



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ciencias y Humanidades**

Determinación de la incidencia de *Leptospira spp* en pacientes con  
síndrome icterico, no relacionado a hepatitis viral, en el  
departamento de Escuintla, Guatemala, a través de la prueba de PCR

Mabel Laline Taracena Oliva

Guatemala

2008



Determinación de la incidencia de *Leptospira spp* en pacientes con síndrome icterico, no relacionado a hepatitis viral, en el departamento de Escuintla, Guatemala, a través de la prueba de PCR

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

**Facultad de Ciencias y Humanidades**

Determinación de la incidencia de *Leptospira spp* en pacientes con  
síndrome icterico, no relacionado a hepatitis viral, en el  
departamento de Escuintla, Guatemala, a través de la prueba de PCR

Trabajo de investigación presentado por Mabel Laline Taracena O.  
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

## PREFACIO

Este trabajo de investigación surgió como parte de la inquietud de un grupo de compañeras en aplicar los conocimientos adquiridos durante la carrera en el sector de la salud en Guatemala. Pensamos que esto es era importante dado que a la investigación bioquímica y epidemiológica no se le da la debida atención en nuestro país. Así pues, al ponernos en contacto con el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), surgió el tema de la leptospirosis y su difícil diagnóstico. Esta es una enfermedad reemergente, y de potencial peligro en los países tropicales y en vías de desarrollo, como es el caso de Guatemala. Asimismo, es una enfermedad que tiende a ser subdiagnosticada por la dificultad de su confirmación en el laboratorio y por lo tanto, hacer estudios para conocer su incidencia en nuestro país es sumamente importante. Elegimos el departamento de Escuintla como área de estudio, debido a las características físicas del territorio y a sus condiciones socioeconómicas, que lo hacen propicio para el desarrollo de la enfermedad.

Para el desarrollo de este trabajo, recibí la ayuda y apoyo de muchísimas personas y a todas ellas les estoy sumamente agradecida. A mi asesora Renata Mendizábal de Cabrera le agradezco profundamente todo el conocimiento que compartió conmigo durante el tiempo de desarrollo de esta tesis, así como todo su apoyo y comprensión. A mis amigas y compañeras de trabajo, Luisa Duarte y Nancy Say, muchas gracias por compartir conmigo el desarrollo de este tema, por todos esos años de estudios y por todo el tiempo compartido.

Asimismo, deseo agradecer a la Dra. Pamela Pennington, al Dr. Wenses Arvelo y a la Lic. Carmen Lucía Contreras, quienes amablemente colaboraron en el desarrollo técnico de este trabajo. No puedo dejar de lado también, al Dr. Héctor Aguilar, quien aunque ya no está con nosotros, dejó marcado nuestro paso por la Universidad.

Este trabajo, y todo lo que conlleva, se lo dedico a mi familia: a mis padres, a mi hermana, a mi abuelita. Sin embargo, la familia no sólo se lleva en la sangre, si no también en el corazón, y por lo tanto también a la Hna. María Claesen, sin quien no hubiera sido posible que yo realizara esta tesis.

Vo. Bo.

(f) \_\_\_\_\_  
Licda. Renata Mendizábal de Cabrera

Tribunal

(f) \_\_\_\_\_  
Dra. Pamela Pennington

(f) \_\_\_\_\_  
Licda Renata Mendizábal de Cabrera

(f) \_\_\_\_\_  
Dr. Wenses Arvelo

Fecha de aprobación: 9 de junio del 2008

## ÍNDICE

|                         | Pág. |
|-------------------------|------|
| PREFACIO.....           | v    |
| LISTA DE CUADROS .....  | x    |
| LISTA DE GRÁFICOS ..... | xi   |
| RESUMEN .....           | xii  |

### Capítulos

|  |    |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| II. ANTECEDENTES   |    |
| A. Leptospirosis.....  | 3  |
| B. Agente causal .....   | 4  |
| 1. Taxonomía de la <i>Leptospira</i> .....   | 4  |
| 2. Microbiología.....  | 4  |
| 3. Patogenia.....  | 6  |
| C. Transmisión y grupos de riesgo.....   | 7  |
| D. Manifestaciones clínicas.....   | 8  |
| 1. Leptospirosis asintomática.....   | 9  |
| 2. Leptospirosis sintomática.....  | 9  |
| a. Leptospirosis anictérica.....   | 10 |
| b. Leptospirosis ictérica (Síndrome de Weil).....                                      | 11 |
| E. Identificación molecular de <i>Leptospira</i> y su diagnóstico<br>diferencial ..... | 12 |
| 1. Identificación de <i>Leptospira</i> por métodos moleculares.....                    | 12 |
| 2. Diagnóstico diferencial.....  | 14 |
| F. Tratamiento.....  | 14 |
| G. Epidemiología.....  | 15 |

|   |    |
|---|----|
| 1. Leptospirosis en Guatemala.....  | 16 |
| 2. Leptospirosis en Escuintla.....  | 16 |
| <br>  |    |
| III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN   |    |
| A. Objetivo general .....   | 19 |
| B. Objetivos específicos.....   | 19 |
| C. Hipótesis .....  | 19 |
| D. Justificación .....  | 20 |
| IV. METODOLOGÍA   |    |
| A. Área geográfica .....  | 22 |
| B. Identificación del cuadro clínico asociado .....   | 22 |
| C. Definición de caso .....   | 22 |
| D. Obtención de la muestra de suero.....  | 23 |
| 1. Protección del anonimato.....  | 23 |
| E. Traslado y almacenamiento de muestras.....   | 24 |
| F. Extracción del ADN a partir de la muestras de suero o plasma .....                           | 24 |
| G. Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR).....  | 25 |
| H. Electroforesis .....   | 26 |
| 1. Preparación del gel .....  | 26 |
| 2. Electroforesis .....   | 27 |
| 3. Coloracion y visualizacion del ADN usando bromuro<br>de etidio .....                         | 27 |
| I. Control positivo y determinación de la sensibilidad del PCR.....                             | 28 |
| J. Análisis epidemiológico.....   | 29 |
| V. RESULTADOS   |    |
| A. Control positivo y estandarización de la amplificación<br>de ADN de Leptospira por PCR ..... | 30 |
| B. Análisis de muestras .....   | 31 |
| C. Datos epidemiológicos.....   | 32 |
| VI. DISCUSIÓN.....  | 36 |
| VII. CONCLUSIONES .....   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| VIII. RECOMENDACIONES .....  | 41 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA .....   | 42 |
| X. APÉNDICES   |    |
| <b>Anexo I.</b> Ficha epidemiológica nacional de enfermedades<br>transmitidas por alimentos o agua .....   | 45 |
| <b>Anexo II.</b> Preparación de las soluciones a utilizar .....  | 47 |
| <b>Anexo III.</b> Diagrama de flujo correspondiente a la metodología .....   | 48 |
| <b>Anexo IV.</b> Secuencia del gen de la sec Y de la pre-proteína translocasa,<br>del cromosoma 1 de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Hardjo cepa<br>Norma, con número de acceso EU600183, en la base de datos de<br>secuencias genéticas del Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus<br>siglas en inglés) de Estados Unidos..... | 49 |
| <b>Anexo V.</b> Propuesta para desarrollar proyectos y cursos extraordinarios<br>en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología .....   | 50 |
| <b>Anexo VI.</b> Verificación del Flujo de la Campana Laminar modelo<br>36201, Labconco .....  | 51 |
| <b>Anexo VII.</b> Procedimiento Normado de Operación correspondiente a la<br>Cuantificación de Células de <i>Leptospira Interrogans</i> .....  | 55 |
| <b>Anexo VIII.</b> Solicitud de Aprobación Rápida de Protocolo para el<br>Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala .....   | 59 |
| <b>ANEXO IX.</b> Resumen de los datos generales de las muestras utilizadas<br>en la prueba de PCR .....  | 61 |
| <b>Anexo X.</b> Mapa del departamento de Escuintla, Guatemala, dividido por<br>municipios .....  | 65 |

## LISTA DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1: Clasificación de <i>Leptospira</i> .....  | 5  |
| Cuadro 2: Departamento de Escuintla: niveles de pobreza, pobreza extrema y valor de la brecha según municipio.....  | 17 |
| Cuadro 3: Necesidades básicas insatisfechas (porcentaje) según municipio en Escuintla.....  | 18 |
| Cuadro 4: Síntomas y signos encontrados en los casos sospechosos de leptospirosis en Escuintla 2003.....  | 18 |
| Cuadro 5: Sintomatología de los pacientes incluidos en el estudio .....   | 23 |
| Cuadro 6: Composición de la mezcla reacción utilizada para PCR.....   | 26 |
| Cuadro 7: Conteo de <i>Leptospira interrogans</i> serovar sejoe inoculadas artificialmente en suero.....  | 30 |
| Cuadro 8: Distribución de las muestras evaluadas según el municipio de residencia del paciente .....  | 34 |
| Cuadro 9: Datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes con resultados positivos para leptospirosis por medio de PCR a partir de muestras de suero..... | 34 |
| Cuadro 10: Relación entre distintas variables y la detección de ADN de <i>Leptospira</i> por medio de la prueba de PCR .....                                | 35 |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1: Naturaleza bifásica de la leptospirosis y técnicas de investigación relevantes para las distintas etapas de la enfermedad.....   | 10     |
| Figura 2: Gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación del gen la Pre-proteína translocasa, sec Y, del cromosoma 1 de <i>Leptospiras</i> patógenas en suero inoculado a distintas concentraciones con <i>Leptospira interrogans</i> serovar serjoe..... | 31     |
| Figura 3: Gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación de de amplificación del gen la Pre-proteína translocasa, sec Y, del cromosoma 1 de <i>Leptospiras</i> patógenas, con las muestras de suero con resultados positivos para leptospirosis.....      | 32     |
| Figura 4: (Gráfico 1) Distribución según edades de los pacientes que cumplían con la definición de caso.....   | 33     |
| Figura 5: (Gráfico 2) mes del año en el que el paciente se presentó al Centro de Salud .....   | 33     |

## RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue determinar la incidencia de leptospirosis en pacientes con síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral por medio de la prueba de PCR para la amplificación del gen de la Pre-proteína translocasa, sec Y, del cromosoma 1 de *Leptospiras* patógenas. A diferencia de otras técnicas, el PCR tiene la ventaja de ser sumamente sensible en la fase aguda de la enfermedad, donde la concentración de leptospiras en el suero es elevada, permitiendo así el diagnóstico precoz. El límite de detección encontrado para la prueba de PCR fue de 22 células/mL y con esta técnica se analizaron 114 muestras de suero, de pacientes cuyas características cumplían con la definición de caso utilizada, y fue posible detectar ADN de leptospira en un 1.74% de ellas, con una variación entre -0.00673 y 0.04073 con un límite de confianza al 95%. Estos resultados reflejaron una baja incidencia de leptospirosis en personas con síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral en el lugar y período evaluado. No se obtuvo resultados estadísticamente significativos a partir de la prueba de Fisher para correlacionar los rangos de edad, género, o época del año en la cual acudió el paciente al Centro de Salud de Escuintla. En base a los resultados obtenidos cabe indicar que sería de valiosa importancia extender este tipo de estudio, tanto en población, área geográfica y en tiempo; con el fin de proporcionar datos más amplios sobre la incidencia de leptospirosis y la etiología del síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral en Guatemala.

## I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es un problema de salud pública a nivel mundial, en particular en áreas tropicales y subtropicales y en países en vías de desarrollo, como Guatemala. Las condiciones climáticas y ambientales contribuyen a agravar el problema, pero sobre todo el contacto con ambientes contaminados por *Leptospira*, como las actividades agrícolas, ganaderas, mineras, recreacionales, deportivas y condiciones pobres de salubridad en la vivienda.

Escuintla es uno de los departamentos que reúnen la mayor cantidad de condiciones que favorecen el desarrollo de dicha enfermedad, ya que por su altura sobre el nivel del mar (346.91 metros), presenta un clima cálido con elevado porcentaje de humedad. La mayor parte del territorio está dedicado a la producción de caña y otros cultivos, actividad en la que se involucra una elevada cantidad de población, la cual vive en condiciones de pobreza y por lo tanto expuestas a posibles fuentes de contagio con *Leptospira*. Así mismo, por la presencia del Puerto de San José y otras playas, el área también es un considerable atractivo turístico a nivel nacional, por lo que cuenta con una elevada cantidad de balnearios, que utilizados de manera recreacional o deportiva, pudieran considerarse potenciales focos de transmisión de la leptospirosis.

La leptospirosis es una enfermedad potencialmente mortal pero tratable; sus manifestaciones clínicas varían ampliamente en el ser humano, con oscilaciones que van desde procesos totalmente asintomáticos, que son los más frecuentes, pasando por las formas de evolución generalmente benignas, hasta el desarrollo de cuadros graves ictero-hemorrágicos con colapso vascular y serio compromiso de funcionamiento hepático-renal, que puede ser de evolución fatal (enfermedad de Weil).

La leptospirosis es considerada una enfermedad emergente en tiempos actuales debido a que el número de reportes de la misma va en aumento y se considera importante en aquellas regiones donde fenómenos climáticos, como el fenómeno del Niño, causan inundaciones considerables en ciertas épocas del año, como ocurre en Guatemala y en particular en Escuintla. Al ser la leptospirosis frecuente en zonas tropicales donde confluyen otras infecciones como el dengue, ésta tiende a confundirse con sus cuadros clínicos, y es generalmente subdiagnosticada; sin embargo, estudios recientes han demostrado su importancia en la salud pública.

La *Leptospira* puede ser identificada por métodos serológicos o a través de técnicas moleculares. Tradicionalmente se utilizó la absorción cruzada y posteriormente anticuerpos monoclonales, lo que durante mucho tiempo ha permitido identificar rápidamente los aislados. Sin embargo, debido a que estas técnicas se basan en la respuesta inmune del paciente frente a las leptospiras, detectando anticuerpos contra *Leptospira spp.*, son poco sensibles en los primeros seis días de enfermedad y por lo tanto pueden ser inoportunas para el inicio de tratamiento.

El diagnóstico precoz de leptospirosis es necesario sobre todo en las formas graves de la enfermedad donde, si el paciente no recibe tratamiento temprano, puede llegar a tener una tasa de fatalidad del 5 al 15%. Esto motivó el desarrollo de técnicas moleculares que han demostrado su utilidad en los periodos agudos de la infección. Estos métodos moleculares de diagnóstico, desarrollados en años recientes, son más rápidos y menos complicados, como en el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés PCR). Además, estos métodos permiten un diagnóstico más preciso, lo que puede llevar a un mejor tratamiento y un mejor control epidemiológico de la enfermedad.

## II. ANTECEDENTES

### A. Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia global y distribución mundial causada por la espiroqueta *Leptospira interrogans*, pero es más frecuente en las áreas tropicales donde las condiciones para su transmisión son particularmente favorables. Es reconocida ahora en muchas regiones del mundo como una causa frecuente de síndromes febriles indiferenciados, confundiéndola muchas veces con enfermedades endémicas de cada región (Céspedes, 2005).

Comúnmente se ha considerado a la leptospirosis como una enfermedad asociada con la ocupación de las personas, sobre todo cuando la persona está en contacto directo o indirecto con orina de animales infectados (Céspedes, 2005). Los reservorios más importantes son mamíferos pequeños que pueden transmitir la infección a los animales domésticos y a los humanos. La transmisión depende de muchos factores como el clima, la densidad poblacional del reservorio y el grado de contacto entre este y los hospederos accidentales. Los roedores pueden ser reservorios de diferentes serovares, que son agrupaciones de microorganismos basadas en sus características antigénicas, pero las ratas generalmente son reservorios de variedades como *Icterohaemorrhagiae* y *Ballum* que son patógenas al hombre. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

La mayoría de pacientes presenta una forma leve de infección, consistente en un cuadro febril autolimitado y sin ictericia. Sin embargo, alrededor del 10-15% de los pacientes sufre cuadros graves, con ictericia intensa. Típicamente se presentan dos fases: la aguda o leptospirémica y la inmune o leptospiúrica; sin embargo, en muchos casos las dos fases son indistinguibles, y en los casos leves no siempre se presenta la segunda fase. El diagnóstico se realiza mediante serología, cultivo del microorganismo, o por técnicas moleculares. (Johnson, 2004)

## B. Agente causal

La leptospirosis es producida por la espiroqueta *Leptospira interrogans*, que es la única especie patógena del género bacteriano *Leptospira*. La estructura del ADN de estas bacterias permite clasificarlas en unas 15 genomoespecies, y su composición antigénica permite clasificarlos en unos 25 serogrupos y unos 200 serotipos. (Céspedes, 2005)

1. Taxonomía de la *Leptospira*. El género *Leptospira* (Gr. Lepto = fino y espira = espiral) pertenece a la familia *Leptospiraceae* y al orden *Spirochaetales*. Tradicionalmente se clasifican en dos especies, la mayoría de leptospiros patógenas se agruparon dentro del «complejo interrogans» (nombrado posteriormente como *L. interrogans sensu lato*), mientras que las otras en el «complejo biflexa» (después *L. biflexa sensu lato*) que agrupa a las saprofitas principalmente. (Céspedes, 2005)

La unidad taxonómica en *Leptospira* es el serovar, y ambos complejos (*L. interrogans* y *L. biflexa*) han sido divididos en numerosos serovares. Actualmente, la clasificación del género *Leptospira* está basada en la homología del ADN y está dividida en 17 especies; definido en 70% de homología y 5% de divergencia en el ADN (Cuadro 1). El avance en la biología molecular ha permitido también secuenciar su genoma, que consiste de dos cromosomas circulares (Céspedes, 2005). No obstante, esta clasificación coexiste con la clasificación serológica antigua; debido a problemas en la clasificación, los nuevos aislados de *Leptospira* deben caracterizarse mediante pruebas moleculares y serológicas. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

2. Microbiología. La *Leptospira* es una bacteria aeróbica obligada que presenta en uno o ambos extremos una curvatura en forma de gancho, tiene una gran movilidad que le viene dada por un axostilo, el cual está formado por dos filamentos axiales insertados en un disco o protuberancia al final del cuerpo citoplasmático y cuyo extremo libre está unido a la región media de la bacteria. Estas características pueden observarse a través del microscopio electrónico. Tiene un diámetro de  $\sim 0,25\mu\text{m}$  y una longitud variable entre 6-25 $\mu\text{m}$  y puede pasar por membranas de filtración de poro 0,22 $\mu\text{m}$ . Esta característica hace que la *Leptospira* sea observable únicamente en un microscopio de campo oscuro o de

contraste de fase, y además que no se pueda colorear con anilinas (Céspedes, 2005).

