un 20 % de muestras fueron positivas para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp en el municipio del San José. Se obtuvo al menos un 25 % de muestras positivas para el municipio de Tiquisate y la muestra proveniente del municipio de La Democracia fue positiva para la única ficha reportada para casos sospechosos de Leptospirosis. Se logró la detección de, al menos, un 75 % de especies verdaderamente patogénicas de *Leptospira* spp. por medio de la amplificación de muestras por los cebadores G1/G2 en cuanto al total de muestras positivas; y al menos un 25 % de las muestras positivas determinó la presencia de alguna especie de patogenicidad intermedia de *Leptospira* spp. por medio del par de cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r; este par de cebadores no amplificaron las muestras positivas obtenidas con el par de cebadores G1/G2, que también amplificaban las mismas especies. Este factor puede deberse a que la banda amplificada por el par de cebadores Lepto16S11f/Lepto16S1338r es demasiado amplia (1,200 pb) por lo que pudo darse una ineficiencia en la amplificación de este fragmento por la enzima Taq, provocando que no se detectara una banda por medio de electroforesis. Lo que se menciona no se puede comprobar, pero es probable que ocurriera durante la reacción de PCR.

Todas las muestras estaban positivas se encontraban muy cercanas a afluentes de aguas superficiales como lo demostró el mapa geográfico realizado. Estos resultados sólo son significativos para el día en que se llevó a cabo el muestreo, ya que no se colectaron las mismas fuentes por un período de tiempo consecutivo debido a falta de recursos. El muestreo periódico de las mismas fuentes de agua para la detección de la bacteria, hubiera sido más significativo para un análisis total de la epidemiología de la

Leptospirosis en Escuintla. Con un estudio de este tipo se lograría obtener mayor información sobre incidencia de la bacteria en época del año y asociación con condiciones climáticas y socioeconómicas.

Antes de lograr una amplificación y detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en las muestras de agua del departamento de Escuintla, fue necesario probar el protocolo de detección molecular desde la extracción de ADN hasta la visualización por electroforesis. Se observó que con cepas muy viejas como control positivo de *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* no se obtuvo resultados satisfactorios para la cuantificación de células, así como también no se obtuvo amplificación por PCR. Esto se observó durante la estandarización del método y probablemente se deba a que las bacterias ya están en etapa de degradación y algunas nucleasas pueden dañar el ADN que haya quedado en el medio de cultivo. Debido a este fenómeno observado, puede que en el procedimiento de detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en muestras de agua, el tiempo de vida de una muestra pueda afectar la detección. Sin embargo, todas las muestras obtenidas amplificaron para el control interno, demostrando la presencia de ADN de bacterias de la microbiota normal del agua. Esto demuestra que la especificidad de los cebadores fue bastante acertada y las muestras positivas que se obtuvieron fueron realmente significativas.

Por otro lado, durante la realización de la curva estándar para evaluar la sensibilidad del método de PCR para la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp., se observó que la sensibilidad fue bastante baja. Sólo se logró detectar una concentración de $8.8 \cdot 10^5$ células/mL de leptospirosas. Esto pudo afectar el procedimiento de detección en las muestras de agua, ya que si la concentración de leptospirosas en el agua era mucho menor que la concentración indicada, el método de PCR no pudo haberlas detectado dando como resultado muestras negativas.

El coeficiente de correlación de Spearman demostró una relación positiva entre el número de casos reportados sospechosos para Leptospirosis por municipio y la cantidad de muestras positivas. El coeficiente de Spearman se mantuvo dentro del intervalo de

confianza del 95%. De esta manera, las muestras que demostraron la presencia de alguna especie patogénica de *Leptospira* spp., son estadísticamente significativas durante este estudio, demostrando que el agua contaminada con la bacteria si es un riesgo de infección para la Leptospirosis en sitios susceptibles en el departamento de Escuintla. Mientras mas casos sospechosos de Leptospirosis se encuentren por municipio, aumenta la probabilidad de encontrar muestras positivas para la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en el area de Escuintla. Fue interesante observar que tres de las muestras positivas obtenidas en las casas de los casos sospechosos de Leptospirosis provenían de personas del genero femenino y sólo una del total de las muestras positivas provino de una persona de genero masculino. Por lo que sin ningún análisis de riesgo, puede observarse que probablemente las mujeres tienen mas contacto cotidiano con agua por lo roles que desempeñan en sus hogares. Todas las personas de los casos sospechosos de Leptospirosis de donde se obtuvo las muestras positivas de agua, se encontraban comprendidos entre los 0-20 años de edad, lo que sugiere que personas mas jóvenes tienen un mayor tipo de contacto con el agua, lo que sugiere que personas mas jóvenes tienen un mayor tipo de contacto con el agua. No se logró hacer un análisis de riesgo por medio de una análisis epidemiológico de Rango de Riesgo (Risk Ratio, RR), debido a que la encuesta que se pasó a las personas en los lugares estudiados, mostró que todas las personas estaban expuestas al contacto cotidiano con alguna fuente de agua.

Se logró observar que de las muestras que resultaron positivas, una de ellas provenía de un pozo y las otras de aguas ambientales superficiales en las casas de los casos muestreados. Con esto se logró la detección de especies patogénicas de *Leptospira* spp., en aguas de abastecimiento y en aguas superficiales ambientales en las casas de los pacientes sospechosos para Leptospirosis para los años 2005 al 2007 en el departamento de Escuintla. Con los resultados obtenidos se comprobó la hipótesis del estudio.