| <b>Cuadro 1: Clasificación de <i>Leptospira</i></b> |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>Especie</b>                                      | <b>Serogrupo</b>  | <b>Serovar</b>   | <b>Cepa de referencia</b>  |
| <i>Leptospiras patógenas</i>                        |   |  |  |
| <i>L. interrogans</i>                               | <i>Australis</i><br><i>Australis</i><br><i>Bataviae</i><br><i>Canicola</i><br><i>Hebdomadis</i><br><i>Icterohaemorrhagiae</i><br><i>Icterohaemorrhagiae</i><br><i>Icterohaemorrhagiae</i><br><i>Pomona</i><br><i>Pyrogenes</i><br><i>Sejroe</i> | <i>Australis</i><br><i>Bratislava</i><br><i>Bataviae</i><br><i>Canicola</i><br><i>Hebdomadis</i><br><i>Icterohaemorrhagiae</i><br><i>Copenhageni</i><br><i>Lai</i><br><i>Pomona</i><br><i>Pyrogenes</i><br><i>Hardjo</i> | <i>Ballico</i><br><i>Jez Bratislava</i><br><i>Van Tienen</i><br><i>Hond Utrecht IV</i><br><i>Hebdomadis</i><br><i>RGA</i><br><i>M 20</i><br><i>Lai</i><br><i>Pomona</i><br><i>Salinem</i><br><i>Hardjoprajitno</i> |
| <i>L. alexanderi</i>                                | <i>Manhao</i>   | <i>Manhao3</i>   | <i>L 60</i>  |
| <i>L. fainei</i>                                    | <i>Hurstbridge</i>  | <i>Hurstbridge</i>   | <i>BUT 6</i>   |
| <i>L. inadai</i>                                    | <i>Lyme</i>   | <i>Lyme</i>  | <i>10</i>  |
| <i>L. kirschnen</i>                                 | <i>Autumnales</i><br><i>Cynopteri</i><br><i>Grippotyphosa</i><br><i>Pomona</i>  | <i>Bim</i><br><i>Cynopteri</i><br><i>Grippotyphosa</i><br><i>Mozdok</i>  | <i>1051</i><br><i>3522 C</i><br><i>Moskva V</i><br><i>5621</i>   |
| <i>L. meyeri</i>                                    | <i>Semarang</i>   | <i>Saemarang</i>   | <i>Velrad Semarang 173</i>   |
| <i>L. borgpetersenii</i>                            | <i>Ballum</i><br><i>Ballum</i><br><i>Javanica</i><br><i>Sejroe</i><br><i>Tarassovi</i>  | <i>Ballum</i><br><i>Castellonis</i><br><i>Javanica</i><br><i>Sejroe</i><br><i>Tarassovi</i>  | <i>Mus 127</i><br><i>Castellon 3</i><br><i>Veldrat Bat 46</i><br><i>M 84</i><br><i>Perepicilin</i>   |
| <i>L. weillii</i>                                   | <i>Celledoni</i>  | <i>Celledoni</i>   | <i>Celledoni</i>   |
| <i>L. noguchii</i>                                  | <i>Autumnales</i><br><i>Panama</i>  | <i>Fortbragg</i><br><i>Panama</i>  | <i>Foro Braga</i><br><i>CZ 124 K</i>   |
| <i>L. santarosai</i>                                | <i>Bataviae</i><br><i>Mini</i>  | <i>Brasiliensis</i><br><i>Georgia</i>  | <i>An 776</i><br><i>LT 117</i>   |
| <i>Genomospecies 1</i>                              | <i>Ranarum</i>  | <i>Pingchang</i>   | <i>80-412</i>  |
| <i>Genomospecies 4</i>                              | <i>Icterohaemorrhagiae</i>  | <i>Hualin</i>  | <i>LT 11-33</i>  |
| <i>Genomospecies 5</i>                              | <i>Semarang</i>   | <i>Saopaulo</i>  | <i>Sao Paulo</i>   |
| <i>Leptospiras sáprofitas</i>                       |   |  |  |
| <i>Genomospecies 3</i>                              | <i>Holland</i>  | <i>Holland</i>   | <i>Waz Holland (P438)</i>  |
| <i>L. biflexa</i>                                   | <i>Semarang</i>   | <i>Patoc</i>   | <i>Patoc I</i>   |
| <i>L. wolbachii</i>                                 | <i>Codice</i>   | <i>Codice</i>  | <i>CDC</i>   |

La *Leptospira* se cultiva en medios artificiales, conteniendo 10% de suero de conejo ó 1% de albúmina bovina sérica (por sus siglas en inglés, BSA) y *tween* 80, a un pH 6,8-7,4; el crecimiento óptimo se alcanza entre 28 y 30 °C. Con el fin de evitar la contaminación del

medio se puede adicionar antibióticos o intercalantes como el 5-fluorouracil y sulfato de neomicina para hacer el medio selectivo. Los medios comúnmente usados son el *Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris medium* (EMJH) el cual contiene 1% BSA y *Tween* 80; Korthoff's y Fletcher's (Céspedes, 2005).

3. Patogenia. El periodo de incubación de la leptospirosis es de 7 a 26 días, con un promedio de 12 días. La bacteria penetra a través de la piel reblandecida por el agua, por excoriaciones o por mucosas y alcanza rápidamente el torrente sanguíneo, diseminándose a todos los órganos, incluyendo líquido cefalorraquídeo (LCR) y humor acuoso (Céspedes, 2005).

En la primera semana, la *Leptospira* se puede encontrar en sangre y LCR, sin ocasionar síntomas neurológicos. Los órganos afectados más frecuentemente incluyen el hígado, riñón, cerebro y músculos. Dentro de las complicaciones está la disfunción hepática que se manifiesta por la disminución de la excreción de la bilirrubina como alteración más frecuente, disminución de los niveles de albúmina sérica, incremento de los niveles de inmunoglobulinas y disminución en la producción de los factores dependientes de la vitamina K. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

La insuficiencia renal aguda por necrosis tubular aguda, es causada por efecto directo de la *Leptospira* sobre el tejido renal, la hipoxia o el depósito de complejos antígeno-anticuerpo-complemento en los glomérulos. La afección vascular, se debe a vasculitis grave con daño endotelial, produciendo lesión en los capilares. En los músculos, las alteraciones varían desde inclusiones vacuolares en las miofibrillas e infiltrado de polimorfonucleares en el tejido muscular, acompañado de elevación de la enzima creatinfosfoquinasa (por sus siglas en inglés CPK). (Lemarroy y Carrillo, 2003)

Después de la primera semana, aparecen los anticuerpos en sangre y coinciden con el desarrollo de meningitis; en esta etapa no se encuentra *Leptospira* en el LCR, lo cual sugiere daño inmunológico. La *Leptospira* puede persistir por semanas en el humor acuoso y ocasionalmente causa uveítis crónica o recurrente. Los elevados niveles de factor de necrosis tumoral alfa (FNT $\alpha$ ) encontrados en pacientes con leptospirosis mortal, contrasta con el buen pronóstico de los niveles normales de esta citoquina, sugiriendo el papel del FNT $\alpha$  en el pronóstico de la enfermedad (Céspedes, 2005).

### C. Transmisión y grupos de riesgo

La infección humana es el resultado de la exposición a la orina infectada de mamíferos portadores, ya sea directamente o vía la contaminación de tierra o agua. Las vías usuales de infección por *Leptospira* son las abrasiones, cortes en la piel y por vía conjuntiva; la infección también puede darse después de la inmersión prolongada en el agua. La transmisión en el agua se ha documentado en muchos brotes de leptospirosis (Céspedes, 2005).

Las infecciones humanas pueden adquirirse a través actividades profesionales, recreativas, o exposiciones involuntarias. La ocupación es un factor de riesgo importante para los humanos. El contacto directo con la orina de los animales infectados puede causar infecciones en granjeros, veterinarios, carniceros, trabajadores que realizan el control de roedores, y otras ocupaciones en el que se tiene contacto con animales (Céspedes, 2005).

El contacto indirecto es importante para los obreros de desagües, mineros, militares, los limpiadores de tanque sépticos, criadores de peces, guardabosques, obreros de canales, agricultores que se dedican al cultivo de arroz, plátanos, caña de azúcar y otros. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

Los ganaderos son un grupo ocupacional de riesgo importante a lo largo del mundo, principalmente asociado a la enfermedad del ganado (mastitis), la presencia del serovar *Hardjo* y el ordeñamiento. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

En los últimos años se han incrementado los casos asociados con actividades recreacionales, particularmente en deportes de agua como natación, canotaje, balseo en agua dulce y pesca en agua dulce; también se ha producido un gran número de casos cuando la exposición ocurre durante eventos deportivos en áreas tropicales. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

Se han reportado varios brotes de leptospirosis asociadas a fuentes de agua, aumentando el riesgo en casos de inundación. Los casos de leptospirosis en las regiones tropicales son debidos a exposiciones accidentales en la que la bacteria se adquiere durante actividades de la vida diaria. Muchas infecciones se han atribuido al caminar descalzo en suelos húmedos o a cultivar un huerto o jardín con las manos desprotegidas. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

Los perros son una fuente importante para la infección humana en muchos países tropicales y puede ser una fuente importante para el inicio de brotes. Las variaciones en los ecosistemas, ya sea por el clima, las migraciones, invasión de selvas vírgenes o las actividades socioculturales de la población, cambian las interacciones entre los seres vivos y modifican las condiciones medioambientales, lo cual afecta notablemente a las poblaciones de reservorios y modifican la transmisión de la leptospirosis. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

Para entender mejor la transmisión de la leptospirosis, Faine *et al.* propone tres modelos epidemiológicos; el primero ocurre en climas templados donde son pocos los serovares que están involucrados en la infección humana y generalmente es por contacto directo con ganado y cerdos. El control se realiza por inmunización de animales o humanos. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

El segundo ocurre en áreas tropicales donde hay muchos serovares que infectan a humanos y animales, además hay un gran número de reservorios como los roedores, animales de granja y perros. La exposición humana no está limitada a la ocupación sino a la contaminación medioambiental, en especial durante la época de lluvias. El control se realiza en roedores, mejorando el saneamiento en estas áreas e higiene profesional para prevenir los casos de leptospirosis humana. Posiblemente son áreas donde ocurran los grandes brotes después de lluvias torrenciales, huracanes u otros desastres. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

El tercer modelo se da cuando la infección en los roedores es llevada al ambiente urbano. Es un caso importante cuando la infraestructura urbana se rompe debido a la guerra o por catástrofes naturales (Céspedes, 2005).

#### **D. Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas de la infección por *Leptospira* varían ampliamente en el ser humano y el clásico síndrome de la enfermedad de Weil representa solamente la presentación más severa. Originalmente se consideró que los distintos síndromes clínicos estaban asociados con serogrupos específicos. Sin embargo, esta hipótesis fue cuestionada por algunas autoridades, e intensos estudios durante los últimos 30 años la han refutado.

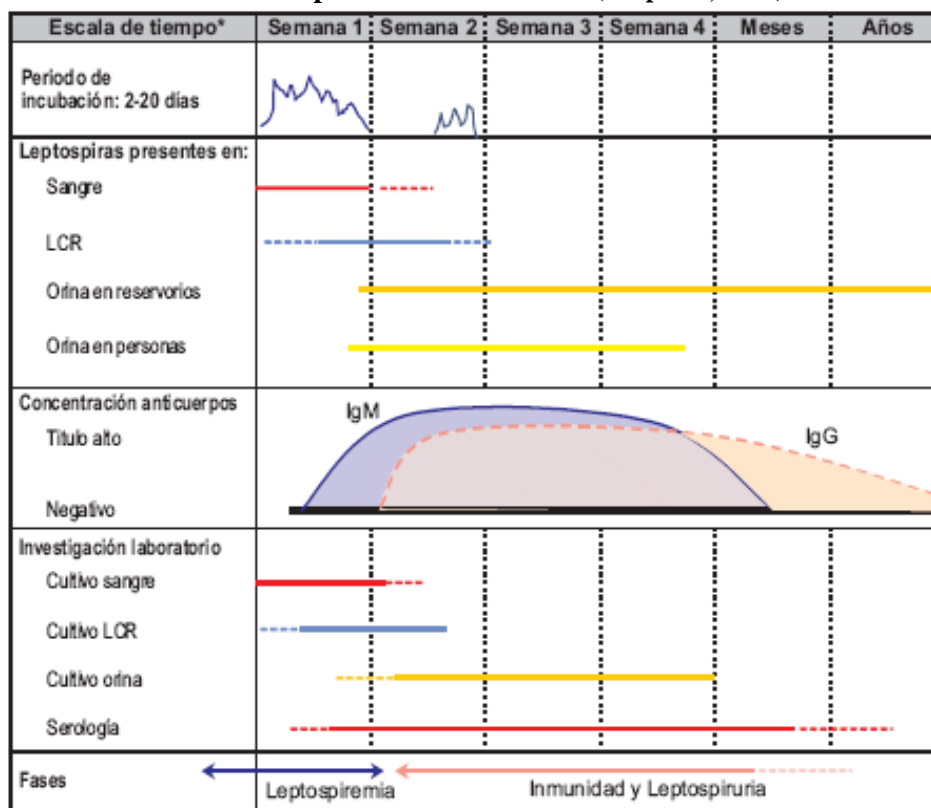
Una explicación de las varias asociaciones observadas puede encontrarse en la ecología de los animales reservorios en una región geográfica. Una región con una fauna altamente variada facilitará una mayor variedad de serogrupos que una región con pocos animales hospederos. En humanos, la leptospirosis severa es frecuente, pero no invariablemente, causada por serovares del serogrupo icterohaemorrhagiae. Los serovares específicos involucrados dependen grandemente de la localización geográfica y de la ecología de los hospederos de mantenimiento locales (Levett, 2001).

La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, donde la fase aguda o septicémica dura aproximadamente una semana, seguida de la fase inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos y excreción de leptospiras en la orina.<sup>11</sup> De las formas clínicas sintomáticas de la enfermedad, el 80-90% evoluciona en una forma anictérica benigna y 10-20% como leptospirosis grave con ictericia e insuficiencia renal (Figura 1). (Céspedes, 2005)

1. Leptospirosis asintomática. La existencia de formas subclínicas se hace evidente cuando se realizan encuestas seroepidemiológicas, donde el 16-40% de personas expuestas a la fuente de infección presentan títulos serológicos de anticuerpos específicos detectables, pero no recuerdan haber tenido manifestaciones clínicas que sugieran de la enfermedad (Céspedes, 2005).

2. Leptospirosis sintomática. La leptospirosis es típicamente una enfermedad bifásica, presentándose una fase inicial (leptospiremia) con una duración de cuatro a siete días, caracterizada por la presencia de las *Leptospira* en sangre y una segunda fase inmune (leptospiruria) caracterizada por la presencia de éstas en la orina, con una duración de 8 a 30 días. Durante esta etapa se puede detectar anticuerpos específicos en circulación. Ambas fases son comunes a las dos formas clínicas de presentación: anictérica e ictericia (Céspedes, 2005).

**Figura 1: Naturaleza bifásica de la leptospirosis y técnicas de investigación relevantes para las distintas etapas de la enfermedad. (Céspedes, 2005)**



Tomado de Céspedes, 2005

a. Leptospirosis anictérica. Este tipo de leptospirosis comienza de forma abrupta, con dolor de cabeza intenso y persistente, dolores musculares en la región lumbar y gemelar, inyección conjuntival, escalofríos y dolor abdominal. Se presentan náuseas, vómitos y un acentuado malestar general con postración. La fiebre es remitente, alcanzando 40°C o más. Con cierta frecuencia se observa un enrojecimiento en la piel de pocas horas de duración, en el área del tronco. Se puede presentar confusión mental, tos, dolor torácico y pequeñas lesiones rojas (exantema petequiral) en el paladar. La evolución de estos casos es usualmente satisfactoria en un periodo de cuatro a diez días (Céspedes, 2005).

Son muy pocos los pacientes que pasan a la segunda fase (fase inmune), donde sólo hay fiebre ligera, dolor de cabeza intenso, señal de meningitis sin signos neurológicos, y con dolor retro-ocular. Hay dolores musculares en las pantorrillas, en los paravertebrales y el cuello, por lo cual existe la posibilidad de confusión con una meningitis viral. Raramente se desarrollan signos neurológicos focales o de encefalitis. A partir de la segunda semana

puede desarrollarse uveítis en uno o ambos ojos, que puede seguir un curso crónico o recurrente. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

b. Leptospirosis icterica (Síndrome de Weil). Es la forma más grave de la enfermedad (pero que representa del 10 al 15% de los casos totales), se caracteriza por las alteraciones de la función hepática y renal, desarrollo de hemorragias, colapso vascular, alteraciones graves de la conciencia y una mortalidad aproximadamente de 5 - 40%. El inicio de la enfermedad es similar a la forma anictérica, pero al cabo de tres a seis días de evolución, los síntomas alcanzan su máxima intensidad. La ictericia es una manifestación constante y está asociada con daño hepatocelular, con predominancia de la bilirrubina directa. (Lemarroy y Carrillo, 2003)

Cuando se presenta la ictericia en la leptospirosis, no está asociada a necrosis hepatocelular y la función hepática retorna a la normalidad posterior a la recuperación. Los niveles de bilirrubinas pueden ser elevados y varias semanas después pueden llegar a la normalización. Sin embargo, la leptospirosis severa puede llegar a una falla multisistémica, siendo la insuficiencia renal aguda una de las complicaciones más frecuentes (Johnson, 2004).

Cuando sucede la insuficiencia renal, puede desarrollarse delirio y convulsiones, junto con la aparición de manifestaciones hemorrágicas diversas y acentuación de la ictericia. Puede aparecer esplenomegalia acompañada de una hepatomegalia dolorosa. Algunos de los pacientes pueden desarrollar frotos pericárdicos sin evidencia de derrames, y en los casos graves, puede desarrollarse insuficiencia cardiaca congestiva y *shock* cardiogénico. (Johnson, 2004).

En los niños, se han descrito manifestaciones que usualmente no se encuentran en los adultos tales como colecistitis calculosa, pancreatitis, dolor abdominal, hipertensión arterial, exantema maculopapular (erupción cutánea con máculas o pápulas delimitadas) con descamación periférica asociada a gangrena y paro respiratorio. Las manifestaciones radiológicas pulmonares consisten en exudados alveolares en ambos campos pulmonares. Son comunes las alteraciones electroradiográficas, así como cambios sugestivos de pericarditis. (Céspedes, 2005).

## E. Identificación molecular de *Leptospiras* y su diagnóstico diferencial

La *Leptospira* aislada puede ser identificada por métodos serológicos, cultivo del microorganismo, o por técnicas moleculares. El cultivo bacteriológico tradicionalmente utilizado presenta la desventaja de que las leptospiras para su multiplicación *in vitro* exigen de medios selectivos y de condiciones especiales, los que prolongan el período de incubación hasta por 6 meses. Esto puede interrumpir el crecimiento de las bacterias por factores como el agotamiento de nutrientes, cambios de pH, excreción de enzimas metabólicas, así como la exposición a posibles contaminantes del medio ambiente (Zamora *et al*, 2007).

Tradicionalmente se utilizó la absorción cruzada y después se utilizaron anticuerpos monoclonales, que han permitido identificar rápidamente los aislados por medio de la prueba de aglutinación microscópica (MAT por sus siglas en inglés) (Céspedes *et al*, 2007). Actualmente, los métodos moleculares son los más utilizados ya que la detección del agente etiológico para la conducta terapéutica adecuada, y para estudios clínicos y epidemiológicos, cada vez se hace más necesaria. Estos nuevos métodos y vías diagnósticas permiten la detección de las leptospiras en estados tempranos por lo que desempeñan un importante papel, como es el caso del PCR (Zamora *et al*, 2007).

1. Identificación de *Leptospira* por métodos moleculares. Los métodos moleculares pueden sustituir el cultivo para la demostración directa de *Leptospira* en muestras humanas o de animales. Los primeros estudios en biología molecular realizados para detectar ADN fueron el *dot blotting* e hibridación *in situ*. Posteriormente se desarrollaron sondas específicas para detectar algunos serovares como el serovar *hardjobovis* y estas fueron aplicadas para la detección de *Leptospira* en muestras de orina de vacunos. Sin embargo, la sensibilidad de estas pruebas marcadas con fósforo 32 alcanzaba ya la detección en más de 100 leptospiras, pero comparándolo con el PCR su sensibilidad era mucho más baja (Zamora *et al*, 2007).

Cuando el PCR se introdujo para el diagnóstico de patógenos, se comenzaron a diseñar varios iniciadores para amplificar el ADN de la *Leptospira*. Los primeros fueron dirigidos a genes específicos, con más frecuencia al 16S ó 23S rRNA cuyos genes son en general más

conservados en todas las bacterias a elementos repetitivos, mientras que otros se han construido a partir de bibliotecas genómicas.

Sin embargo, pocos han demostrado su utilidad para amplificar el ADN de *Leptospira* en humanos o en animales a partir de muestras clínicas; de estos, sólo dos métodos han sido evaluados con la parte clínica y de laboratorio. Se demostró que usando ambos pares de iniciadores, el PCR era más sensible que el cultivo (Céspedes, 2005).

A pesar de estas limitantes, las pruebas moleculares han sido usadas extensamente en estudios clínicos. Estos han sido aplicados a ADN obtenido a partir de muestras de suero, de orina, de humor acuoso, de LCR y tejidos obtenidos después de la autopsia (Levett *et al*, 2005).

Uno de los iniciadores más usados fue el descrito por Merien *et al*. que amplifica el fragmento 331-bp del gen que codifica para rRNA 16S de *Leptospira* patógena y no patógena, mientras que los iniciadores G1 y G2 descritos por Gravekamp *et al*. amplifican serovares patógenos excepto *Leptospira kirschneri* (Levett, 2001).

Una limitación del diagnóstico por PCR de la leptospirosis es la incapacidad de la mayoría de los análisis de PCR para identificar el serovar. Sin embargo, esto no es significativo para el tratamiento de paciente aunque sí tiene un gran valor en la epidemiología y la salud pública. Entre las estrategias para superar estos obstáculos se ha incluido la digestión con enzimas de restricción de los productos de amplificación, la secuenciación directa de amplificadores y el análisis de la conformación de una sola cadena (SSCP por sus siglas en inglés). Para diferenciar entre genomoespecies, después del PCR se separan los productos en geles de poliacrilamida, seguido de tinción con plata; en otros trabajos los amplificadores del PCR no purificados se digirieron con enzimas de restricción para distinguir serovares patógenos y no patógenos (Levett, 2001).

En la actualidad, se ha descrito un PCR cuantitativo en tiempo real, con alta sensibilidad, que permite detectar a la *Leptospira* distinguiendo entre especies patógenas y no patógenas en muestras clínicas y ambientales, permitiendo un diagnóstico rápido, que puede servir incluso cuando el paciente ya ha comenzado su tratamiento antibiótico (Merien *et al*, 1992).

2. Diagnóstico diferencial. El diagnóstico debe realizarse de acuerdo con la presentación clínica de la enfermedad. En las formas anictéricas el diagnóstico diferencial debe establecerse con enfermedades febriles tales como: influenza, dengue, hepatitis virales, neumonía, meningitis virales, mononucleosis, brucelosis, borreliosis, toxoplasmosis. En la forma ictérica (síndrome de Weil), el diagnóstico diferencial debe hacerse con: hepatitis virales, dengue hemorrágico, malaria, fiebre tifoidea, fiebre amarilla, rickettsiosis e infecciones debidas a hantavirus, pielonefritis e intoxicaciones (Merien *et al*, 1992).

Todo paciente con diagnóstico presuntivo de leptospirosis debe ser hospitalizado si es que se presenta los siguientes signos de alarma:

- Fiebre elevada que no cede a antipiréticos (39 °C).
- Vómitos persistentes.
- Dolor abdominal intenso que puede llegar al abdomen agudo.
- Ictericia.
- Manifestaciones hemorrágicas (gingivorragia, hemoptisis, melena, petequias generalizadas).
- Dificultad respiratoria.
- Trastornos hemodinámicos (*shock*).
- Oliguria.
- Signos meníngeos. (Céspedes, 2005)

## **E. Tratamiento**

Para grupos de personas que ingresen a zonas endémicas en forma temporal (personal militar, practicantes de deportes de aventura, brigadistas y otros) se recomienda aplicar, en adultos, doxiciclina 200 mg vía oral (V.O.) una vez por semana, o amoxicilina 500 mg V.O. una vez por semana; en niños amoxicilina 250 mg V.O. una vez por semana. El tratamiento quimioproláctico está recomendado mientras dure la estadía (Céspedes, 2005).

Las medidas terapéuticas de soporte constituyen aspectos importantes y deben ser

iniciadas rápidamente, para evitar las complicaciones renales. La hidratación, de preferencia endovenosa, es la terapia más importante en las formas graves de la enfermedad, ya que los pacientes presentan deshidratación debido a la fiebre, vómitos, diarrea, anorexia y lesiones vasculares (Céspedes, 2005). El tratamiento se basa principalmente en la terapia de soporte, corrección del desequilibrio electrolítico y ácido básico. La antibioticoterapia se debe iniciar lo más temprano posible para evitar las lesiones en los tejidos. El manejo y el tratamiento de leptospirosis de moderado a grave debe ser en forma hospitalaria (Merien *et al*, 1992).

En casos graves con oliguria, se debe tener cuidado con la reposición hídrica excesiva, que puede empeorar la insuficiencia respiratoria, pudiendo llegar hasta insuficiencia cardíaca. Si a pesar de las medidas adoptadas, no mejora la insuficiencia renal se debe indicar precozmente la diálisis peritoneal o derivación a un establecimiento de salud que cuente con unidad de cuidados intensivos (UCI). (Céspedes, 2005)

## **E. Epidemiología**

En lo referente a epidemiología, la distribución de la leptospirosis es mundial, con mayor incidencia en las zonas tropicales, en las regiones con climas cálidos como la costa; actualmente su transmisión ocurre con mayor frecuencia en zonas donde hay expansión poblacional, especialmente en países en vías de desarrollo. Se desconoce su incidencia real, debido a la falta de conocimiento de la enfermedad, a la gran proporción de infección subclínica que puede pasar desapercibida, y a que los métodos de diagnóstico no están disponibles en la mayoría de áreas endémicas. En estudios desarrollados en la selva del Perú, se ha encontrado una proporción alta (20- 30%) con evidencia serológica de leptospirosis aguda en pacientes con síndrome febril indiferenciado. (Céspedes, 2005)

La supervivencia de *Leptospiras* patógenas en el ambiente depende de varios factores, como el pH, temperatura, y la presencia de compuestos inhibitorios. Las *Leptospiras* en el agua, a temperatura ambiente, permanecen viables durante varios meses con un pH de 7,2 a 8,0 bajo las condiciones del laboratorio; la supervivencia en agua de río es más corta pero es prolongada a bajas temperaturas. En aguas servidas domésticas disminuye el tiempo de supervivencia a pocas horas; en tierra ácida (pH 6,2) sobreviven por siete semanas, y en

lodo de tierra por lo menos tres semanas. También se piensa que los residuos de detergentes han reducido la sobrevivencia de la *Leptospira* en los desagües, pues el crecimiento de la misma se inhibe a concentraciones bajas de detergente. Cuando la tierra se contamina con la orina de ratas infectadas la *Leptospira* sobrevive durante aproximadamente dos semanas (Céspedes, 2005).

1. Leptospirosis en Guatemala. En Guatemala las condiciones de pobreza, las deficiencias en la dotación de agua y saneamiento básico, la baja cobertura educativa y la escasa proyección de la red de servicios de salud se reflejan en un perfil socio-sanitario de elevada precariedad. Varios de los problemas de salud son derivados de los bajos niveles de saneamiento ambiental y las deficiencias en la educación en salud de la población. Guatemala ofrece condiciones topográficas favorables para la transmisión de enfermedades como la malaria, el dengue, la enfermedad de Chagas, y la cisticercosis, que constituyen causas importantes de morbilidad de la población guatemalteca; sin embargo, otras enfermedades como la leptospirosis, son raramente diagnosticadas debido a las dificultades que presenta la confirmación de laboratorio (Dirección de Análisis Económico, 2005).

a. Leptospirosis en Escuintla. El Departamento de Escuintla se encuentra situado en la Región V o Región Central del país y la mayor parte de su población está dedicada al cultivo de la caña de azúcar, café, frutas de clima cálido, granos básicos, legumbres, plátanos y plantas de forraje como el sorgo. También es importante la crianza de ganado vacuno, equino y porcino, cuya producción se dedica principalmente a la exportación (Dirección de Análisis Económico, 2005). Así pues, se puede considerar una región de alto riesgo ocupacional de leptospirosis. Asimismo, una considerable parte de la población vive en condiciones de pobreza e insalubridad. Los niveles de pobreza se pueden ver resumidos en el siguiente cuadro:

**Cuadro 2:**

**Departamento de Escuintla: niveles de pobreza, pobreza extrema y valor de la brecha según municipio**

| Municipio                        | Porcentaje de pobreza general | Porcentaje de pobreza extrema | Valor de la brecha de pobreza en quetzales | Valor de la brecha de pobreza extrema en quetzales |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|--|
| <b>Total República</b>           | <b>54.33</b>                  | <b>22.77</b>                  | <b>8,092,819,009.00</b>                    | <b>1,127,047,628.00</b>                            |
| <b>Departamento de Escuintla</b> | <b>35.15</b>                  | <b>4.32</b>                   | <b>156,529,517.40</b>                      | <b>5,491,507.86</b>                                |
| Escuintla                        | 21.72                         | 1.56                          | 19,245,363.97                              | 387,655.34   |
| Guanagazapa                      | 39.29                         | 6.68                          | 4,421,467.21                               | 210,068.28   |
| Iztapa                           | 29.02                         | 2.54                          | 2,890,931.63                               | 93,081.37  |
| La Democracia                    | 33.93                         | 2.93                          | 4,616,346.17                               | 110,310.08   |
| La Gomera                        | 42.78                         | 4.58                          | 17,726,364.76                              | 540,131.87   |
| Masagua                          | 41.04                         | 3.83                          | 9,912,933.39                               | 247,575.28   |
| Nueva Concepción                 | 55.89                         | 10.42                         | 39,851,658.55                              | 1,944,253.23                                       |
| Palín                            | 34.72                         | 4.62                          | 7,316,963.01                               | 278,063.89   |
| San José                         | 27.85                         | 2.29                          | 9,110,844.87                               | 220,952.56   |
| San Vicente Pacaya               | 41.25                         | 8.16                          | 5,000,430.04                               | 272,805.37   |
| Santa Lucía                      | 30.48                         | 2.96                          | 17,239,851.76                              | 464,268.41   |
| Cotzumalguapa                    |                               |                               |  |  |
| Siquinalá                        | 38.04                         | 3.98                          | 3,630,045.89                               | 102,195.45   |
| Tiquisate                        | 38.85                         | 5.35                          | 15,566,316.15                              | 620,146.74   |

Fuente: Estrategia de *reducción de la pobreza*, Gobierno de la República de Guatemala, noviembre de 2001

Y como consecuencia de los altos niveles de pobreza, muchas de las necesidades básicas se encuentran insatisfechas (como agua potable, calidad de vivienda, escolaridad, etc. (ver cuadro 3); lo que aumenta el riesgo de contagio por leptospirosis (Dirección de Análisis Económico, 2005).

Finalmente, enfermedades como la leptospirosis se han diagnosticado (cuadro 4) como brotes ocasionales posteriores a inundaciones (Cifuentes, 2004), pero se sospecha que presentan una prevalencia mucho mayor a la reportada.

**Cuadro 3: Necesidades básicas insatisfechas (porcentaje) según municipio en Escuintla**

| 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                                |

Fuente: elaborado por la Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia (SEGEPLAN), con base en datos del Instituto Nacional de Estadística (INE)

**Cuadro 4: Síntomas y signos encontrados en los casos sospechosos de leptospirosis en Escuintla 2003 (n = 30) (Cifuentes, 2004)**

| Signos y síntomas         | Frecuencia | Porcentaje |
|---------------------------|------------|------------|
| Malestar general          | 11         | 91%        |
| Dolor articular           | 10         | 83%        |
| Cefalea                   | 9          | 75%        |
| Fiebre                    | 9          | 75%        |
| Mialgia                   | 7          | 60%        |
| Dolor ocular              | 6          | 50%        |
| Náusea                    | 6          | 50%        |
| Diarrea                   | 6          | 50%        |
| Congestión de conjuntivas | 4          | 33%        |
| Vómitos                   | 3          | 25%        |
| Ictericia                 | 1          | 10%        |

### **III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN**

#### **A. Objetivo general**

Determinar la incidencia de *Leptospira spp* en pacientes con síndrome icterico, no relacionado a hepatitis viral, en el departamento de Escuintla, Guatemala, a través de la prueba de PCR.

#### **B. Objetivos específicos**

1. Estandarizar la detección de ADN de *Leptospira spp* en muestras de sangre por medio de la técnica de PCR
2. Determinar la incidencia de *Leptospira spp* en pacientes con síndrome icterico que se presenten a la Dirección de Área de Escuintla entre los meses de enero a septiembre de 2007, utilizando la técnica de PCR.
3. Sugerir una definición del cuadro clínico de la leptospirosis relacionando los resultados de las pruebas moleculares y los síntomas clínicos reportados por los pacientes con resultado positivo para presencia de ADN de *Leptospira spp*.
4. Observar si existe alguna correlación entre la presencia de *Leptospira spp*. y la edad, género, o época del año en que los pacientes se presentaban al Centro de Salud del municipio de Escuintla.

#### **C. Hipótesis**

Es posible amplificar ADN de *Leptospira spp* en la sangre de pacientes con ictericia no relacionada a hepatitis viral, provenientes del departamento de Escuintla, Guatemala.

## D. Justificación

Guatemala es un país en vías de desarrollo con una situación socioeconómica bastante precaria, ya que el 54.33% de la población vive en estado de pobreza, y el porcentaje se eleva para la población rural e indígena. La mayor parte de la inversión en el área de salud se destina a problemas de carácter esencial y a mantener en precario funcionamiento hospitales y centros de salud. Según los datos estadísticos 2006 de la Organización Mundial de la Salud, el gasto total en salud como porcentaje del Producto Interno Bruto (PIB) en Guatemala fue de 5.7% en el año 2005; siendo este el nivel más bajo de gasto público en salud de Centroamérica.

Debe señalarse que varios de los problemas de salud son derivados de los bajos niveles de saneamiento ambiental y las deficiencias en la educación en salud de la población. Guatemala ofrece condiciones topográficas favorables para la transmisión de enfermedades por vectores, condiciones que se ven magnificadas por la falta de saneamiento y la existencia de la multiplicidad de depósitos de agua estancada. La malaria se encuentra presente en el 74% de la extensión territorial del país y, junto con el dengue, la enfermedad de Chagas, y la cisticercosis, constituyen causas importantes de morbilidad de la población guatemalteca; otras enfermedades, como la leptospirosis, son raramente diagnosticadas debido a las dificultades que presenta la confirmación de laboratorio.

Así pues, muchos diagnósticos quedan incompletos y/o sin confirmación adecuada. Tal es el caso de los síndromes ictericos en el área de Escuintla, donde son sumamente abundantes y el examen de rutina está destinado a la identificación de Hepatitis viral. Al descartarse esta última, lo cual ocurre en aproximadamente el 30% de los casos, no se realiza la identificación del agente causal por falta de medios, a pesar de que se sospecha de la presencia de *Leptospira spp.* En previas ocasiones se ha identificado dicha bacteria en brotes posteriores a inundaciones, lo que indica la presencia de la misma en el ambiente o en reservorios locales. En estudios realizados en otras partes de Latinoamérica se ha encontrado que entre el 3-11% de estos pacientes con sintomatología indiferenciada tienen resultados serológicos sugestivos de leptospirosis aguda.

Muchos de los síntomas identificados, como rutina de control epidemiológico, coinciden con aquellos asociados a leptospirosis y los factores socio-ecológicos son

propicios para el desarrollo de la enfermedad. Ante estos hechos, se cree que la leptospirosis es una enfermedad importante en la región, pero que ha sido subdiagnosticada hasta la fecha.

Por lo anterior, es importante utilizar métodos de diagnóstico rápidos y seguros, como el PCR, para identificar leptospirosis en esta área, tanto por control epidemiológico como por beneficio directo de los propios pacientes, quienes podrían obtener un tratamiento específico, apropiado y en menor tiempo al identificarse la *Leptospira spp.* como la causa del cuadro icterico presentado. Así mismo, debido a que los métodos de transmisión de la leptospirosis se encuentran bien caracterizados, al momento de identificar *Leptospira spp.* en los pacientes sería posible iniciar medidas rápidamente para evitar su posterior diseminación y transmisión.

## IV. METODOLOGÍA

### A. Área geográfica

Las muestras de pacientes se colectaron en el municipio de Escuintla, que corresponde a la zona sur de Guatemala, con una altura de 346.91 metros sobre el nivel del mar, latitud 14°18'10'', longitud 90°47'02'', y una extensión territorial de 4,384 kilómetros cuadrados (mapa del departamento de Escuintla, Guatemala, dividido por municipios, anexo X, Pág. 66).