VII. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la presencia de tres especies patogénicas verdaderas y una especie patogénica intermedia de *Leptospira* spp. en muestras de aguas de abastecimiento y ambientales superficiales en casas de pacientes de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 del departamento de Escuintla, Guatemala.
2. Se determinó la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. en los municipios del San Jose, Tiquisate y La Democracia del departamento de Escuintla, Guatemala.
3. El método de detección para especies patogénicas de *Leptospira* spp. por PCR detectó hasta una concentración de $8.8 \cdot 10^5$ células/mL.
4. Se determinó una relación significativa entre el número de casos sospechosos para Leptospirosis por municipio de Escuintla y la presencia de especies patogénicas de *Leptospira* spp. detectadas en las muestras de agua tomadas por municipio.

VIII. RECOMENDACIONES

1. En cuanto a la metodología, se recomienda realizar el análisis a las muestras frescas que se muestreen para obtener mejores resultados. Asimismo, se recomienda ampliamente la utilización de cepas frescas como controles para evitar inconvenientes durante la realización de la optimización del protocolo antes de iniciar el análisis de muestras.
2. Para mejorar el método de detección, se recomienda realizar un cultivo de las muestras de agua en un medio de cultivo específico para *Leptospira* spp., a manera de aumentar la poca cantidad de leptospiras que puedan encontrarse en la muestra. Posteriormente se podría identificar la bacteria por PCR.
3. En cuanto al muestreo, se recomienda realizar un muestreo periódico por al menos un año para lograr reunir mejores datos sobre la epidemiología de la Leptospirosis en el departamento de Escuintla, Guatemala. Además, se recomienda tomar otros datos epidemiológicos durante la toma de muestras, como la presencia de animales infectados en las casas.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abuauada, M. C. *et al.* 2005. *Leptospirosis: presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura.* Rev. Chil. Infect. 22(1): 93 - 97.
- Ahmad, S. N. *et al.* 2005. *Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of Leptospirosis in India.* BMC Infectious Diseases. 2(13): 1 - 7.
- Bal, B. B. *et al.* 1994. *Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis.* Journal of Clinical Microbiology. (32): 1894 - 11898.
- Brendle, J. J. y Alexander, D. 1974. *Contamination of bacteriological media by Leptospira biflexa.* Applied Microbiology. 28(3): 505-506.
- Céspedes, M. *et al.* 2007. *Estandarización y validación de una prueba de PCR para el diagnóstico precoz de Leptospirosis humana.* Rev Peru Med Exp Salud Pública. 24(1): 20-26.
- Cifuentes, J. E. 2003. Informe Final del estudio de Brote de Leptospirosis, municipio Managua, Escuintla, julio 2003. En: <<http://desastres.cies.edu.ni/digitaliza/tesis/t294/secciona6.pdf>> [con acceso el 22-3-2008].
- Doern, G.V. 2000. *Detection of selected fastidious bacteria.* Clinical Infectious Diseases. (30): 166 - 173.
- Ferro, B. E. *et al.* 2006. *Seroprevalencia de infección por Leptospira en habitantes de barrios periféricos de Cali.* Biomedica. (26): 250-257.
- Ganoza, C. A. *et al.* 2006. *Determining risk for severe Leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic Leptospira.* PLoS Medicine. 3(8): 1329 - 1340.
- Gatti, M. *et al.* 2004. *Investigación de leptospiras en aguas de lagos del zoológico de La Plata, Argentina.* Analecta veterinaria. 24(1): 18 - 20.
- Gravekamp, G. *et al.* 1993. *Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers.* Journal of General Microbiology. (139): 1691 - 1700.
- Ministerio de Economía, MINECO. 2007. Departamento de Escuintla. Guatemala en: <www.mineco.gob.gt> [con acceso el 8-10-2007].

- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, MSPAS. 2008. Enfermedades de Notificación Obligatoria en: < www.mspas.gob.gt > [con acceso el 22-3-2008].
- Sistema de Información Gerencial de Salud. 2007. Ministerio de Salud Pública. Guatemala en: < www.mspas.gob.gt > [con acceso el 15-8-2007].
- Hartskeerl, R. A. *et al.* 2002. *Reunión Científica Internacional "Leptospirosis 2001" 17-18 de mayo del 2001*. Rev Cubana Med Trop. 54(1): 52 – 80.
- Hendrickson, H. 2006. *Diagram of PCR*. En: <<http://www.pitt.edu/~heh1/.com>> [con acceso el 23-5-2007]
- Henry, R.A., y R. C. Johnson. 1998. *Distribution of the genus Leptospira in soil and water*. Applied and Environmental Microbiology Newsletter. 35(3):492 - 499.
- Johnson, M.A. *et al.* 2004. *Environmental exposure and Leptospirosis*, Peru. Emerging Infectious Diseases. 10(6): 1016 - 1022.
- Levett, P.N. 2001. *Leptospirosis*. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology 14(2): 296-326.
- López, G. S. 2001. Seroprevalencia de Leptospirosis en estudiantes y catedráticos de sexto año y EPS de la Facultad de Medicina Veterinaria, USAC, en el mes de agosto del año 2001. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, Guatemala. 46 pp.
- Luchessi, P. *et al.* 2004. *Recommendations for the detection of Leptospira in urine by PCR*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 37(2): 131 - 134.
- Mangala, A. N. *et al.* 2002. *Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set*. Microbiology. 148: 257-266.
- Nascimento, A. L. *et al.* 2004. *Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis*. J. Bacteriol. 186(7): 2164 - 2172.
- National Center for Biotechnology Information. 2007. Taxonomy. Estados Unidos. En: < www.ncbi.com > [con acceso el 7-5-2007].
- Noguchi, H. 1919. *Etiology of yellow fever: VI Cultivation, Morphology, Virulence and Biological Properties of Leptospira icteroides*. J. Exp. Med. (16): 19 - 32.