Se eligió dicha región debido a sus condiciones particulares: temperatura elevada (con promedio anual de temperatura máxima de 37.2°C), humedad relativa de 79% y distribución abundante de corrientes de agua (con 26,909 Has de extensión de tierra con capacidad muy alta de captación y regulación hídrica), que la hacen óptima para el desarrollo de la leptospirosis. A esto se suman las precarias condiciones sanitarias, ya que el poco control de basureros y desagües favorece la presencia de ratas y otros posibles vectores de la enfermedad. Así mismo, la relativa cercanía con la ciudad capital (58 km) facilitaba el rápido traslado de las muestras hacia el laboratorio donde se realizó el análisis.

### B. Identificación del cuadro clínico asociado

La identificación del cuadro clínico fue realizada por el médico, enfermera o auxiliar de enfermería en turno en el Centro de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) de la ciudad de Escuintla, Escuintla, Guatemala; como parte del protocolo estandarizado de Vigilancia Epidemiológica. La recolección de la información se realizó por medio de entrevista directa, según la **“Ficha epidemiológica nacional de enfermedades transmitidas por alimentos o agua”** (Anexo I, Pág. 46).

### C. Definición de caso

En el estudio, se incluyeron aquellas muestras provenientes de pacientes residentes en el departamento de Escuintla; con edades comprendidas entre los 2 y los 60 años, que

el departamento de Escuintla; con edades comprendidas entre los 2 y los 60 años, que presenten ictericia en los primeros siete días de infección y cuyo análisis para hepatitis viral hubiera resultado negativo. Las muestras a utilizar se recolectaron en período de enero-diciembre del año 2007.

#### **D. Obtención de la muestra de suero**

Se utilizaron 114 muestras de suero, preservadas en tubos cónicos de 1.6 mL, de aquellos pacientes que cumplían con la definición de caso, recolectadas por el personal del Centro de Salud de la cabecera departamental de Escuintla (médico, enfermera o auxiliar de enfermería a cargo). Los datos de los síntomas clínicos se muestran en el cuadro 5.

| <b>Cuadro 5: Sintomatología de los pacientes incluidos en el estudio</b> |   |
|--|---|
| <b>Síntoma</b>   | <b>Porcentaje de pacientes que lo presentaron</b> |
| Fiebre   | 88%   |
| Dolor de cabeza  | 71.9%   |
| Dolor abdominal  | 81.6%   |
| Hepatomegalia  | 64.9%   |
| Inapetencia  | 85.9%   |
| Malestar general   | 81.6%   |
| Vómitos  | 44.7%   |
| Diarrea  | 42.1%   |

Nota: los datos desglosados se muestran en el Anexo IX, Pág. 62

1. Protección del anonimato. Con el fin de generar un sistema de control claro y seguro, tanto para el estudio como para el paciente, se asignó un código numérico a cada muestra. El código consistía en un número de tres dígitos correspondiente al orden cronológico de recepción de la muestra en el Centro de Salud. De esta manera, los resultados de la prueba de PCR no podrán ser relacionados al nombre del paciente, ya que todo análisis posterior se proseguirá únicamente con el correspondiente número de código.

### **E. Traslado y almacenamiento de muestras**

Las muestras se recogieron directamente en el Centro de Salud del municipio de Escuintla y se trasladaron al laboratorio en hielera portátil, con hielo, y en sistema de triple embalaje. En el laboratorio se colocaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

### **F. Extracción del ADN a partir de la muestras de suero o plasma**

La extracción de ADN se realizó en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, para lo cual fue necesario realizar una propuesta para desarrollar proyectos y cursos extraordinarios en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología, Anexo V, Pág. 51. Se hizo uso de medidas de bioseguridad tipo II, por tratarse de muestras potencialmente patógenas, según el manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés). Así mismo, se verificó que el equipo de bioseguridad tipo II (campana de bioseguridad II, modelo 36201, Labconco) estuviera en condiciones apropiadas para su uso; los resultados de las pruebas de funcionamiento de la campana se muestran en el anexo VI, Pág. 55.

Se utilizó un método basado en el desarrollado por Boom *et al.*, 1991 y Boom *et al.*, 1990 como se detalla a continuación:

1. Se mezcló un volumen de muestra con 9 volúmenes de solución reguladora de lisis (anexo II, Pág. 47) en un tubo cónico de 1.5 mL.
2. Se incubó con agitación por 10 min a temperatura ambiente
3. Se centrifugó (en una minicentrífuga MiniSpin® Eppendorf) por 15 min a 10,000 g
4. El sobrenadante se removió por succión y se descartó.
5. Luego se añadió 1 mL de la solución reguladora de lavado, y se centrifugó 1 min a 10,000 g. Esto se repitió una vez más.
6. Este sedimento se lavó dos veces más con 1 mL de etanol 70% (v/v) (1 min a 10,000 g) y otra vez con 1 mL de acetona (1 min a 10 000 g)

7. El sedimento se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente.
8. El ADN se diluyó en 125 uL de agua destilada

### **G. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se utilizaron los iniciadores descritos por Bal *et al.*, 1994, que amplifican la Pre-proteína translocasa, *sec Y*, del cromosoma 1 de leptospiras patógenas (secuencia específica del gen en Anexo IV, Pág. 39).

1. Iniciadores y tamaño de los productos de PCR

G1 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3'

G2 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3'

Tamaño estimado del producto: 285 bp.

- Para el control interno del PCR se utilizó el gen de la  $\beta$ -actina humana, con los siguientes iniciadores (Chen *et al.*, 2002):

5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3'

5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGGGCC-3'

Tamaño estimado del producto: 717 bp.

2. Reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla para la reacción de PCR (para un volumen final de 50  $\mu$ l) se preparó según lo siguiente:

**Cuadro 6: Composición de la mezcla de reacción utilizada para PCR**

|   | <b>Cantidad</b> | <b>Concentración de la solución madre</b> | <b>Concentración final</b> |
|---|-----------------|---|----------------------------|
| Iniciador sentido   | 0.5 $\mu$ L     | 100 $\mu$ M                               | 1 $\mu$ M                  |
| Iniciador contrasentido   | 0.5 $\mu$ L     | 100 $\mu$ M                               | 1 $\mu$ M                  |
| deoxinucleótidos trifosfato (dNTP-mix por sus siglas en inglés) | 1.0 $\mu$ L     | 12.5 mM                                   | 0.25 mM                    |
| solución reguladora para PCR                                    | 5.0 $\mu$ L     | 10X                                       | 1X                         |
| MgCl <sub>2</sub>   | 6.0 $\mu$ L     | 25 mM                                     | 3 mM                       |
| ADN polimerasa ( <i>Taq</i> )                                   | 0.2 $\mu$ L     | 5 U/ $\mu$ L                              | 0.25 U/ $\mu$ L            |
| Agua destilada-desionizada                                      |                 |   |                            |
| ADN   | 30.0 $\mu$ L    |   |                            |

Si se procesaba más de una muestra, las cantidades de componentes se multiplicaban por el número de muestras y se transfería en alícuotas a los tubos de PCR. En cada corrida se utilizó un control positivo (de muestra inoculada intencionalmente con cepa de referencia), y control negativo (de muestra de sangre no infectada). Así mismo, para cada muestra se también se realizó una reacción con iniciadores específicos para  $\beta$ -actina humana, como control interno de PCR. Este último control permitía determinar si la reacción de PCR realizada había sido efectiva o no; ya que amplifica específicamente genes que de forma segura se encontraban en las muestras de sangre.

La reacción se realizó en un termociclador Apollo, ATC201, con el siguiente programa:

· 5 min a 94°C para separar las hebras de ADN. Esto es seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°, 1 min de 55°C, y 2 min a 72°C. Con una extensión final a 72°C por 10 min. El producto se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

## H. Electroforesis

1. Preparación del gel. El procedimiento realizado para preparar el gel de agarosa fue el

siguiente:

- Se preparó 40 mL de gel al 2% (p/v) en TAE (Solución reguladora Tris-Acetato) 1X (a partir de TAE 50X) y agarosa en polvo.
- La agarosa se disolvió en TAE 1X en el microondas o en baño de María.
- La solución se vertió en la bandeja de geles y se esperó que polimerizara (aproximadamente 15-20 minutos)
- La bandeja con el gel se colocó en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con solución reguladora 1X hasta cubrir por completo el gel.
- Luego, se cargaron las muestras en el gel, utilizando una punta fina (de 0.5-10 $\mu$ L); y se registraron los volúmenes cargados de muestra y de escalera, así como también el tiempo de corrida y los parámetros de voltaje.

2. Electroforesis. Se mezclaron cinco volúmenes de la solución conteniendo ADN, con un volumen de la solución reguladora de muestra 6X. Para realizar esta mezcla, se añadió 1  $\mu$ L de solución reguladora de muestra sobre un pedazo de lámina extensible de parafina y se añadieron 5  $\mu$ L de cada una de las muestras de ADN, mezclado completamente por pipeteo.

Luego se procedió a cargar cuidadosamente la muestra en los pocillos, evitando la contaminación de pocillos contiguos. Se utilizó un marcador estándar de masa molecular de ADN (Gene Choice, DNA Ladder II de 1000 a 100 bp) para estimar la masa molecular del producto obtenido.

Una vez finalizada la colocación del ADN en los pocillos, se ajustaron los parámetros de voltaje (85 voltios), amperaje (400 A), y tiempo (40 min). Finalizada la electroforesis, se procedió al desmontaje del equipo empezando con desconectar los electrodos de la fuente de poder, ya apagada, y remover el sistema que contiene el gel de agarosa.

3. Coloración y visualización del ADN usando bromuro de etidio. El procedimiento realizado fue el siguiente:

- El gel de agarosa se sumergió en un envase conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 1  $\mu$ g/mL y se dejó incubando por 5 minutos en reposo.

- Después, el gel se lavó cuidadosamente en abundante agua, por 3 minutos.
- El gel se trasladó hacia un transiluminador de luz UV.
- Después de observar los resultados, el gel se descartó en un recipiente con carbón activado, y posteriormente se calentó hasta el punto de fundición para desecharlo normalmente.

\*\* Toda la manipulación del bromuro de etidio fue realizado bajo estrictas normas de contención, y con doble guante, debido a la toxicidad del reactivo.

### **I. Control positivo y determinación de la sensibilidad del PCR**

Para preparar el control positivo de ADN de *Leptospira* y determinar el límite de detección del PCR se realizó la extracción y amplificación de ADN de cinco diluciones seriadas, a partir de una suspensión de leptospiros de concentración conocida. Debido a que para preparar la suspensión se utilizaría un cultivo de leptospiros, todos los procedimientos se realizaron bajo estrictos niveles de bioseguridad tipo II, y se contaba con recipientes para material de descarte infeccioso debidamente rotulado. Antes del trabajo, se limpió debidamente toda el área de trabajo (campanas, mesas, etc.), así como el equipo (microscopio, micropipetas, centrífuga, etc.); utilizando etanol 70% (v/v). en el caso de la campana, luego de haber limpiado con etanol, se colocó la luz UV por 15 minutos antes de empezar el trabajo.

El cultivo con la cepa de *Leptospira interrogans* serovar icteroahemorrhagiae y serovar sejroe se obtuvo de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) y fue transportado en un sistema de triple embalaje hacia el laboratorio, e inmediatamente fue centrifugado, y diluído en 300  $\mu$ L de agua destilada. Todos los desechos fueron debidamente inactivados con cloro y descartados.

Se tomó 10  $\mu$ L de esta dilución y se colocaron en una cámara de conteo, esta se colocó en el microscopio de campo oscuro y se observó con un aumento 40X. De esta suspensión, ahora de concentración conocida, se tomó 10  $\mu$ L y se inoculó 1 mL de suero de un individuo normal, sin historia clínica de leptospirosis ni hepatitis (dilución 1), a partir

del cual se realizaron 4 diluciones seriadas. La concentración de estos se calculó por medio del factor de dilución. La extracción, amplificación y visualización de ADN se realizó de la manera previamente descrita y a partir de los inóculos de los cuales se obtuvo resultados satisfactorios se tomó material para utilizar como el control positivo.

## **J. Análisis epidemiológico**

De las muestras recolectadas, se utilizaron los datos de edad, género, lugar de procedencia, fecha de ingreso y sintomatología, recolectados en la “**Ficha epidemiológica nacional de enfermedades transmitidas por alimentos o agua**” (Anexo I, pag. 34) para estimar si existe una correlación entre dichos factores y los resultados de presencia o ausencia de leptospirosis obtenidos a partir de la prueba de PCR (Anexo II, pag. 35). La correlación se calculó por medio de una prueba exacta de Fisher utilizando el software GraphPad versión 2002-2005, disponible en línea <http://www.graphpad.com>, para cálculos científicos.

## V. RESULTADOS

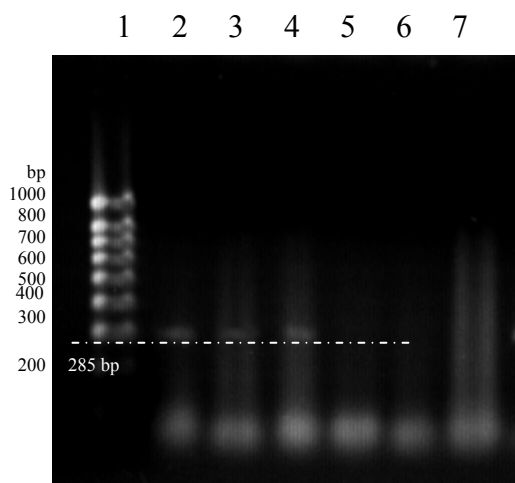
### A. Control positivo y Estandarización de la amplificación de ADN de *Leptospira* por PCR

El control positivo se preparó a partir de un cultivo de *Leptospira interrogans* serovar sejoje, proporcionado por la Facultad de Farmacia de la USAC. Previo a la extracción de las ADN de las bacterias, se realizó el conteo de Leptospiras en suspensión, utilizando un microscopio de campo oscuro. El resultado del conteo realizado fue de 22,240 leptospiras por mL<sup>-1</sup>. De esta suspensión, se diluyeron 10 µL en suero de un individuo sano, sin historia clínica de leptospirosis, ni hepatitis, para obtener muestras infectadas artificialmente. Utilizando diluciones seriadas se obtuvieron cinco diferentes concentraciones de *Leptospira interrogans* en suero humano, mostradas en el cuadro 7.

**Cuadro 7: Conteo de *Leptospira interrogans* serovar sejoje inoculadas artificialmente en suero**

| <b>Dilución<br/>(µL/mL suero)</b> | <b>Concentración<br/>(leptospiras/mL)</b> |
|-----------------------------------|---|
| 10                                | 2,240                                     |
| 1                                 | 224                                       |
| 0.1                               | 22  |
| 0.01                              | 2   |
| 0.005                             | 1   |

Utilizando estas diluciones se realizó la extracción del control positivo y la prueba de PCR, en las condiciones descritas previamente. Como puede notarse en la figura 2, se obtuvo amplificación para las diluciones de 10, 1.0 y 0.1 µL/mL de suero, por lo que la concentración de ADN de *Leptospira* en las mismas era suficiente para ser detectado con el método propuesto.

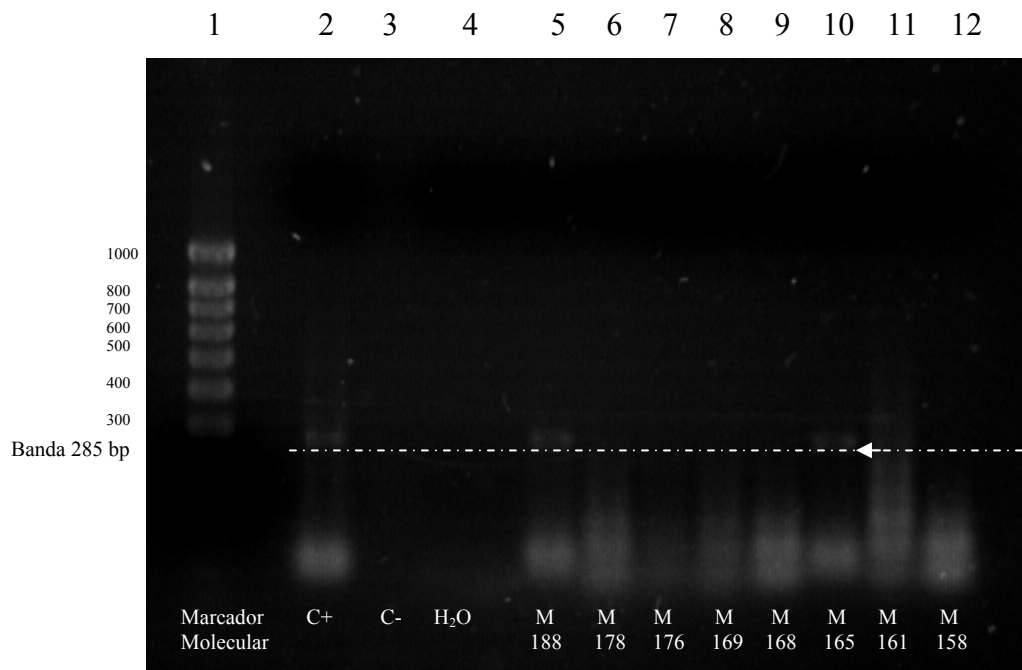


**Figura 2.** Gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación del gen la Pre-proteína translocasa, *sec Y*, del cromosoma 1 de *Leptospiras* patógenas en suero inoculado a distintas concentraciones con *Leptospira interrogans* serovar serjoe (1 = marcador molecular, 2 = 2,240 células/mL, 3 = 224 células/mL, 4 = 22 células/mL, 5 = 2 células/mL, 6 = 1 célula/mL, 7 = control negativo)

Con base a estos resultados, se utilizó la dilución de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de suero como control positivo para las reacciones de PCR y se determinó que el límite de detección era de 22 *Leptospiras* por  $\text{mL}^{-1}$  de suero. Asimismo, no se obtuvo amplificación de ADN en el suero del individuo sano que no fuera inoculado intencionalmente con *Leptospiras*.

## B. Análisis de las muestras

Durante el año 2007, al Centro de Salud de Escuintla se presentaron 259 pacientes con síndrome icterico; de estos, 121 (46.7%) resultaron con pruebas negativas para hepatitis A, B ó C. De dichas muestras, 114 (94.2%) cumplían con los criterios de inclusión de la definición de caso de probable leptospirosis, por lo que se analizó los sueros de dichos pacientes a través de la prueba de PCR para amplificación del gen la pre-proteína translocasa, *sec Y*, del cromosoma 1 de *Leptospiras* patógenas. Obtuve resultados positivos solamente en dos de las 114 muestras evaluadas (figura 3), lo cual representa el 1.7% con un intervalo de confianza al 95% del 0.09 al 6.57%.

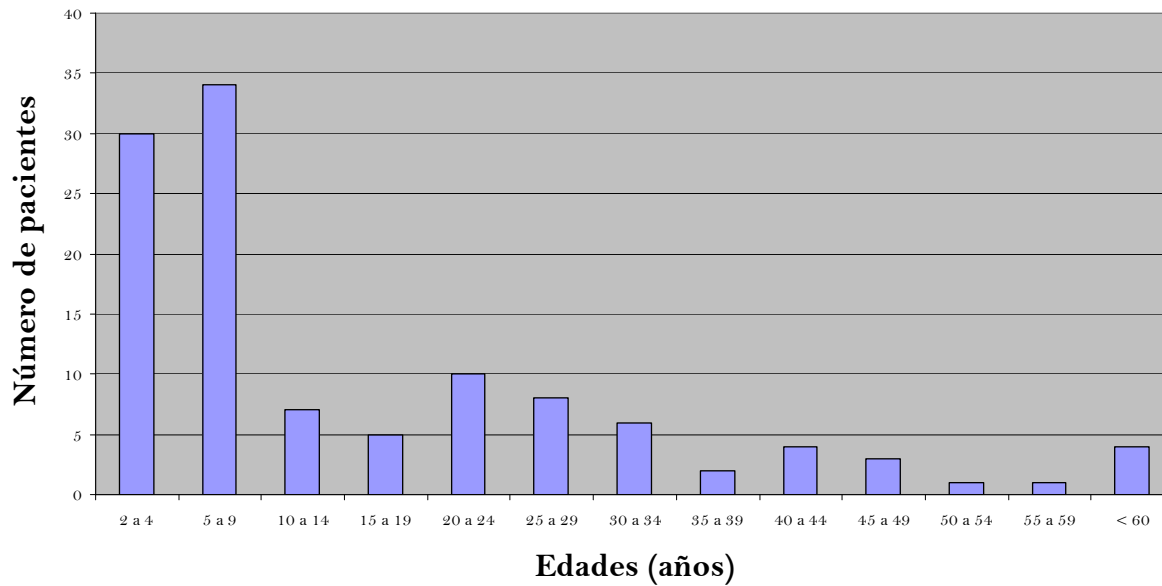


**Figura 3.** Gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación de de amplificación del gen la Pre-proteína translocasa, sec Y, del cromosoma 1 de *Leptospiras* patógenas, con las muestras de suero con resultados positivos para leptospirosis. 1, marcador molecular. 2, control positivo. 3, control negativo. 4, control de reactivos (H<sub>2</sub>O). 5, muestra 188 (flecha = resultado positivo). 6, muestra 178. 7, muestra 176. 8, muestra 169. 9, muestra 168. 10, muestra 165 (flecha = resultado positivo). 11, muestra 161. 12, muestra 158.

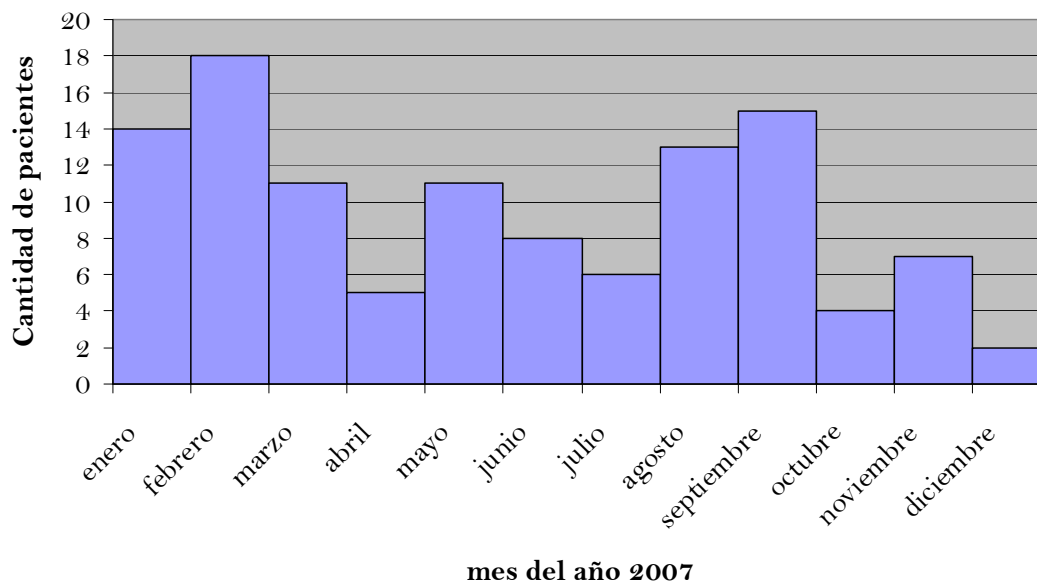
### C. Datos epidemiológicos

De las muestras incluidas en el estudio, 59 eran de mujeres (51.3%) y 71 eran de personas menores de 14 años (61.7%), gráfico 1. Las épocas del año 2007 con mayor cantidad de pacientes con síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral fueron los meses de la época seca fría (febrero) y la época lluviosa (septiembre), gráfico 2. Los municipios con mayor número de probables casos fueron Santa Lucía Cotzumalguapa con 41 (36%) de las muestras incluidas, y Escuintla con 33 (30%) respectivamente (cuadro 8).

**Gráfico 1: Distribución según edades de los pacientes que cumplían con la definición de caso**



**Gráfico 2: Mes del año en el que el paciente se presentó al Centro de Salud**



**Cuadro 8: Distribución de las muestras evaluadas según el municipio de residencia del paciente**

| Municipio                 | Número y porcentaje de muestras evaluadas (n = 114) |
|---------------------------|---|
| Santa Lucía Cotzumalguapa | 41 (36%)  |
| Escuintla                 | 33 (30%)  |
| Siquinalá                 | 12 (11%)  |
| Puerto de San José        | 11 (10%)  |
| Masagua                   | 5 (5%)  |
| Tiquisate                 | 3 (3%)  |
| Palin                     | 2 (2%)  |
| San Vicente Pacaya        | 2 (2%)  |
| Iztapa                    | 1 (1%)  |

La información epidemiológica y clínica de los dos casos en los que se obtuvo resultados positivos para amplificación de ADN de *Leptospira* a partir de las muestras de suero se presentan en el cuadro 9.

**Cuadro 9: Datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes con resultados positivos para leptospirosis por medio de PCR a partir de muestras de suero**

|  | Caso 1     | Caso 2                    |
|--|------------|---------------------------|
| Edad   | 8 años     | 5 años                    |
| Género                                       | Masculino  | Masculino                 |
| Mes en el que se presentó al Centro de Salud | Septiembre | Agosto                    |
| Lugar de procedencia                         | Escuintla  | Santa Lucía Cotzumalguapa |
| Síntomas                                     |            |                           |
| Ictericia                                    | Presente   | Presente                  |
| Fiebre                                       | Presente   | Presente                  |
| Dolor de cabeza                              | Presente   | Ausente                   |
| Dolor abdominal                              | Presente   | Ausente                   |
| Hepatomegalia                                | Presente   | Presente                  |
| Inapetencia                                  | Presente   | Presente                  |
| Malestar general                             | Ausente    | Ausente                   |
| Vómitos                                      | Presente   | Ausente                   |
| Diarrea                                      | Presente   | Ausente                   |

Los resultados de la prueba de Fisher bilateral, para los datos epidemiológicos se muestran en el cuadro 10, donde se puede observar que no se obtuvieron valores de P estadísticamente significativos para relacionar las variables evaluadas con la presencia o ausencia de ADN de *Leptospira* en los pacientes evaluados.

**Cuadro 10: Relación entre distintas variables y la detección de ADN de *Leptospira* por medio de la prueba de PCR**

| Variable      |                 | Prueba de PCR para detectar ADN de <i>Leptospira</i> |             | Valor P |
|---------------|-----------------|--|-------------|---------|
|               |                 | Positiva   | Negativa    |         |
| Edad          | Menor de 9 años | 2 (1.7%)   | 62 (54.4%)  | 0.521   |
|               | Mayor de 9 años | 0 (0%)   | 50 (43.86%) |         |
| Género        | Femenino        | 0 (0%)   | 59 (51.3%)  | 0.2349  |
|               | Masculino       | 2 (1.7%)   | 54 (47.4%)  |         |
| Época del año | Lluviosa        | 2 (1.7%)   | 55 (48.3%)  | 0.5083  |
|               | Seca            | 0 (0%)   | 57 (50%)    |         |

Se elaboraron tablas de contingencia de 2 x 2 entre cada una de las variables y el resultado de la prueba de PCR para amplificación de ADN de *Leptospira*. \*P < 0.05, estadísticamente significativo

## VI. DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio fue determinar la incidencia de leptospirosis en pacientes con síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral por medio de la prueba de PCR para la amplificación del gen de la pre-proteína translocasa, *sec Y*, del cromosoma 1 de *Leptospiras* patógenas.

En Guatemala, el procedimiento rutinario para la determinación de infecciones por leptospiras es el ELISA, que tiene la desventaja de estar basado en la respuesta inmune del paciente frente a las leptospiras, por lo que es poco sensible en los primeros días de enfermedad, cuando todavía no se han generado anticuerpos, y por tanto puede ser inoportuno para el inicio del tratamiento. La técnica de PCR tiene la ventaja de ser sumamente sensible en la fase aguda de la enfermedad. El diagnóstico precoz en leptospirosis es necesario sobre todo en las formas graves de la enfermedad, ya que en estas la evolución sin tratamiento puede resultar fatal en un 5-15% de los casos. A la fecha, el MSPAS no realiza pruebas de PCR para leptospirosis y esta no se encuentra disponible al público en el sector de diagnóstico clínico.

En estudios reportados previamente (Gravekamp *et al*, 1993) se ha descrito un método de PCR para la amplificación del gen de la pre-proteína translocasa, *sec Y*, del cromosoma 1 de *Leptospiras* patógenas, por medio de los iniciadores G1 y G2, para el cual se ha reportado un fragmento cuyo tamaño es de 285 pares de bases. Con base en éste, otros estudios han reportado sensibilidades de 10 leptospiras por mL<sup>-1</sup> (Wangroongsarb *et al*, 2005) e incluso 1 leptospira por mL<sup>-1</sup> (Bal *et al*, 1994), en muestras de suero. Sin embargo, también es importante considerar que en estos casos se utilizaron sondas marcadas para la observación de los resultados, lo que eleva los costos de procedimiento. Para este estudio, se utilizó la tinción con bromuro de etidio debido a lo económico del método; y la facilidad y rapidez que ofrece.

Para este estudio, se realizó una curva de calibración con el objeto de establecer el límite de detección del PCR y para estandarizar las condiciones de la prueba. Inicialmente se hizo un conteo de células de *Leptospira interrogans* serovar serjoe en un microscopio de campo oscuro, y se llevaron a cabo diluciones seriadas en suero humano sano (cuadro 7).

Las bandas de esta amplificación se ubicaron por debajo de los 300 pares de bases, lo que concuerda con el resultado esperado de 285 bp correspondientes al fragmento amplificado del gen de la pre-proteína translocasa, *sec Y*, del cromosoma 1 de leptospiras patógenas. Dichas bandas se pudieron observar en los sueros con 2,240 células/mL, 224 células/mL y 22 células/mL, por lo que se tomó ésta última concentración como el límite de detección de los procesos de extracción y amplificación utilizados en ADN extraído de cultivo de *Leptospira interrogans* serovar serjoe. Por debajo de 22 células/mL, la prueba de PCR es limitada para la detección del material genético de leptospira. (cuadro 7 y figura 2). Estos resultados se consideraron satisfactorios y de sensibilidad aceptable, dado que en los casos de leptospirosis sintomática la concentración de leptospiras en suero varía de  $10^1$  hasta  $10^4$  leptospiras por  $\text{mL}^{-1}$ .

Considerando que el método de detección era efectivo para los propósitos del estudio, se analizaron las muestras de suero de aquellos pacientes cuyas características cumplían con la definición de caso propuesta en la metodología y fue posible detectar ADN de leptospira en al menos 1.74% de ellas, con un intervalo de confianza al 95% de 0.09 al 6.57. Estos resultados podrían reflejar una baja incidencia de leptospirosis en personas con síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral en el lugar y período evaluado. En el análisis estadístico, no se obtuvo resultados estadísticamente significativos (ver cuadro 10) para correlacionar los rangos de edad, género, o época del año en la cual acudió el paciente al Centro de Salud de Escuintla, con los resultados de la prueba de PCR para amplificación de ADN de leptospiras patógenas.

Estos resultados pueden explicarse de dos formas, (1) que la baja detección de ADN de *Leptospira interrogans* corresponda a una baja incidencia de la enfermedad dentro del grupo de pacientes estudiados o (2) a que los métodos utilizados pudieran tener limitantes para detectar todos los posibles casos.

Las muestras con resultado positivo para la amplificación de ADN de leptospira por PCR corresponden al tercer trimestre del año, durante el cual se presentó el mayor número de casos de pacientes con síndrome icterico no asociado a hepatitis viral en la Dirección de Área de Salud (DAS) de Escuintla. Durante este trimestre la época lluviosa se encuentra completamente instalada en la región, lo que tiene una repercusión directa sobre la

exposición de los pacientes a posibles fuentes de contagio de enfermedades como la leptospirosis. En el primer trimestre del año se presentó también una elevada cantidad de pacientes con sintomatología incluyente, pero por las condiciones ambientales de esa época, los riesgos de contagio con leptospirosis son menores que en el tercer trimestre

En lo que respecta al rango de edad, se observa un alto porcentaje (61.7%) de pacientes con síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral dentro de la población comprendida entre los 2 y 14 años de edad. Asimismo, las muestras donde se determinó la presencia de ADN de leptospira correspondían a pacientes dentro de este rango de edad. Estos datos permitirían asumir que los riesgos ocupacionales para contraer leptospirosis en este caso son relativamente bajos, ya que la población económicamente activa presentó bajas frecuencias de posible sintomatología de esta enfermedad; y que los riesgos fueran más bien ambientales. Entre los riesgos ambientales de mayor consideración se pudieran mencionar contacto con aguas estancadas contaminadas con orina de animales infectados y el contacto directo con orina de roedores o animales infectados.

En lo referente a la metodología utilizada, uno de los principales factores que determinaron la calidad de las muestras utilizadas fueron el manejo y almacenamiento de las muestras previo a su procesamiento. Es de notar que sobre estos parámetros no se tuvo control directo, dado que fueron colectadas por el personal del Centro de Salud de Escuintla. De esta forma, no se puede asegurar por ejemplo, la continuidad de la cadena de frío de las muestras. Si el manejo y el almacenamiento de las muestras no hubiera sido el adecuado, el ADN de la bacteria podría haberse degradado y por lo mismo no haber podido detectarse. Asimismo, las muestras fueron almacenadas sin ningún tipo de preservante, como glicerol, que ayudara a estabilizar los componentes de las mismas; y por lo tanto estaban susceptibles a degradarse durante los procesos de congelación y descongelación.

De la misma manera, debido a la sensibilidad obtenida en el proceso de PCR, el nivel de bacteremia influyó sin duda en la posibilidad de detección por este método. La concentración de leptospiras varía considerablemente desde la fecha de inicio de la fase leptospirémica hasta el momento cuando se alcanza la carga de riesgo vital de  $10^4$  leptospiras por  $\text{mL}^{-1}$  (Truccolo *et al*, 2001). Por esto, en los pacientes que acuden al Centro de Salud durante los últimos días de la fase aguda, la concentración de leptospiras sería

muy baja para detectarla con el método estandarizado. Así pues, si naturalmente se esperaba reconocer solamente aquellos pacientes con leptospirosis en fase leptospirémica, de acuerdo a la sensibilidad del método, se podría concluir que en este estudio solamente se pudo reconocer aquellos pacientes con leptospirosis en fase aguda con una concentración relativamente elevada de leptospiras en el suero. Es muy posible que el ADN de los pacientes con bacteremias menores a 22 leptospiras por mL<sup>-1</sup> de suero no fuera detectado.

De esta manera, según los resultados obtenidos, cabe indicar que sería de valiosa importancia extender este tipo de estudio, tanto en número de muestras, área geográfica y en tiempo; con el fin de proporcionar datos más amplios sobre la incidencia de leptospirosis y la etiología del síndrome icterico no relacionado a hepatitis viral en Guatemala. Asimismo, en los casos en los que se descarte tanto hepatitis viral como leptospirosis en pacientes con síndrome icterico, es importante buscar otros posibles diagnósticos diferenciales con el fin de identificar la etiología de los mismos.

## VII. CONCLUSIONES

1. La prueba de PCR descrita en este estudio es eficiente para la detección de ADN de *Leptospira interrogans* en muestras de suero. El límite de detección fue de 22 leptospiras por mL<sup>-1</sup>.
1. Fue posible detectar ADN de *Leptospira spp* en al menos un 1.7% de los pacientes con síndrome icterico que se presentaron a la Dirección de Área de Escuintla entre los meses de enero a septiembre de 2007, con un intervalo de confianza al 95% del 0.09 al 6.57.
2. El cuadro clínico común de los pacientes con síndrome icterico a los que se les detectó ADN de *Leptospira spp* fue ictericia, fiebre, dolor de cabeza, hepatomegalia e inapetencia.
3. Con base a la población analizada, en el periodo evaluado, no se pudo determinar una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de ADN de *Leptospira interrogans* y la edad, género o época de procedencia de las muestras.

## VIII. RECOMENDACIONES

En este estudio se utilizó como principal característica diferencial la presencia de ictericia en los pacientes. Sin embargo, dicho síntoma es característico de la leptospirosis sintomática icterica (síndrome de Weil), y sería importante realizar estudios en poblaciones con sintomatología presuntiva de leptospirosis, sin ictericia, para poder obtener un mayor espectro de la incidencia de la enfermedad. Utilizar otros tipos de muestras, como orina, permitiría obtener resultados sobre la enfermedad en otras etapas de su curso y complementar la detección con técnicas serológicas, para detectar la enfermedad incluso en la fase de leptospiruria. Para incrementar la sensibilidad del método, también sería importante evaluar la eficiencia de la detección de ADN de *Leptospira* por medio de PCR anidado, bajo las mismas condiciones, y determinar si es posible lograr un mayor rango de detección utilizando esta variante de PCR. De la misma manera, utilizar otro tipo de formato de recolección de muestras, que permitiera preservarlas mejor; como papel filtro especial para extraer ADN, permitiría una detección más efectiva y ofrecería la ventaja de que puede almacenarse a temperatura ambiente. Finalmente, implementar un control interno para el PCR, que permitiera evaluar si la reacción individual de cada tubo se realizó correctamente sería de utilidad.

## IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Bal, A., Gravekamp, C., R. Hartskeerl, J. de Meza-Brewster, H. Korver, W. Terpstra. 1994. **Detection of Leptospire in Urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis.** *Journal of Clinical Microbiology.* 32(8): 1894-1898
2. Boom, R., Sol, C., M. Salimans, C. Jansen, P. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa. 1990. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** *Journal of Clinical Microbiology.* 28(3): 495-503
3. Boom, R., Sol, C., R. Heijntink, P. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa. 1991. **Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum.** *Journal of Clinical Microbiology.* 29(9): 1804-1811
4. Centers for Disease Control – National Institutes of Health (CDC-NIH). Departamento de Salud y Servicios Humanos. 1999. **Bioseguridad en los laboratorios de microbiología y biomedicina.** 4ta edición. Atlanta. Disponible en la World Wide Web: [www.cdc.gov/od/ohs/pdf/bmbl4\\_spanish.pdf](http://www.cdc.gov/od/ohs/pdf/bmbl4_spanish.pdf)
5. Céspedes, M. 2005. **Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente.** *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 22(4): 290-307
6. Céspedes, M., Tapia, R., L. Balda, D. González, C. Peralta, P. Condori. 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
7. Chen, C., Bhalala, H., H. Qiao, J. Dong. 2002. **A possible tumor suppressor role of the KLF5 transcription factor in human breast cancer.** *Oncogene. Nature.* (21): 6567-6572
8. Cifuentes, J. 2004. **Informe Final del estudio de Brote de Leptospirosis, municipio Managua, Escuintla, julio 2003.** Disponible en la World Wide Web: <http://desastres.cies.edu.ni/digitaliza/tesis/t294/secciona6.pdf>
9. Costa, M., Ravara, A., M. Cota. 2006. **Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis.** *Journal of*

*Microbiological Methods.* (65): 247-257

10. Dirección de Análisis Económico; Ministerio de Economía de Guatemala. 2005. **Departamento de Escuintla.** Disponible en la World Wide Web: <http://www.mineco.gob.gt/mineco/analisis/departamentos/escuintla.pdf>
11. Faine, S., Adler, B., C. Bolin, P. Perolat. 1999. ***Leptospira* and leptospirosis.** 2a edición. Medisci. Melbourne, Australia.
12. Gravekamp, C., van de Kemp, H., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G., van Eys, G., Everad, C., Hartskeerl, R., Terpstra, W. 1993. **Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers.** *J. Gen. Microbiol.* (139): 1691-1700
13. Humberd, C., Murria, C., S. Stuart, B. Reeb, D. Hospenthal. 2005. **Short Report: Enumerating Leptospires Using the Coulter Counter.** *Am. J. trop. Med. Hyg.* 73(5): 962-963
14. Johnson, M., Smith, H., P. Joseph, R. Gilman, C. Bautista, K. Campos, M. Cespedes, P. Klatsky, C. Vidal, H. Terry, M. Calderon, C. Coral, L. Cabrera, P. Parmar, J. Vinetzii. 2004. **Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru.** *Emerging Infectious Diseases.* 10(6): 1016-1022
15. Kositanont, U., Rugsasuk, S., A. Leelaporn, D. Phulsuksombati, S. Tantitanawat, P. Naigowit. 2006. **Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 57: 117-122
16. Lemarroy, D. Carrillo, V. 2003. **Leptospirosis y disfunción orgánica múltiple. Caso clínico y revisión de la literatura.** *Rev. De la Asociación Mexicana de Medicina crítica y Terapia intensiva.* 17(5): 176-183.
17. Levett, P. 2001. **Leptospirosis.** *Clinical Microbiology Reviews.* 14(2): 296-326
18. Levett, P., Morey, R., R. Galloway, D. Turner, A. Steigerwalt, L. Mayer. 2005. **Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR.** *Journal of Medical Microbiology.* 54: 45-49
19. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992. **Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples.** *J Clin Microbiol.* 30(9): 2219-24.

20. Organización Mundial para la Salud (OMS), Sociedad Internacional de Leptospirosis. 2003. **Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.** Suiza. 109 p.
21. Partnerships for Health Reform Project. 1998. **Cuentas Nacionales de Salud:Guatemala.** Informe sobre Iniciativas Especiales 10. Bethesda, MD: Abt Associates Inc.
22. Roca, B. **Leptospirosis.** *Revista Médica Universidad Navarra.* 2006. 50(2): 3-6
23. Swapna, R. Tuteja, U., L. Fair, J. Sudarsana. 2006. **Seroprevalence of leptospirosis in high risk groups in Calicut, North Kerala, India.** *Indian Journal of Medical Microbiology.* Vol 24 (4): 349-352
24. Troyes, L., Fuentes, L., M. Troyes, L. Canelo, M. García, E. Anaya, R. Tapia, M. Céspedes. 2006. **Etiología del síndrome febril agudo en la provincial de Jaén, Perú 2004-2005.** *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 23(1):5-11
25. Truccolo, J., Serais, O., F. Merien, P. Perolat. 2001. **Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay.** *FEMS Microbiology Letters* 204 (2) , 317–321
26. Wangroongsarb, P., Yaseang, S., W. Petkanjanapong, P. Naigowit, T. Hagiwara, H. Kawabata, N. Koizumi. 2005 **Applicability of Polymerase Chain Reaction to Diagnosis of Leptospirosis.** *J Trop Med Parasitol.* 7: 28-43
27. Yabar, C. 2003. **Manual de Procedimientos de Electroforesis para proteínas y ADN.** Ministerio de Salud; Instituto Nacional de Salud. <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>
28. Zamora, Y., Fernández, C., I. Rodríguez, A. Obregón, J. Rodríguez, N. Rodríguez. 2007. **Método de la reacción en cadena de la polimerasa en la detección temprana de *Leptospira spp.* en hemocultivos de pacientes con sospecha de leptospirosis.** *Rev Cubana Med Trop.* Vol.59 (1) p.0-0. Disponible en la World Wide Web: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602007000100015&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100015&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0375-0760.

## VI. ANEXOS

### Anexo I. Ficha epidemiológica nacional de enfermedades transmitidas por alimentos o agua:



#### PROTOCOLOS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL  
DIRECCIÓN GENERAL DEL SIAS  
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGÍA  
VIGILANCIA Y CONTROL EPIDEMIOLÓGICO

#### FICHA EPIDEMIOLÓGICA NACIONAL ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS O AGUA

##### DATOS GENERALES

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: M F  
Dirección: \_\_\_\_\_ Aldea: \_\_\_\_\_  
Municipio: \_\_\_\_\_ Dpto: \_\_\_\_\_  
Ocupación: \_\_\_\_\_ Lugar de trabajo: \_\_\_\_\_  
Escolaridad: \_\_\_\_\_ Número de miembros de la familia: \_\_\_\_\_

No. de habitantes de la casa: (incluye otras familias, huéspedes y sirvientes)

|         |       |       |         |         |         |        |
|---------|-------|-------|---------|---------|---------|--------|
| <<1 año | 1 a 4 | 5 a 9 | 10 a 19 | 20 a 24 | 25 a 59 | 60 y + |
|---------|-------|-------|---------|---------|---------|--------|

Tuvo contacto con otras personas: (SI) (NO)

Nombres de los contactos: \_\_\_\_\_

##### 1. DATOS CLÍNICOS:

Fecha inicio de los síntomas: Hora: Hospitalización: (SÍ)(NO)

Fecha de hospitalización: \_\_/\_\_/\_\_

| Signos y/o síntomas       | SÍ | NO | Signos y/o síntomas | SÍ | NO |
|---------------------------|----|----|---------------------|----|----|
| Diarrea líquida           |    |    | Calambres           |    |    |
| Diarrea con moco y sangre |    |    | Deshidratación      |    |    |
| Dolor abdominal           |    |    | Tenesmo             |    |    |
| Vómitos                   |    |    | Hipotensión         |    |    |
| Fiebre                    |    |    | Estreñimiento       |    |    |
| Ictericia                 |    |    | Falta de apetito    |    |    |
| Hepatoesplenomegalia      |    |    | Cefalea             |    |    |
| Braquicardia              |    |    | Otros (especificar) |    |    |
| Tos                       |    |    |                     |    |    |
| Rash rosado en abdomen    |    |    |                     |    |    |

Número de evacuaciones al día: \_\_\_\_\_

Ha recibido algún tratamiento: (SI)(NO)

¿cuál? \_\_\_\_\_

##### 2. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Ha viajado en los últimos 5 días: (SI)(NO)

A dónde: \_\_\_\_\_

Viajó en las últimas 3 semanas: (SI)(NO)

A dónde: \_\_\_\_\_

Alimentos consumidos en los últimos 5 días: mariscos crudos (ceviche): ( ) mariscos cocidos ( ) Ensaladas: ( ) fruta: ( )  
jugos naturales: ( ) pasteles: ( ) enlatados: ( ) Otros: ( ) \_\_\_\_\_

Alimentos preparados en casa: ( ) Alimentos preparados en la calle: ( )

Donde: \_\_\_\_\_

Es manipulador de alimentos: (SI)(NO)

Donde: \_\_\_\_\_

Abasto de agua para consumo humano: domiciliar con cloro: ( ) domiciliar sin cloro ( ) pozo: ( ) llena cántaros: ( )  
embotellada: ( ) marca: \_\_\_\_\_ camión cisterna ( ) Río ( )

Otros: \_\_\_\_\_ Almacena agua: (SI)(NO)

Recipiente boca ancha ( ) recipiente boca angosta ( )

Qué tratamiento le dan al agua de beber: ninguno: ( ) cloro ( ) hervir ( ) filtración

#### PROTOCOLOS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Disposición de excretas: letrina: ( ) inodoro: ( ) aire libre: ( )

Hay otro miembro de la familia enfermo: (NO) (SI)

Quién? \_\_\_\_\_

#### 3. DATOS DE LABORATORIO: Muestras tomadas: (resultado positivo +, o negativo -)

Agua: ( ) resultado: ( ) fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Alimentos: ( ) resultado: ( ) fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Coprocultivo: ( ) resultado: ( ) fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Hemocultivo: ( ) resultado: ( ) fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Mielocultivo: ( ) resultado: ( ) fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Hematología: ( ) \_\_\_\_\_

Serología: ( ) ( ) resultado: ( ) fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agente etiológico detectado: \_\_\_\_\_

#### 4. CLASIFICACIÓN FINAL DEL CASO

Sospechoso ( ) confirmado ( ) descartado ( )

#### 5. UNIDAD INFORMATE:

Área de salud: \_\_\_\_\_

Hospital: \_\_\_\_\_

Distrito: \_\_\_\_\_

Puesto de salud: \_\_\_\_\_

Nombre del responsable: \_\_\_\_\_

Cargo: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

#### NOTA:

ORIGINAL QUEDARÁ ARCHIVADA EN EL SERVICIO EN QUE SE ESTUDIÓ EL CASO, COPIAS DE ESTA FICHA ENVIARLAS A:

- 1) CON LA MUESTRA AL LABORATORIO CENTRAL DE REFERENCIA
- 2) A VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA TELEFAX: 2253-0029 ó 22532053

## Anexo II

### Preparación de las soluciones a utilizar

#### 1. Aislamiento de ADN

##### Solución reguladora de lavado

12.1 g de Tris en 800 mL de agua  
destilada  
8.1 mL HCl 12N  
Aforar a 1 L con agua destilada

##### Solución reguladora de lisis

22 ml EDTA 0.2 M pH 8.0  
2.6 g de Triton X-100  
100 mL de solución reguladora  
L2

#### 2. PCR

##### Solución Reguladora II para PCR

100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500  
mM KCl

##### Solución 2

25 mM MgCl<sub>2</sub>

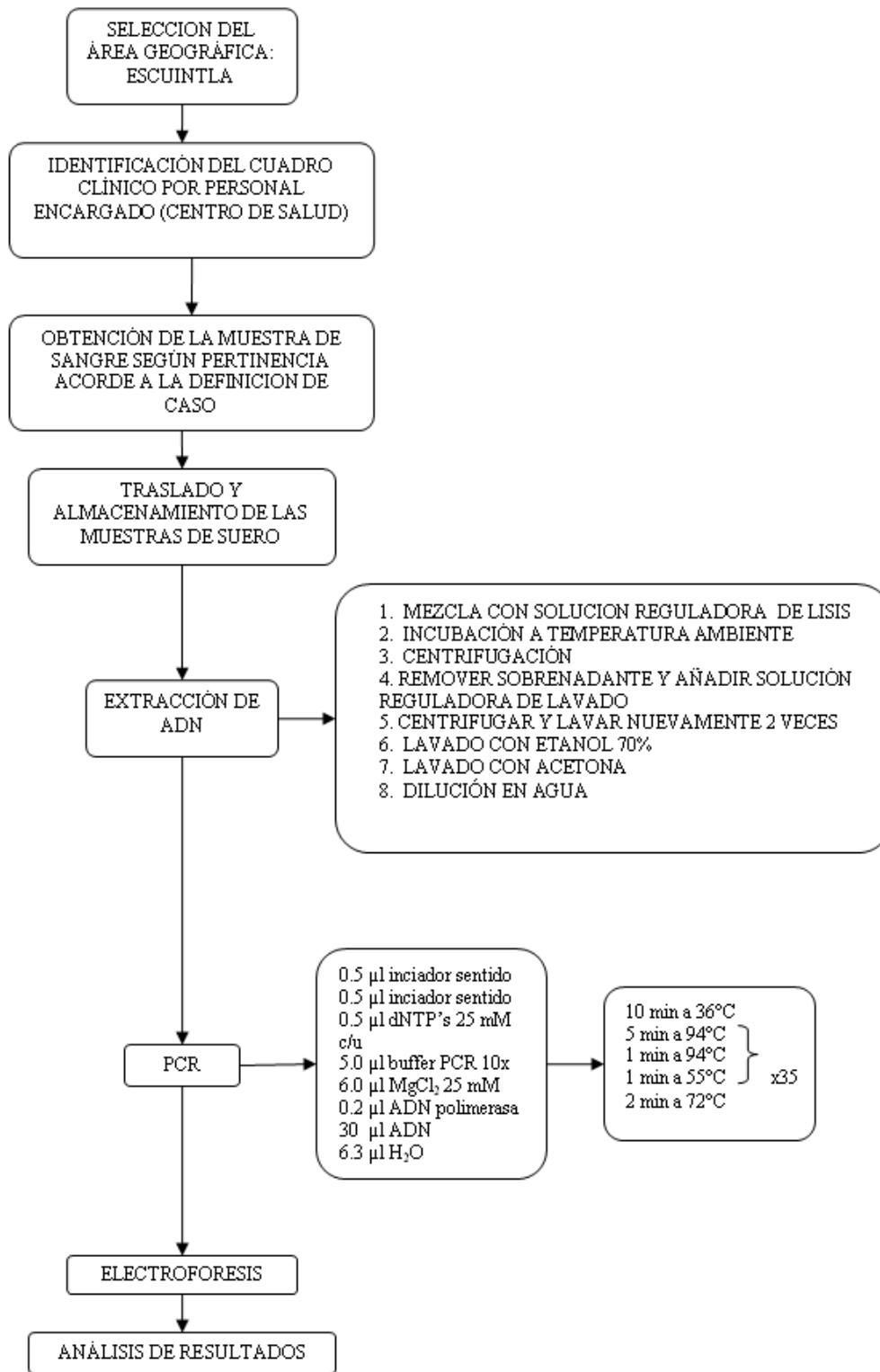
#### 3. Electroforesis

##### TAE:

242 g de Tris base (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (2 moles)  
57.1 mL de ácido acético glacial  
100 ml de EDTA 0.5 M  
H<sub>2</sub>O hasta 1 L

## Anexo III

## Diagrama de flujo correspondiente a la metodología



## Anexo IV

**Secuencia del gen de la sec Y de la pre-proteína translocasa, del cromosoma 1 de *Leptospira interrogans* serovar Hardjo cepa Norma, con número de acceso EU600183, en la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health) de Estados Unidos**

ORIGIN

```

1 ctgaatcgct gtataaaagt aagcaaagaa tacaattaaa gcggtataaa ttacgaaata
G1 *****
61 aaataacgca tgataccaaa tctcgagaga ataccaaatc tcgaagaatg gattaaaaaa
121 atccataatc actgcccatc cagcccattc ttgactacta ttagataacc attgaataat
181 cgtctgagga aataaaatca aagacgaagc aaaaatgacg ggcacacgt tcgcgccggt
241 tactttgaaa ggaatagatt gactcttggc ctgaaccatt tttcttcgga ccatttgttt
***** *****G2

301 tc
//

```

**Anexo V****Propuesta para desarrollar proyectos y cursos extraordinarios en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología**



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
18 Av. 11-95, Zona 15, V.H. III  
Apartado Postal No. 82, 01901  
Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX: 2369-0791 al 95  
2364-0336 al 40  
2364-0492 al 97

Fax: (502) 2369-7539  
www.uvg.edu.gt

## Propuesta para desarrollar proyectos y cursos extraordinarios en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología

### 1. Título del proyecto a desarrollarse en el laboratorio de B&M

“Detección de *Leptospira sp.* patogénica en agua por PCR y en pacientes con síndrome icterico no viral, por métodos serológicos y por PCR en la región de Escuintla, Guatemala”

### 2. Fecha

Enero – Mayo 2008

### 3. Nombre del asesor

Lic. Maricruz Álvarez de Mejía (Centro para el Control de Enfermedades, Center for Disease and Control, CDC); Lic. Renata Mendizábal de Cabrera (CDC); Lic. Carmen Lucía Contreras (CDC).