- Ochoa, J. E. *et al.* 2001. *Epidemiología de la Leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria*. Revista de la Asociación Colombiana de Infectología. 5(2): 1 - 15.
- Oliveira, M. A. *et al.* 2003. *Low-stringency single specific primer PCR for identification of Leptospira*. J. Med. Bacteriol. 52(2): 127 - 135.
- Parma, A. E. *et al.* 1997. *Differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospires by means of the Polimerase Chain Reaction*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 39 (4): 203-208.
- Ríos, J. C. 1999. *Leptospirosis en Guatemala; descripción de los casos clínicos registrados como consecuencia de la tormenta tropical Mitch, Noviembre 1998 – Mayo 1999*. Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, Guatemala. 64 pp.
- Sáenz, A.C. y C. Rodríguez. 2004. *Leptospirosis en la población de la región Huetar Norte durante el período comprendido entre 1997 y 2000*. Acta méd. costarric. 46(4): 184-189.
- Scarcelli, E. *et al.* 2003. *Leptospira spp detection by Polimerase Chain Reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (Cebus paella)*. Brazilian Journal of Microbiology. (34): 143-146.
- Smythe, L. D. *et al.* 2002. *A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp*. Journal of Clinical Microbiology. 42 (8): 3575 - 3580.
- Sullivan, K. M. 2007. *Open Source Statistics for Public Health*. Open-Epi. En: <www.openepi.com>[con acceso el 31-3-2008]
- Trueba, G. *et al.* 2002. *Adaptación de Leptospira interrogans (sensu stricto) al agua dulce*. Rev. Cubana Med. Trop. 54 (1): 11 - 4.
- Trueba, G. *et al.* 2004. *Cell aggregation: a mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water*. International Microbiology. (7): 35 - 40.
- Van Eys, G. J. *et al.* 1989. *Detection of leptospires in urine by Polimerase Chain Reaction*. Journal of Clinical Microbiology. 27(10): 2258 - 2262.
- Victoria, B. *et al.* 2002. *Identificación de aislamientos de Leptospira por métodos serológicos y genéticos*. Rev Cubana Med Trop. 54(1): 48 – 51.

- Vijayakari, P. *et al.* 2004. *Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of Leptospirosis in India.* Journal of Clinical Microbiology. 42 (8): 3575 - 3580.
- Vinetz, J. M. 2005. *Symposium: A global research agenda for Leptospirosis.* J. Posgrad. Med.. 51(3): 174 - 178.
- Vitale, M. *et al.* 2005. *Polimerase Chain reaction method for Leptospirosis, analysis on samples from an autochthon seine population in Sicily, Italy.* Rev. Cubana Med. Trop. 57(1): 25 - 27.
- Malta. Organización Mundial de la Salud, OMS (World Health Organization). 2003. *Human Leptospirosis Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.* Primera edición. Department of Communicable Disease Surveillance and Control. Estados Unidos de América. 122 págs.
- Woo, T. H. S., *et al.* 1997. *Identification of pathogenic Leptospira genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR.* J. of Clinical Microbiology. 35(12): 3140 – 3146.

X. ANEXOS

A. Anexo1: Autorización para la utilización de fichas de casos sospechosos para Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en el Centro de Salud de Escuintla.

Figura 10. Carta de autorización del Área de Salud de Escuintla, Guatemala.

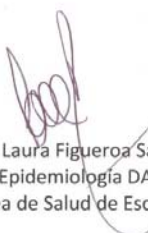
Guatemala 14 de marzo del 2008

Dra. Pamela Marie Pennington
Directora del Depto. De Bioquímica y Microbiología
Universidad del Valle de Guatemala

Estimada Dra. Pennington por este medio me permito informarle que tengo conocimiento sobre el tema de tesis "Detección molecular de *Leptospira interrogans* en aguas superficiales y de abastecimiento como factor de riesgo de Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala" de la señorita Nancy Rebeca Say Rodríguez. Estoy de acuerdo con el estudio que la Srita. Say Plantea y autorizó la utilización de fichas epidemiológicas para casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005 al 2007 en dicho tema de tesis.

Cualquier información que usted solicite comunicarse al correo dasescuintla@intelnett.com o al teléfono 77200700. Sin más que decir me despido agradeciéndole su atención.

Atentamente


Dra. Laura Figueroa Santiago
Epidemiología DASE
Área de Salud de Escuintla



B. Anexo 2. Ficha de consentimiento para análisis de *Leptospira* spp en agua.

Universidad del Valle de Guatemala
 Facultad de Ciencias y Humanidades
 Departamento de Bioquímica y Microbiología
 Tesis: Detección molecular de *Leptospira* spp patógena en aguas superficiales y de abastecimiento como factor de riesgo de Leptospirosis en Escuintla, Guatemala.

FICHA DE CONSENTIMIENTO PARA ANÁLISIS DE *LEPTOSPIRA* SPP. PATÓGENICA EN AGUA

Saludo inicial y presentación personal. Este estudio abarca el tema de tesis “Detección molecular de *Leptospira* sp. patógena en aguas ambientales superficiales y de abastecimiento como factor de riesgo de Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala”; el cual tiene como objetivo la detección de la bacteria *Leptospira* spp. Esta bacteria causa una enfermedad conocida como Leptospirosis que puede causar síntomas como fiebre, cansancio, escalofríos, dolor de cabeza, dolor de cuerpo, diarrea, hemorragias y el color de la piel y ojos puede tornarse amarillo. La bacteria *Leptospira* spp es muy común en animales, como lo son roedores y ganado, en donde la bacteria habita constantemente en la orina de los animales que se encuentren infectados. La enfermedad se adquiere por contacto directo o indirecto con animales, una de estas formas de adquirir la enfermedad es por contacto con agua. La bacteria no se transmite por beber agua, solo por contacto de piel y mucosas con agua contaminada con orina de animales infectados, la bacteria puede sobrevivir por mucho tiempo en el agua. Para usos de investigación en mi tema de tesis, deseo investigar la presencia de la bacteria *Leptospira* spp en algunas fuentes con las cuales tiene contacto todos los días.