### 4. Nombre (carné) de estudiante(s) involucrado(s) y sus teléfonos

|                              |                |                          |
|------------------------------|----------------|--------------------------|
| Mabel <u>Laline Taracena</u> | Carné no.03046 | Tel: 53080336 y 66343150 |
| Luisa Fernanda Duarte        | Carné no.03166 | Tel: 53084676 y 22559506 |
| Nancy Rebeca <u>Say</u>      | Carné no.03106 | Tel: 50734733 y 24324499 |

### 5. Teléfono e email del asesor (para responder dudas)

|   |                             |                     |               |
|---|-----------------------------|---------------------|---------------|
| + | Lic. Maricruz Álvarez       | malvarez@GT.CDC.GOV | Tel: 55237981 |
|   | Lic. Renata Mendizábal      | rmcz@cdc.gov        | Tel: 52045721 |
|   | Lic. Carmen Lucía Contreras |                     | Tel:          |

### 6. Aval del Director del Departamento (si no es proyecto de B&M)

### 7. Sinopsis (1 párrafo)

El proyecto conjuga los puntos de tesis “Determinación microbiológica y serológica de *Leptospira spp* en pacientes con ictericia en Escuintla, Guatemala”, “Caracterización Molecular de *Leptospira spp* a partir de muestras clínicas por PCR en pacientes con ictericia en Escuintla, Guatemala” y “Caracterización Molecular por medio de PCR de *Leptospira spp* en muestras de agua en la región de Escuintla, Guatemala”. Bajo estos puntos de trabajo se desarrolla la identificación de *Leptospira* como probable agente causal de síndromes ictericos, en cerca del 30%, de pacientes que han sido descartados para hepatitis viral A, B o C (enfermedades endémicas en la región); lo cual es de suma importancia clínica. Para el efecto se utilizarán



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
 18 Av. 11-95, Zona 15, V.H. III  
 Apartado Postal No. 82, 01901  
 Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX: 2369-0791 al 95  
 2364-0336 al 40  
 2364-0492 al 97

Fax: (502) 2369-7539  
[www.uvg.edu.gt](http://www.uvg.edu.gt)

técnicas microbiológicas, serológicas y moleculares. Los análisis de las muestras recolectadas se realizarán en los laboratorios de la Universidad del Valle de Guatemala, Facultad de Ciencias y Humanidades, Departamento de Bioquímica y Microbiología.

## 8. Objetivos

### A. Objetivo General

Determinar microbiológica, serológica y molecularmente si los síndromes ictericos, no virales, presentes en la población de Escuintla, Guatemala, son causados por *Leptospira spp*; y determinar si el medio de transmisión del patógeno es por agua contaminada.

### B. Objetivos específicos

1. Identificación de *Leptospira spp* en pacientes con síndrome icterico no viral, en la región de Escuintla, Guatemala; por medio de métodos microbiológicas tradicionales y serología.
2. Detección de *Leptospira spp* en muestras de sangre de pacientes con síndrome icterico no viral, en la región de Escuintla, Guatemala; por medio de PCR tradicional.
3. Detección de *Leptospira spp* en suministros de agua en la región de Escuintla por medio de PCR.

## 9. Métodos:

Describa detalladamente cómo hará el trabajo, qué equipo/suministros/reactivos usará. Incluya un mapa con la ubicación de los sitios de trabajo.

**\*\*NOTA:** se aclara que la metodología de detección de *Leptospira spp* ha sido detallada previamente en la sección de metodología y que es complemento al diagnostico de rutina del Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social, por lo que se solicitó al comité de ética de la Universidad del Valle de Guatemala una exoneración del consentimiento individual del paciente (Anexo VII)

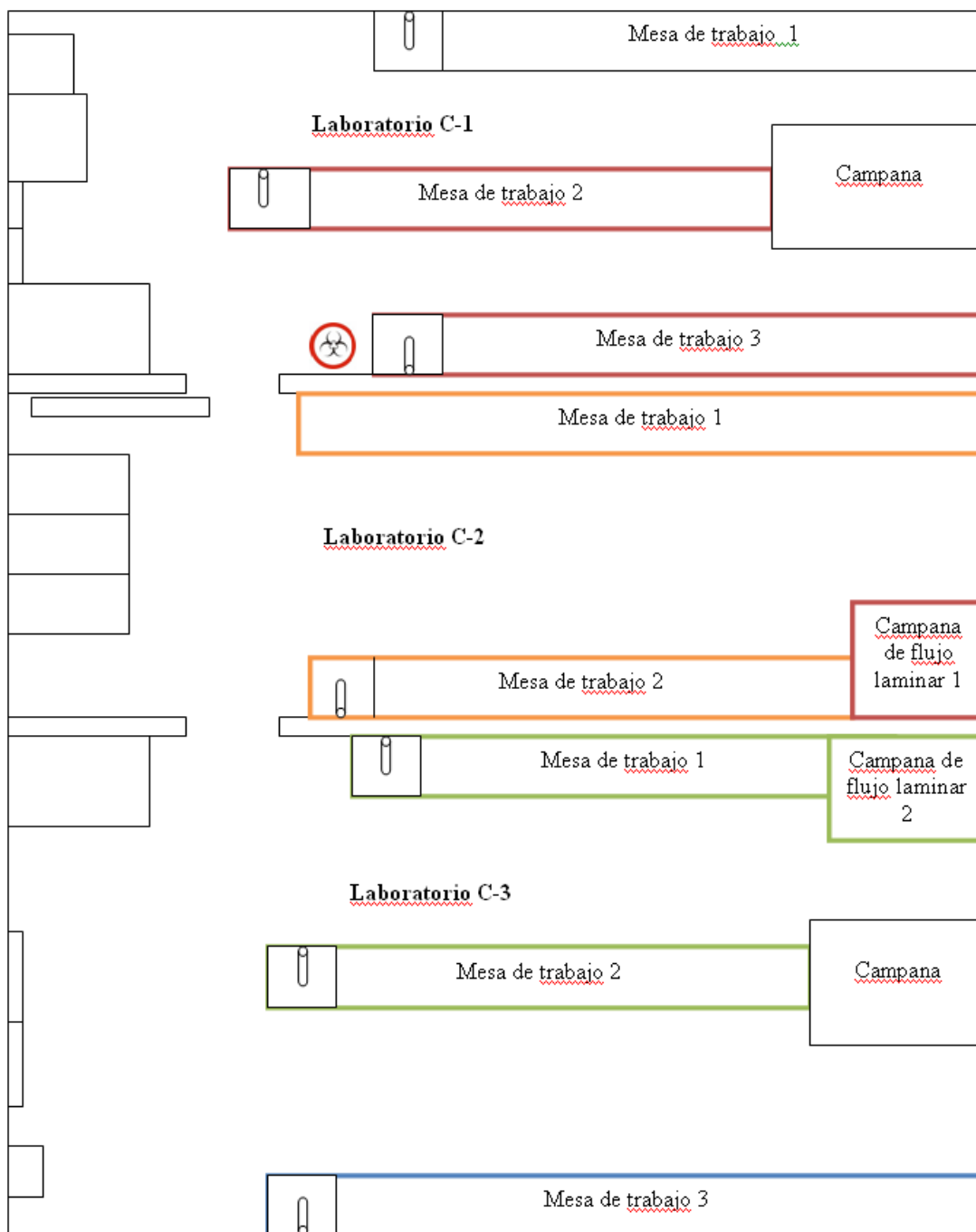


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

18 Av. 11-95, Zona 15, V.H. III  
Apartado Postal No. 82, 01901  
Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX: 2369-0791 al 9  
2364-0336 al 4  
2364-0492 al 9

Fax: (502) 2369-753  
www.uvg.edu.gt










UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
 18 Av. 11-95, Zona 15, V.H. III  
 Apartado Postal No. 82, 01901  
 Guatemala, Guatemala, C.A.

PBX: 2369-0791 al 95  
 2364-0336 al 40  
 2364-0492 al 97

Fax: (502) 2369-7539  
[www.uvg.edu.gt](http://www.uvg.edu.gt)

**Mapa 1:** en la figura anterior se osberva el mapa de los laboratorios de planta baja del edificio C. estos laboratorios corresponden al alboratorio de usos múltiples (laboratorio C-1), el laboratorio de bioquímica (laboratorio C-3) y el laboratorio intermedio entre los laboratorios mencionados.

El área de trabajo del laboratorio C-1 (mostrado en rojo) se utilizará para el trabajo correspondiente de serología, se muestra el área de descartes biológicos con un símbolo de bioseguridad, además en esta área se lavará el equipo utilizado que esté contaminado con desechos biológicos o biopeligrosos. El área de laboratorio C-3 (mostrado en verde) se utilizará para el trabajo de extracción de ADN y lo relacionado con ADN. El área de laboratorio C-2 (mostrado en naranja) se utilizará para trabajar el PCR. El área de laboratorio C-3, correspondiente a la mesa de trabajo 3 (mostrada en azul) se utilizará para preparación de reactivos y lavado de material no contaminado con desechos biológicos. En la campana de flujo laminar 1 (en rojo) se utilizará para los métodos serológicos que lo requieran. La campana de flujo laminar 2 (mostrada en verde) se utilizará para la manipulación de algunas técnicas relacionadas con ADN y moleculares.

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
|    | Extracción de ADN y técnicas relacionadas                                      |  | PCR  |
|    | Serología  |  | Descarte de desechos biológicos y <u>biopeligrosos</u> . Lavado de material contaminado. |
|  | Preparación de material y reactivos. Lavado de cristalería y otros materiales. |   |  |

## Anexo VI

### Verificación del flujo de la campana laminar modelo 36201, Labconco

Campana evaluada: campana modelo 36201, Labconco, laboratorio C1-105

Fecha de realización: 30 de noviembre

Realizado por: Luisa Duarte, Nancy Say, Mabel Taracena

Instrumento utilizado: VelociCalc Plus 8386A

Pruebas realizadas: prueba de visualización de flujo y mediciones de velocidad del aire dentro de la campana (procedimiento según Western Connecticut State University, Procedure S-113: Laboratory Fume Hood Performance Testing)

Resultados obtenidos:

Cuadro no.1: Resultados de la prueba de visualización de flujo

| <b>Cuadro 1</b>             |                               |
|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Área evaluada</b>        | <b>Dirección del flujo</b>    |
| Esquina frontal, izquierda  | Descendente, hacia el frente  |
| Esquina frontal, derecha    | Descendente, hacia el frente  |
| Esquina de fondo, izquierda | Descendente, hacia atrás      |
| Esquina de fondo, derecha   | Descendente, hacia atrás      |
| Centro, parte inferior      | Descendente, hacia atrás      |
| Centro, parte superior      | Descendencia, hacia el frente |


Cuadro no.2: Resultados de las mediciones de velocidad del aire dentro de la campana

| <b>Cuadro 2</b>              |   |                             |                             |                             |                             |                             |                              |
|------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <b>Celdas<br/>(1 ft c/u)</b> | <b>Distancia desde<br/>el borde<br/>derecho</b> | <b>Flujo 1<br/>(ft/min)</b> | <b>Flujo 2<br/>(ft/min)</b> | <b>Flujo 3<br/>(ft/min)</b> | <b>Flujo 4<br/>(ft/min)</b> | <b>Flujo 5<br/>(ft/min)</b> | <b>Promedio<br/>(ft/min)</b> |
| 1                            | 13.3 pulgadas                                   | 47                          | 49                          | 50                          | 53                          | 54                          | 50.6                         |
| 2                            | 26.5 pulgadas                                   | 58                          | 56                          | 54                          | 55                          | 54                          | 55.4                         |
| 3                            | 39.7 pulgadas                                   | 58                          | 60                          | 61                          | 62                          | 63                          | 60.8                         |
| 4                            | 48 pulgadas                                     | 45                          | 49                          | 56                          | 59                          | 61                          | 54                           |

Conclusiones: según los valores del cuadro no.2, la campana laminar presenta velocidades de aire entre 50.6-60.8 ft/min, y siendo el valor promedio esperado de  $55 \pm 5$  ft/min, los resultados obtenidos se pueden considerar aceptables.

## Anexo VII

### Procedimiento normado de operación correspondiente a la cuantificación de células de *Leptospira Interrogans*

|  |  |  |
|--|--|--|
| <p><b>Departamento de Bioquímica y Microbiología</b></p>   | <p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>                         | <p><b>PNO:<br/>Versión: I<br/>Fecha: 7 de abril 2008</b></p>   |
| <p><b>Tesis de Leptospirosis</b></p>  | <p><b>Cuantificación de células de <i>Leptospira Interrogans</i></b></p> | <p><b>Páginas totales:</b></p> <p><b>Autores: Mabel Taracena<br/>Preparado por: Mabel Taracena</b></p> |

#### 1. Propósito:

Cuantificar la cantidad de células presentes en el cultivo de *Leptospira*, para poder inocular cantidades determinadas de las mismas, en suero. De esta manera es posible realizar una curva estándar, que permita identificar el límite de detección del PCR.

#### 2. Aplicación:

Proporcionar el rango de detección en el que la metodología de PCR a utilizar, es capaz de detectar *Leptospira* en muestras de suero humano.

#### 3. Referencias:

- 3.1 Céspedes, M., Tapia, R., L. Balda, D. González, C. Peralta, P. Condori. 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
- 3.2 Humberd, C., Murray, C., S. Stuart, B. Reeb, D. Hospenthal. 2005. **Short Report: Enumerating Leptospire Using the Coulter Counter**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73(5): 962-963

- 3.3 Kositanont, U., Rugsasuk, S., A. Leelaporn, D. Phulsuksombati, S. Tantitanawat, P. Naigowit. 2006. **Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 57. 117-122

#### 4. Terminología y abreviaciones:

4.1 PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

4.2 Límite de detección: el menor número de leptospiras que puede ser amplificado y detectado visualmente

#### 5. Principio:

Se utilizará un método de conteo mecánico, por medio de una cámara de Petroff-Hausser en microscopio de campo oscuro. Esta cámara tiene una ranura exacta gravada en una lámina de vidrio. Las células se colocan en la ranura y son cubiertas con una cubierta absolutamente plana, y se cuentan dentro de los espacios de la ranura. La ranura con la cubierta proporcionan un volumen determinado, que combinado con el número de células contado en la ranura, da la concentración (células/mL) o número total de células. Este conteo incluye tanto células viables como no viables.

Esto permitirá hacer una inoculación de un número conocido de células de leptospira en 1 ml de suero, para luego realizar 5 diluciones seriadas y poder realizar una curva estándar de detección por medio de PCR.

6. Center for Disease and 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.

#### 7. Seguridad:

7.1 Campana de Bioseguridad tipo II

7.2 Guantes y bata para evitar contacto y contaminación

7.3 Desecho de material biopeligroso

7.4 Descarte con cloro para desecho de puntas y otro material contaminado

7.5 Desinfección con etanol 70% para todo el equipo de trabajo y otros materiales.

7.6 Rotular el sitio de trabajo con el agente infeccioso con el que se trabaja.

7.7 Información con el nombre de personas encargadas y teléfonos en casos de accidentes o emergencias.

## 8. Equipos, materiales y reactivos:

- 8.1 Cámara de Petroff-Hausser (Sigma Aldrich)
- 8.2 Microscopio de Campo Oscuro (Leica)
- 8.3 Asa calibrada
- 8.4 Tubos estériles
- 8.5 Pipetas de 1000 y 100  $\mu$ L
- 8.6 Descarte de biopeligrosos
- 8.7 *Leptospira interrogans* en medio EMJH
- 8.8 Minicentrífuga

## 9. Procedimiento:

- 9.1 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 otro que no sea potencialmente patógeno.
- 9.2 Antes del trabajo se debe limpiar toda el área de trabajo (campanas, mesas, etc.), así como el equipo (microscopio, micropipetas, centrífuga, 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.
- 9.3 El cultivo con la cepa de *Leptospira interrogans* serovar canícola y *L. interrogans* serovar icteroahemorrhagiae será transportado en un sistema de triple embalaje hacia el laboratorio.
- 9.4 En un tubo eppendorf de 1.5 mL colocará 1 mL de suero y se inoculará con la cepa de *Leptospira* seleccionada.
- 9.5 Se tomará 1 mL del suero inoculado y se colocará en una cámara Petroff-Hausser para el conteo de células/mL.
- 9.6 Se colocará la cámara Petroff-Hausser en el microscopio de campo oscuro y se observará con un aumento 100 X. Se han de contar todas las células observadas por mL.
- 9.7 Se recuperarán las células bacterianas a manera de que las células caigan dentro de un tubo eppendorf de 1.6 mL.
- 9.8 Se realizarán diluciones seriadas este suero. Estas diluciones se prepararán desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , y para cada dilución se calculará el número de leptospiras/mL en base a la dilución.
- 9.9 Luego se incubará 30 minutos a 56 °C para inactivar las bacterias.

**9.10** Todas las diluciones de cuantificación de las bacterias serán preservadas a -20 °C en el congelador del laboratorio de bioquímica. En este 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 Cálculos:**

**11 Control de calidad:**

**12 Reporte de datos y documentos utilizados:**

**12.1** En el cuaderno de trabajo de la persona que realizó el presente procedimiento debe quedar detallada la forma como lo realizo, y cuando lo hizo. Además debe registrarse los resultados de la cuantificación y cualquier observación realizada durante el procedimiento, así como también contratiempos ocurridos y su solución.

**13 Reporte:**

Los datos a obtenerse se habrán de reportar en el trabajo de tesis del cual son parte, y cualquier incidencia o anomalía se reportará directamente a los asesores de tesis y a la dirección del departamento.

## Anexo VIII

## Solicitud de aprobación rápida de protocolo para el comité de ética de la Universidad del Valle de Guatemala



## COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

## SOLICITUD DE APROBACIÓN RÁPIDA DE PROTOCOLO

FORMULARIO CE-ARP1

Fecha de recibido (dd/mm/aaaa): [REDACTED]

**Instrucciones:** Utilice este formulario cuando envíe protocolos de **bajo riesgo, (no utiliza procedimientos invasivos, no hay recolección de información sensible, no implica prueba de HIV / genéticas, no se realiza en poblaciones vulnerables)**, al Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala. Envíe este formulario electrónicamente junto con el consentimiento de participación voluntaria y una copia del protocolo y cualquier documento de apoyo. Sin embargo, si utiliza otra vía, favor enviar el original y cinco copias de todos los documentos al Presidente del CE. Enumere consecutivamente **TODAS** las páginas, comenzando con la carátula del protocolo, seguido del formulario(s) de consentimiento y otro(s) documento(s) de apoyo. Llene todos los campos requeridos o el formulario será devuelto.

Fecha de entrega por el Investigador (dd/mm/aaaa):

24/03/08

Protocolo No. [REDACTED]

(para uso interno del CE)

Título del Protocolo:

Determinar la incidencia de *Leptospira* spp en pacientes con síndrome icterico, no relacionado a hepatitis viral, en el departamento de Escuintla, Guatemala, a través de la prueba de PCR [REDACTED]

Investigador Principal (IP)

Nombre: MABEL LALINE

Apellido: TARACENA OLIVA

Grado Académico: [REDACTED]

No. Verificación Curso de Etica: [REDACTED]

Fecha en que se obtuvo (dd/mm/aa): [REDACTED]

Teléfono: 53080336

Fax: ----

País: GUATEMALA

e-mail: mabeltaracena@yahoo.com

Página Web: ----

Co-investigador Principal o Supervisor

Nombre: RENATA

Apellido: DE CABRERA

Grado Académico: Licenciatura

No. Verificación Curso de Etica: [REDACTED]

Fecha en que se obtuvo (dd/mm/aa): 03/04/2000

Teléfono: 2369-0791 al 5

Fax: 2369-7539

País: GUATEMALA

e-mail: rmendizabal@gt.cdc.gov

Página Web: ----

Población:

# Estimado de personas: 100

Distribución por género: 50.00 % femenino 50 % masculino

Distribución de raza / etnicidad de las personas incluidas en el estudio:

1.00 % indígenas 99 % ladinos [REDACTED] % otros: especifique: [REDACTED]

Poblaciones Vulnerables

¿Alguna población vulnerable se incluirá en el estudio?  Sí (si la respuesta es Sí, marcar todas las que se aplican): Mujeres embarazadas (como un grupo clave) Niños de 17 años de edad o menores Fetos Personas con incapacidad mental Poblaciones cautivas Personas con desventajas educacionales o económicas

Preguntas sobre el diseño del estudio?