Para fines de investigación, deseo tomar una muestra de agua con la cual usted tiene contacto diariamente. Los resultados servirán exclusivamente para la investigación del tema de tesis. Los resultados no le serán entregados y su nombre y dirección no serán publicados. ¿está usted dispuesto a participar en el estudio permitiendo tomar una muestra de agua en su casa y sus alrededores?

Por su atención muy agradecida.

Si la persona está dispuesta a colaborar con la investigación se llena la ficha a continuación, de lo contrario se agradece a la persona y la ficha se llena con el nombre de la persona y no se utiliza en el muestreo.

Fecha de llenado de la ficha: _____

Nombre y autorización: _____

Localización (GPS): _____

1. ¿Tiene contacto con agua de ríos, riachuelos, lagunas u otras fuentes de agua?

Sí _____ No _____

2. ¿Qué tipo de agua consume?

Entubada _____ De pozo _____ De río _____ Embotellada _____ Otro _____

3. ¿Qué tipo de tratamiento le da al agua?

Hierve _____ Clora _____ Nignuno _____ Otro _____

4. ¿Con qué agua se baña, lava su ropa y sus alimentos?

Río _____ Pila _____ Pozo _____ Chorro municipal _____ Pila Municipal _____

Otro _____

C. Anexo 3: formulario para revisión expedita entregado al Comité de Ética



Excelexencia que trasciende

CÓMITE DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

1. **Fecha de entrega:** 26 de febrero del 2008.
2. **Título del proyecto:** “Detección molecular de *Leptospira* sp. patogénica en aguas ambientales superficiales y de abastecimiento como factor de riesgo de Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala”.
3. **Fecha propuesta de realización:** Marzo-Abril 2008.
4. **Investigador principal:**
 - 4.1. **Nombre:** Nancy Rebeca Say Rodríguez
 - 4.2. **Profesión:** Estudiante con pensum cerrado en la carrera de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala.
 - 4.3. **Tipo de proyecto:** trabajo de tesis.
5. **Revisión solicitada:** expedita.
6. **Datos de población a estudiar:** el muestreo es de tipo no probabilístico de caso-tipo. Lo que se pretende estudiar son las fuentes de agua con las que tiene contacto un grupo de pacientes inscritos en fichas epidemiológicas desde el año 2003 al 2007 para casos sospechosos de Leptospirosis en el Centro de Salud de Escuintla, Escuintla.
7. **Preguntas sobre el diseño del estudio:** Lo que se pretende de preguntar al paciente de la ficha luego de que de su consentimiento para tomar una muestra de agua en su casa, son las preguntas siguientes:
 - 7.1. ¿Tiene contacto con agua de ríos, riachuelos, lagunas u otras fuentes de agua? (Si/No)
 - 7.2. ¿Qué tipo de agua consume? (Entubada/De pozo/De río/Embotellada/Otro)
 - 7.3. ¿Qué tipo de tratamiento le da al agua? (Hierve/Clora/Ninguno/Otro)
 - 7.4. ¿Con qué agua se baña, lava su ropa y sus alimentos? (Río/Pila/Pozo/Chorro municipal/Pila municipal/Otro)

8. Datos sobre la localización de la investigación:

El Departamento de Escuintla se encuentra situado en la Región V o Región Central del país. Limita al Norte con los departamentos de Chimaltenango, Sacatepéquez y Guatemala; al sur con el Océano Pacífico; al Este con Santa Rosa; y, al Oeste, con Suchitepéquez. La cabecera departamental se encuentra a una altura de 346.91 metros sobre el nivel mar por lo que generalmente su clima es cálido (MINECO 2007).

Escuintla se encuentra ubicado en la Región Central de la República. Se ubica en la altitud 14° y 18'03" longitud 90° 47'08" y cuenta con una extensión territorial de 4,384 kilómetros cuadrados que equivalen al 4% del territorio nacional. Limita al norte con los departamentos de Chimaltenango y Sacatepéquez, al noroeste con el departamento de Guatemala, al este con el departamento de Santa Rosa, al oeste con el departamento de Suchitepéquez y al sur con el Océano Pacífico. Su cabecera departamental es Escuintla y se encuentra a 58 kilómetros de la ciudad capital de Guatemala. Los principales lugares poblados son: Escuintla, Santa Lucía Cotzumalguapa, Siquinalá, Tiquisate y San José. La jurisdicción departamental comprende 13 municipios que son Escuintla, Santa Lucía Cotzumalguapa, La Democracia, Siquinalá, Masagua, Tiquisate, La Gomera, Guanagazapa, San José, Iztapa, Palín, San Vicente Pacaya y Nueva Concepción (*idem*).

Escuintla es irrigado por la vertiente de varios ríos, entre los cuales están: el río Michatoya, Guacalate, María Linda, El Naranjo, Coyolate, Nahualate y Madre Vieja. Estos ríos desembocan en el Océano Pacífico y recorren grandes extensiones del departamento. Por otro lado, en este departamento se forma el canal de Chiquimulilla el cual es navegado por varias embarcaciones, facilitando la comunicación con varias comunicaciones de este departamento y del departamento de Santa Rosa. Asimismo, existen algunas lagunas dentro de su territorio como la de Tecojate, Quitasombrero, Los Patos y Sipacate (*idem*).

El clima que predomina en la mayor parte del departamento es cálido, registrándose temperaturas entre 21° y 34° C promedio en la mayoría de los municipios, a excepción de los municipios de Palín, San Vicente Pacaya y parte de Guanagazapa, cuya región montañosa ya se considera del altiplano, donde se registran temperaturas entre 15° y 24° C promedio. Se observa una precipitación pluvial abundante durante los meses de mayo a octubre, mientras que en los meses de noviembre a abril se considera una época seca, aunque hay lluvias esporádicas; la humedad se encuentra en el 80%. Debido a su ubicación geográfica, el departamento de Escuintla cuenta con clima variable que va desde templado, hasta el cálido influyendo éstos en las diferentes zonas de vida del Departamento. Alberga 2 tipos distintos de bosque. El área con cobertura forestal es de 228 kms², lo que representa aproximadamente el 5% del territorio del departamento (*idem*).

Para el 2005, Escuintla contaba con 505,955 habitantes en todo el departamento, de los cuales posee vivienda o habitación particular unas 129, 208 personas. Existen varias necesidades básicas que se encuentran insatisfechas, estas se resumen en la figura 1 (*idem*).

Figura 1: necesidades básicas insatisfechas en el departamento de Escuintla hasta 1994.

Departamento/municipio	Número de hogares	Necesidades Básicas Insatisfechas 1994					
		Mala calidad vivienda	Hacinamiento	Sin agua potable	Sin servicio sanitario	Sin escolaridad	Insuficiencia de ingreso familiar
Total República	1,591,831	23	41	12	22	18	17
Departamento de Escuintla	78,080	20	42	6	23	14	14
Escuintla	18,637	14	34	4	10	10	9
Guanagazapa	1,700	39	54	11	31	21	24
Iztapa	1,974	10	51	2	38	13	14
La Democracia	2,678	23	43	4	16	15	16
La Gomera	7,480	11	47	5	18	17	17
Masagua	4,322	12	51	1	15	13	19
Nueva Concepción	9,911	12	49	8	52	17	21
Palín	3,746	28	40	11	14	15	11
San José	6,775	32	45	5	32	12	13
San Vicente Pacaya	1,909	21	42	17	59	10	13
Santa Lucía	10,282	22	42	5	22	14	11
Cotzumalguapa							
Siquinalá	1,822	21	45	7	13	13	12
Tiquisate	6,844	26	37	6	18	13	16

(MINECO 2007).

9. Listado de instituciones colaboradoras:

9.1. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Área de Salud de Escuintla: Dra. Laura Figueroa como encargada del Centro de Salud. Autorizarán y proveerán las fichas epidemiológicas de casos sospechosos de Leptospirosis en todo el departamento de Escuintla para los años 2003 al 2007.

9.1.1. E-mail: dasescuintla@intelnett.com

9.1.2. Teléfono: 77200700

10. Datos sobre la confidencialidad del estudio: cada ficha epidemiológica será rotulada con un código que incluirá la primera inicial del municipio donde vive el paciente más un número consecutivo comenzando desde el 001. Se le explicará al paciente que su nombre ni su dirección serán publicados en el estudio y que los resultados serán utilizados exclusivamente para el uso de la investigación de tesis y no serán publicados en otros medios.

11. Firmas de aprobación:

Dra. Pamela Pennington


Lic. Maricruz Álvarez

Dr. Wenceslao Arvelo

Nancy Rebeca Say Rodríguez

26 de febrero del 2008.

D. Anexo 4. procedimiento normado de operación de Nivel de Bioseguridad Tipo II.

<p>Universidad del Valle de Guatemala Tesis: Detección molecular de <i>Leptospira interrogans</i> como posible factor de riesgo de infección para Leptospirosis en la región de Escuintla, Guatemala</p> 	<p>Procedimiento Normado de Operación</p>	<p>PNO: 1 Versión: 1 Fecha 07/04/2008 Paginas totales: 4</p>
	<p>Cuantificación de <i>Leptospira interrogans</i></p>	<p>Autores: Nancy Say, Mabel Taracena Preparado por: Nancy Say</p>

1. Propósito:

Realizar una curva estándar de cuantificación de *L. interrogans* por medio de conteo en cámara Petroff-Hausser y microscopio de campo oscuro, para estandarizar el protocolo de detección de la bacteria por métodos moleculares.

2. Aplicación:

La cuantificación de bacterias se ha utilizado ampliamente para la estandarización de métodos de cultivo, detección e investigación. La aplicación de un protocolo de cuantificación de células bacterianas es un método fácil y sencillo que se utiliza principalmente para estandarizar un protocolo de trabajo con bacterias.

3. Referencias

- 3.1 Center for Disease Control (CDC), National Institute of Health (NIH). 2005. Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. Cuarta edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Servicio de Salud Pública.
- 3.2 Ganoza, C. A. *et al.* 2006. *Determining the risk for severe Leptospirosis by molecular analysis of environmental surface Waters for pathogenic Leptospira*. PLoS Medicine. 3(8): 1329-1340.
- 3.3 Viriyakosol, S. *et al.* 2006. *Toll-Like Receptor 4 Protect Against Lethal Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae Infection and Contributes to In Vivo Control of Leptospiral Burden*. Infection and Immunity. 74(2):887-895.

4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1 mL: mililitros

5. Principio:

La cuantificación de células por microscopia se basa en el conteo manual de células por medio de la observación a través de un microscopio. En el caso de células de *Leptospira*, la observación se logra sólo por medio de un microscopio de campo oscuro o de contraste de fases.

6. Seguridad:

- 6.1 Utilizar doble guante para evitar contacto y posible infección con la bacteria.
- 6.2 Utilizar bata para evitar contacto y contaminación.
- 6.3 Utilizar en todo momento cloro al 10% para desecho de puntas y otro material contaminado.
- 6.4 Utilice siempre agua destilada.
- 6.5 Utilizar etanol 70% para desinfectar todo el equipo de trabajo y otros materiales.
- 6.6 Utilizar un descarte especial para desechos bioinfecciosos en donde descartar puntas contaminadas y otros materiales.
- 6.7 Rotular el sitio de trabajo con el agente infeccioso con el que se trabaja.
- 6.8 Mantener un rótulo con el nombre de personas encargadas y teléfonos en casos de accidentes o emergencias.

7. Equipos, materiales y reactivos:

- 7.1 Guantes
- 7.2 Recipientes de descarte biológico
- 7.3 Cámara de conteo Petroff-Hausser (Sigma Aldrich)
- 7.4 Microscopio de campo oscuro (Leica)
- 7.5 Tubos de ensayo
- 7.6 Micropipetas (p10, p100, p200, p1000).
- 7.7 Campana de luz UV
- 7.8 Centrifuga
- 7.9 Pipetas (1-5 mL)
- 7.10 Congeladores -20 °C.

8. Procedimiento:

- 8.1 En el laboratorio todo material de descarte de origen biológico debe ser considerado potencialmente patógeno. Por ello debe de ser descartado en un recipiente para material de descarte infeccioso debidamente rotulado, esto no debe incluir objetos punzo cortantes como agujas o lancetas. En este recipiente no debe de ser descartada basura normal de oficina u tro que no sea potencialmente patógeno.
- 8.2 Antes del trabajo se debe limpiar toda el área de trabajo (campanas, mesas, otros, etc.), así como el equipo (microscopio, micropipetas, centrifuga, etc.); utilizando etanol 70%. Para la campana luego de haber limpiado con etanol, se debe colocar la luz UV por 15 minutos antes de empezar el trabajo.
- 8.3 El cultivo con la cepa de *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae y *L. samaranga* Patoc I serán transportadas en un contenedor doble y dentro de una hielera en un medio de cultivo EMJH.
- 8.4 Se procede a centrifugar el tubo con el medio de cultivo a 10,000 rpm por 10 minutos. Se descarta el medio de cultivo EMJH en un recipiente con cloro (dejar reposar por 1 hora), y luego se descarta con abundante agua en el lavadero. El botón de células en el fondo del tubo se guardan para la inoculación.
- 8.5 En un microtubos de 1.5 mL, colocar 1 mL de agua de chorro o pila y se inocula con la cepa de *Leptospira* seleccionada proveniente de la centrifugación.
- 8.6 Se toma 1 mL del agua de inoculó y se coloca en una cámara Petroff-Hausser

para el conteo de células/mL.

- 8.7 Se coloca la cámara Petroff-Hausser en el microscopio de campo oscuro y se observa con un aumento 100 X. Se cuentan todas las células observadas por mL.
- 8.8 Realizar diluciones seriadas del inóculo de agua con bacterias. Realizar diluciones desde 10 hasta 10^8 , y para cada dilución contar el número de leptospiras/mL como se indicó anteriormente en la cámara Petroff-Hausser.
- 8.9 Luego de haber realizado las cuantificaciones, incubar 30 minutos a 56°C para inactivar las bacterias.
- 8.10 Todas las diluciones de cuantificación de las bacterias serán preservadas en congelador a -20°C en el laboratorio de bioquímica de la Universidad del Valle de Bioquímica. En la refrigeradora se colocará un rotulo del agente que se tiene guardado y la cantidad de inoculaciones realizadas, junto con el nombre de personas encargadas y sus teléfonos.

10. Reporte de datos y documentos utilizados:

En el cuaderno de trabajo de laboratorio de la persona que realizó el procedimiento debe de quedar detallada la información de cómo y cuando se realizó el procedimiento. Además debe registrarse los resultados de la cuantificación y cualquier observación realizada durante el procedimiento, así como también contratiempos ocurridos y su solución.

E. Anexo 5: tamaño de muestra calculado para distintos niveles de confianza.

Cuadro 18. Nivel de confianza con respecto al tamaño disponible para el análisis de positividad de muestras de agua para especies patogénicas de *Leptospira* spp., para la población de casos sospechosos de Leptospirosis entre los años 2005-2007 en distintos municipios del departamento de Escuintla, Guatemala.

Nivel de confianza (%)	Tamaño de muestra
80	21
90	22
95	22
97	22
99	23
99.9	23
99.99	23

F. Anexo 6: mapa de información geográfica de los sitios muestreados en el departamento de Escuintla.

Figura 11: localización y datos fisicoquímicos del agua de los sitios muestreados en el departamento de Escuintla.

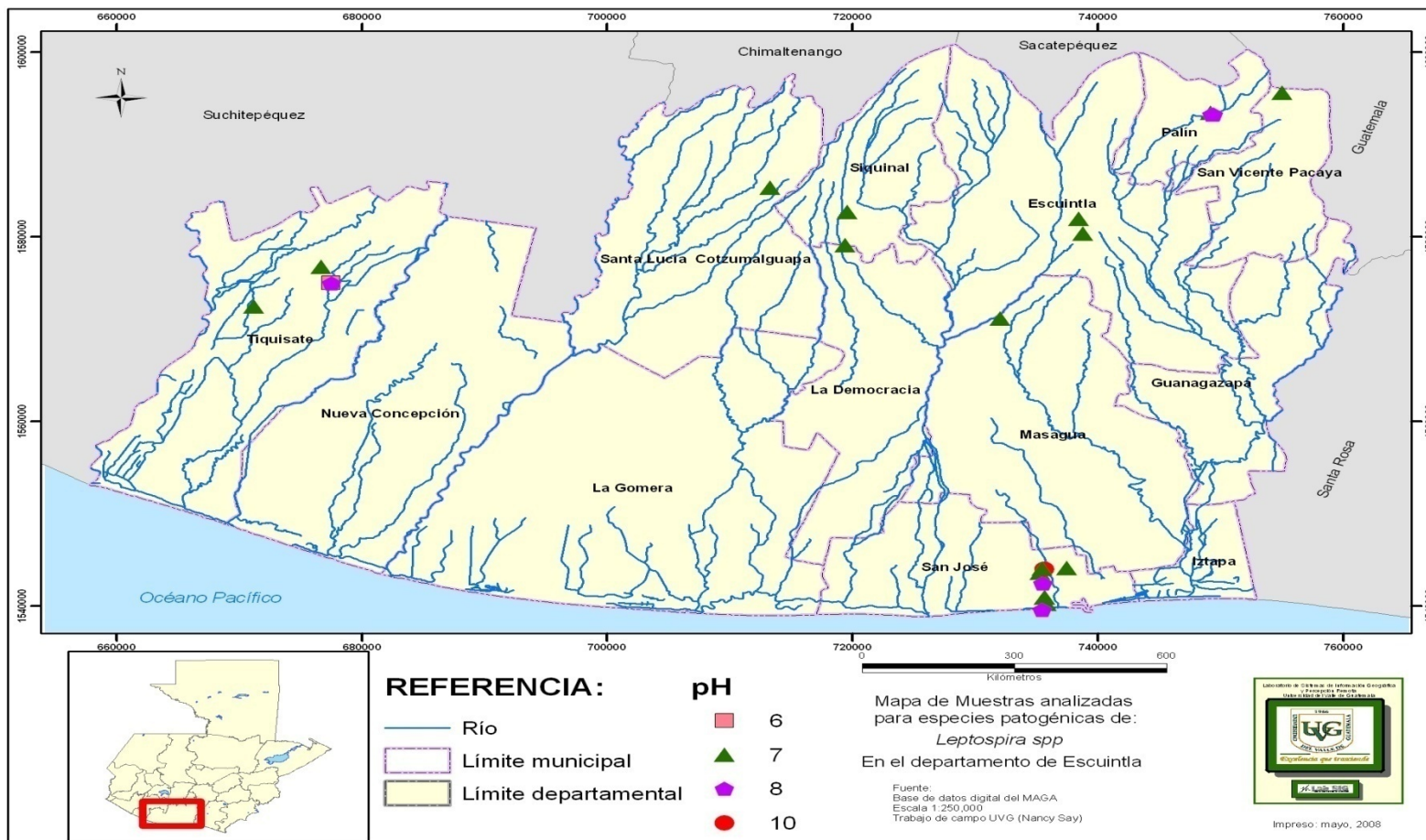
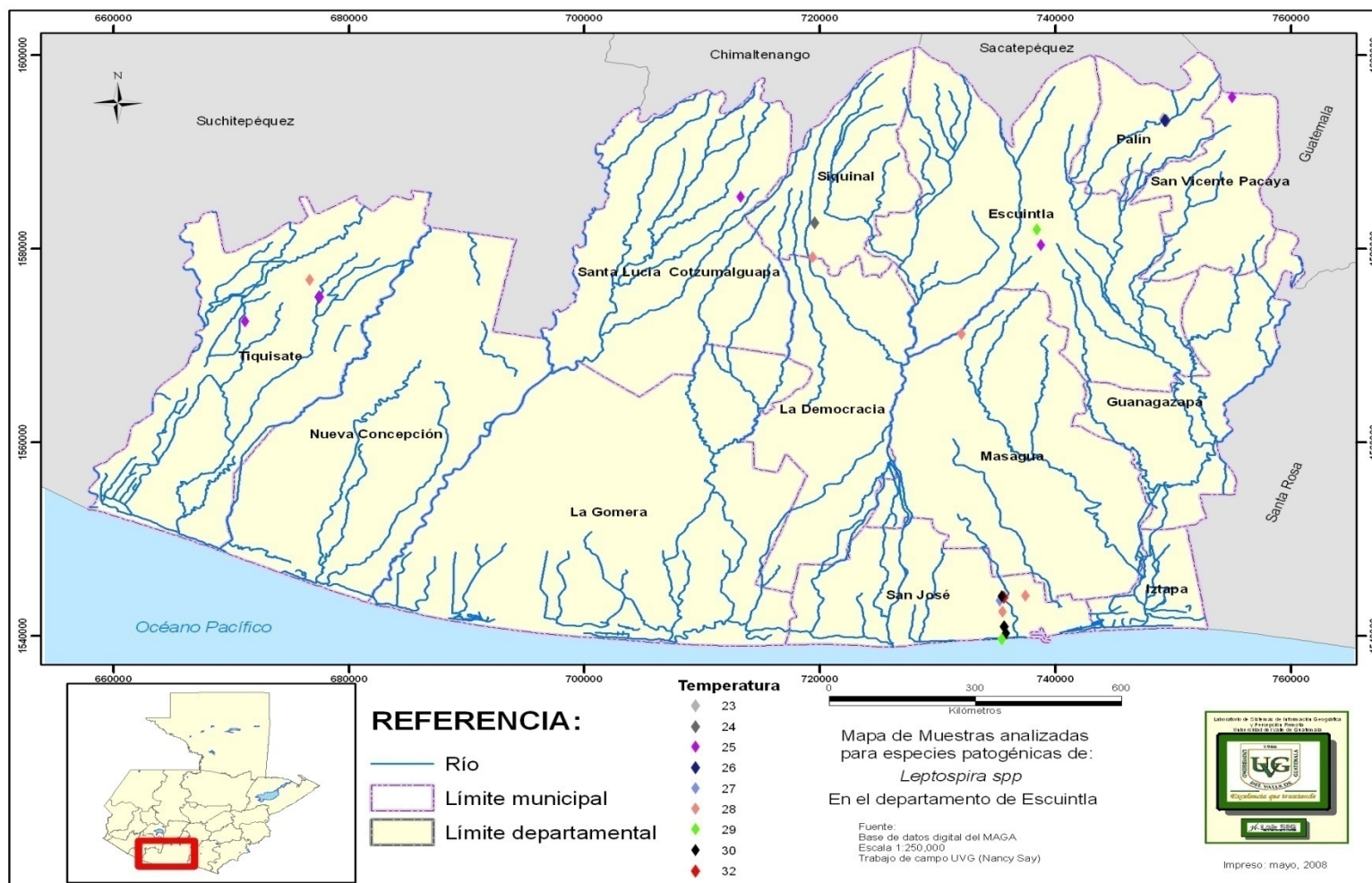


Figura 12: localización y datos fisicoquímicos del agua de los sitios muestreados en el departamento de Escuintla.

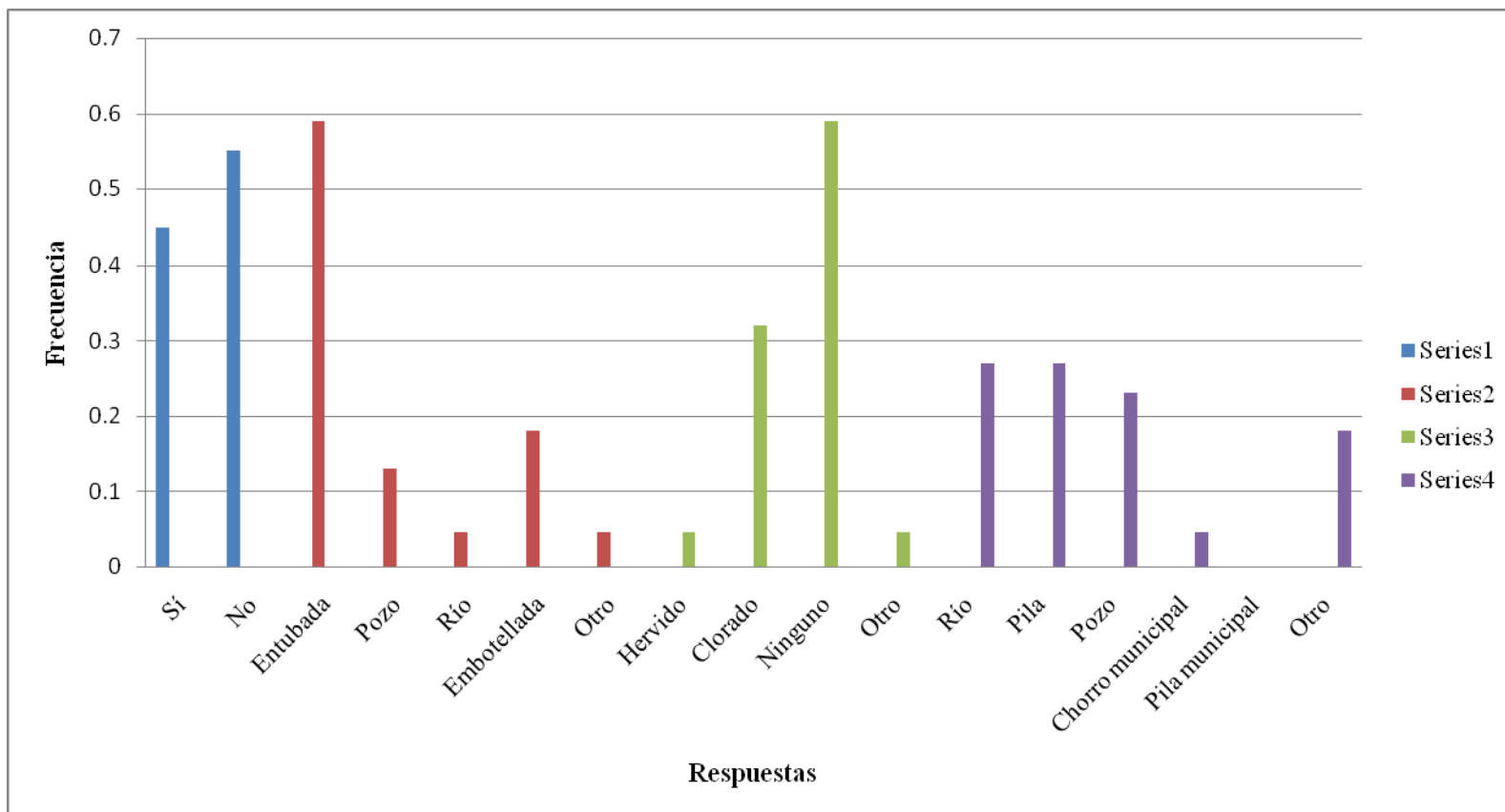


G. Anexo 7: encuesta realizada a las personas en los diversos municipios muestreados de Escuintla al momento del muestreo.

Cuadro 19. Encuesta sobre uso y contacto cotidiano de distintos tipos de fuentes de agua en los sitios muestreados.

Preguntas								
Respuestas	1. Contacto cotidiano con aguas ambientales		2. Tipo de agua de consumo		3. Tratamiento administrado al agua de consumo y utilización		4. Tipo de fuente de agua utilizado para usos cotidianos	
	No. Respuestas	Frecuencia	No. Respuestas	Frecuencia	No. Respuestas	Frecuencia	No. Respuestas	Frecuencia
Sí	10	0.45						
No	12	0.55						
Entubada			13	0.59				
Pozo			3	0.13				
Río			1	0.045				
Embotellada			4	0.18				
Otro			1	0.045				
Hervido					1	0.045		
Clorado					7	0.32		
Ninguno					13	0.59		
Otro					1	0.045		
Río							6	0.27
Pila							6	0.27
Pozo							5	0.23
Chorro municipal							1	0.045
Pila municipal							0	0
Otro							4	0.18
Total	22	1	22	1	22	1	22	1

Figura 13. Frecuencias de respuestas obtenidas para la encuesta realizada sobre uso y contacto cotidiano de distintos tipos de fuentes de agua en los sitios muestreados.



Serie 1: pregunta 1. Contacto cotidiano con aguas ambientales; Serie 2: pregunta 2. Tipo de agua de consumo; Serie 3: pregunta 3. Tratamiento administrado al agua de consumo y de utilización; Serie 4: pregunta 4. Tipo de fuente de agua utilizado para usos cotidianos.