1. ¿Tendrán los investigadores acceso a los identificadores personales?

No

2. ¿Se ha requerido reemplazo, modificación o alguna renuncia de consentimiento informado (escrito u oral) en este proyecto?

No

3. ¿Se solicita un desistimiento de la documentación del consentimiento para este proyecto?

No



## COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

### SOLICITUD DE APROBACIÓN RÁPIDA DE PROTOCOLO

FORMULARIO CE-ARP1

4. Si se recolectan especímenes, ¿serán éstos almacenados para su futura utilización?  Sí  No
5. ¿Se están realizando pruebas de HIV/SIDA como parte del estudio?  No
6. ¿Se ha planeado realizar pruebas genéticas?  No
7. ¿Se planea, la utilización de alguna droga o equipo médico de laboratorio? (ver regulaciones del FDA)  No

Si la respuesta es afirmativa, ver regulaciones del Ministerio de Salud de Guatemala

Provea información adicional: [REDACTED]

Fechas propuestas para la realización del proyecto

Inicio (dd/mm/aa): 25/03/2008 Fin (dd/mm/aa): 25/04/2008

Fondos

Indicar la fuente de financiamiento: PERSONAL

Número de contrato proporcionado por la fuente de financiamiento: ----

Período de financiamiento: Del (dd/mm/aa): [REDACTED] al (dd/mm/aa): [REDACTED]

Área geográfica donde se realizará la investigación: Escuintla, Guatemala

Instituciones que colaboran en el estudio

| Nombre  | Localización                             | No. de CE  | NA                       |
|---|--|------------|--------------------------|
| Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social | 5 Ave. 11-40 zona 11 Colonia El Progreso | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> |
| Universidad del Valle de Guatemala              | 18 ave. 11-95 zona 15 V.H III            | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> |
| [REDACTED]                                      | [REDACTED]                               | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> |
| [REDACTED]                                      | [REDACTED]                               | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> |
| [REDACTED]                                      | [REDACTED]                               | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> |

Resumen del problema de salud pública que el proyecto estudiará: Leptospirosis

Objetivos de la investigación: Determinar la incidencia de Leptospira spp en paci

Métodos para el reclutamiento de participantes: Se usarán muestras ya colectadas para otros análisis

Resumen de los procedimientos a utilizar en los participantes de esta investigación y su grado de riesgo: PCR para leptospira en ADN aislado de sangre

Riesgo de la investigación: física, psicológica, social (si hubiere alguno): NO

Beneficios para los participantes en el estudio (si hubiera alguno): No

Manejo de información (seguridad y confidencialidad de la información colectada) y manejo de muestras clínicas: Muestras codificadas sin identificadores, triple e

Razones y detalles, si se necesita reemplazar o modificar el consentimiento (de lo contrario, escriba "No aplica" en el espacio en blanco: No aplica

Describa los detalles sobre la forma de asociar los resultados con la información personal del participante. Si las muestras serán almacenadas, de lo contrario escriba "No aplica" en el espacio en blanco: No aplica

Aprobaciones/Firmas

Como investigador principal, acepto la responsabilidad de conducir este proyecto de manera ética y consistente con las políticas y procedimientos contenidos en el "Manual de ética" de la UVG. Así mismo me comprometo a respetar el principio básico de "Protección de sujetos humanos".

Firma:

□

## Anexo IX

| ANEXO IX: Resumen de los datos generales de las muestras utilizadas en la prueba de PCR |        |      |        |         |              |                |             |                  |                       |         |         |          |            |              |                 |                      |
|---|--------|------|--------|---------|--------------|----------------|-------------|------------------|-----------------------|---------|---------|----------|------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Mes   | género | edad | fiebre | cefalea | Dolor abdom. | Hepato-megalia | inapetencia | Malestar general | Pérdida de conciencia | Vómitos | Diarrea | Sangrado | Código DAS | Código ética | Lugar           | Resultado Prueba PCR |
| enero   | M      | 49   | x      | x       | x            |                |             |                  |                       | x       | x       |          | 4          | 001          | Escuintla       | Negativo             |
| enero   | F      | 3    | x      | x       | x            |                |             |                  |                       |         | x       |          | 5          | 002          | Escuintla       | Negativo             |
| enero   | F      | 17   | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 7          | 003          | Palín           | Negativo             |
| enero   | F      | 5    | x      |         | x            |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 9          | 004          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| enero   | M      | 32   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 10         | 005          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| enero   | F      | 40   | x      | x       | x            |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 12         | 006          | Pto. San José   | Negativo             |
| enero   | F      | 41   | x      | x       | x            | x              |             | x                |                       |         |         |          | 13         | 007          | Pto. San José   | Negativo             |
| enero   | F      | 23   |        | x       |              | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 16         | 008          | Palín           | Negativo             |
| enero   | M      | 7    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 17         | 009          | Masagua         | Negativo             |
| enero   | F      | 22   |        | x       |              |                |             | x                |                       | x       |         |          | 18         | 010          | Escuintla       | Negativo             |
| enero   | F      | 27   | x      | x       |              | x              | x           | x                |                       |         |         | x        | 20         | 011          | Tiquisate       | Negativo             |
| enero   | M      | 8    | x      |         | x            |                | x           | x                |                       |         |         |          | 21         | 012          | Siquinala       | Negativo             |
| enero   | F      | 6    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 25         | 013          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| enero   | F      | 23   |        | x       | x            |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 27         | 014          | Escuintla       | Negativo             |
| febrero   | F      | 29   | x      | x       | x            | x              | x           | x                | x                     |         |         |          | 29         | 015          | Siquinalá       | Negativo             |
| febrero   | M      | 29   | x      |         |              |                | x           | x                |                       |         | x       |          | 30         | 016          | Escuintla       | Negativo             |
| febrero   | M      | 52   | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 32         | 017          | Masagua         | Negativo             |
| febrero   | M      | 43   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       | x        | 34         | 018          | Tiquisate       | Negativo             |
| febrero   | F      | 5    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 35         | 019          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| febrero   | F      | 4    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 36         | 020          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| febrero   | F      | 3    | x      |         | x            | x              |             | x                |                       |         |         |          | 38         | 021          | Pto. San José   | Negativo             |
| febrero   | M      | 7    | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 39         | 022          | Siquinalá       | Negativo             |
| febrero   | F      | 7    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 40         | 023          | Escuintla       | Negativo             |
| febrero   | F      | 3    | x      |         |              | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 44         | 024          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| febrero   | F      | 3    | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 45         | 025          | Escuintla       | Negativo             |
| febrero   | M      | 10   | x      | x       | x            |                |             | x                |                       |         |         |          | 46         | 026          | Masagua         | Negativo             |
| febrero   | M      | 13   | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 48         | 027          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| febrero   | F      | 5    | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 49         | 028          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |

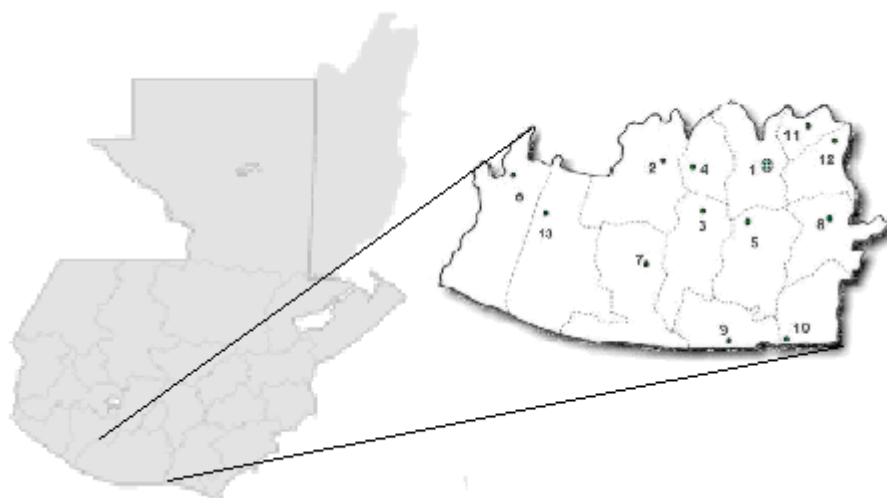
| Continuación ANEXO IX: Resumen de los datos generales de las muestras utilizadas en la prueba de PCR |        |      |        |         |              |                |             |                  |                       |         |         |          |            |              |                 |                      |
|--|--------|------|--------|---------|--------------|----------------|-------------|------------------|-----------------------|---------|---------|----------|------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Mes  | género | edad | fiebre | cefalea | Dolor abdom. | Hepato-megalia | inapetencia | Malestar general | Pérdida de conciencia | Vómitos | Diarrea | Sangrado | Código DAS | Código ética | Lugar           | Resultado Prueba PCR |
| febrero  | F      | 4    | x      | x       | x            | x              |             | x                |                       | x       |         |          | 50         | 029          | Masagua         | Negativo             |
| febrero  | F      | 2    | x      |         | x            | x              |             | x                |                       |         | x       |          | 57         | 030          | Escuintla       | Negativo             |
| febrero  | M      | 2    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 58         | 031          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| febrero  | M      | 5    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 60         | 032          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| marzo  | F      | 29   |        | x       |              |                |             | x                |                       |         |         |          | 53         | 033          | Siquinalá       | Negativo             |
| marzo  | F      | 4    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 55         | 034          | Siquinalá       | Negativo             |
| marzo  | M      | 4    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       |         | x       |          | 59         | 035          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| marzo  | M      | 64   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 61         | 036          | Escuintla       | Negativo             |
| marzo  | F      | 9    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 62         | 037          | Iztapa          | Negativo             |
| marzo  | F      | 5    | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 64         | 038          | Siquinalá       | Negativo             |
| marzo  | M      | 30   | x      |         |              |                |             | x                |                       |         |         |          | 67         | 039          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| marzo  | F      | 18   |        | x       | x            |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 68         | 040          | Siquinalá       | Negativo             |
| marzo  | M      | 2    | x      | x       | x            | x              | x           | x                | x                     |         | x       |          | 70         | 041          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| marzo  | F      | 22   |        | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 72         | 042          | Escuintla       | Negativo             |
| marzo  | F      | 28   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 74         | 043          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| abril  | F      | 5    | x      | x       | x            |                | x           | x                |                       |         | x       | x        | 71         | 044          | Siquinalá       | Negativo             |
| abril  | M      | 19   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 78         | 045          | Sn. Vicente Pac | Negativo             |
| abril  | M      | 24   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 78         | 046          | Sn. Vicente Pac | Negativo             |
| abril  | F      | 55   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 82         | 047          | St Lucía Cotzu  | Negativo             |
| abril  | F      | 9    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       | x       | x       |          | 87         | 048          | Siquinalá       | Negativo             |
| mayo   | F      | 45   |        | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 88         | 049          | Pto. San José   | Negativo             |
| mayo   | F      | 33   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 89         | 050          | Pto. San José   | Negativo             |
| mayo   | F      | 30   | x      | x       | x            |                |             | x                |                       |         | x       |          | 90         | 051          | Pto. San José   | Negativo             |
| mayo   | M      | 10   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 93         | 052          | Escuintla       | Negativo             |
| mayo   | F      | 6    | x      | x       | x            |                | x           | x                |                       | x       | x       |          | 101        | 053          | Pto. San José   | Negativo             |
| mayo   | M      | 3    | x      | x       | x            | x              |             |                  |                       |         |         |          | 106        | 054          | Siquinalá       | Negativo             |
| mayo   | M      | 30   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 107        | 055          | Pto. San José   | Negativo             |
| mayo   | M      | 78   |        |         |              |                |             | x                |                       | x       |         |          | 108        | 056          | Escuintla       | Negativo             |

| Continuación ANEXO IX: Resumen de los datos generales de las muestras utilizadas en la prueba de PCR |        |      |        |         |              |                |             |                  |                       |         |         |          |            |              |                 |                      |
|--|--------|------|--------|---------|--------------|----------------|-------------|------------------|-----------------------|---------|---------|----------|------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Mes  | género | edad | fiebre | cefalea | Dolor abdom. | Hepato-megalia | inapetencia | Malestar general | Pérdida de conciencia | Vómitos | Diarrea | Sangrado | Código DAS | Código ética | Lugar           | Resultado Prueba PCR |
| mayo   | F      | 9    | x      | x       | x            |                | x           | x                |                       |         |         |          | 113        | 057          | Escuintla       | Negativo             |
| mayo   | F      | 23   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 114        | 058          | Siquinalá       | Negativo             |
| mayo   | M      | 3    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 115        | 059          | Siquinalá       | Negativo             |
| junio  | M      | 12   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 119        | 060          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| junio  | F      | 2    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         |         |          | 123        | 061          | Pto. San José   | Negativo             |
| junio  | F      | 3    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       | x       |         |          | 121        | 062          | St Lucía Cotzu  | Negativo             |
| junio  | M      | 5    | x      | x       | x            | x              |             |                  |                       | x       | x       |          | 124        | 063          | Escuintla       | Negativo             |
| junio  | M      | 3    | x      | x       | x            |                | x           | x                |                       |         | x       |          | 125        | 064          | Escuintla       | Negativo             |
| junio  | M      | 2    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 127        | 065          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| junio  | M      | 3    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       |         |         |          | 128        | 066          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| julio  | F      | 2    | x      |         | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 130        | 067          | Masagua         | Negativo             |
| julio  | M      | 45   | x      | x       |              | x              |             | x                |                       |         |         |          | 131        | 068          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| julio  | M      | 41   | x      | x       | x            |                |             | x                |                       | x       |         |          | 132        | 069          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| julio  | M      | 5    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       | x       | x       |          | 135        | 070          | Sn. Vicente Pac | Negativo             |
| julio  | F      | 20   | x      | x       | x            |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 136        | 071          | Escuintla       | Negativo             |
| julio  | M      | 12   | x      | x       |              |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 142        | 072          | Escuintla       | Negativo             |
| agosto   | F      | 6    | x      |         | x            | x              | x           |                  |                       | x       | x       |          | 145        | 073          | Escuintla       | Negativo             |
| agosto   | F      | 5    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 149        | 074          | Escuintla       | Negativo             |
| agosto   | M      | 2    | x      | x       |              |                | x           |                  |                       |         |         |          | 150        | 075          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| agosto   | F      | 5    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       |         |         |          | 151        | 076          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| agosto   | F      | 18   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 155        | 077          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| agosto   | F      | 21   |        |         |              |                | x           | x                |                       |         |         |          | 156        | 078          | Escuintla       | Negativo             |
| agosto   | M      | 6    | x      |         | x            | x              |             | x                |                       |         |         |          | 158        | 079          | St Lucía Cotzu  | Negativo             |
| agosto   | F      | 32   |        |         |              | x              |             |                  |                       |         | x       |          | 160        | 080          | Pto. San José   | Negativo             |
| agosto   | M      | 6    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       | x       |         |          | 161        | 081          | Escuintla       | Negativo             |
| agosto   | M      | 62   |        | x       | x            | x              |             |                  |                       |         | x       |          | 163        | 082          | Escuintla       | Negativo             |
| agosto   | M      | 5    | x      |         |              | x              | x           |                  |                       |         |         |          | 165        | 083          | St. Lucía Cotzu | Positivo             |

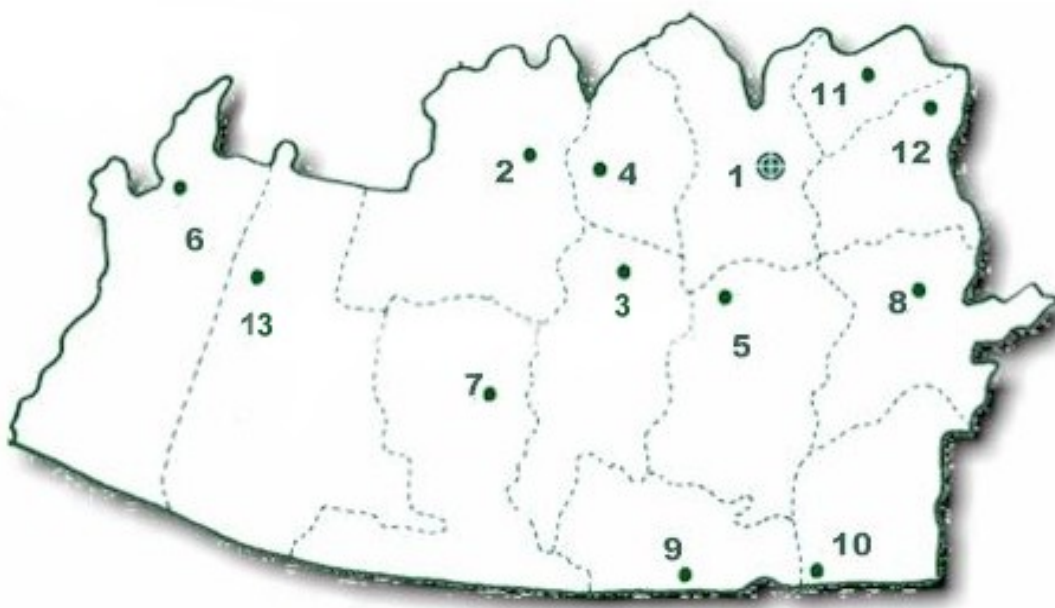
| Continuación ANEXO IX: Resumen de los datos generales de las muestras utilizadas en la prueba de PCR |        |      |        |         |              |                |             |                  |                       |         |         |          |            |              |                 |                      |
|--|--------|------|--------|---------|--------------|----------------|-------------|------------------|-----------------------|---------|---------|----------|------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Mes  | género | edad | fiebre | cefalea | Dolor abdom. | Hepato-megalia | inapetencia | Malestar general | Pérdida de conciencia | Vómitos | Diarrea | Sangrado | Código DAS | Código ética | Lugar           | Resultado Prueba PCR |
| agosto   | M      | 6    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       | x       |         |          | 168        | 084          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| agosto   | F      | 3    | x      |         | x            | x              | x           |                  |                       |         |         |          | 169        | 085          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | M      | 18   |        |         |              |                | x           | x                |                       |         |         |          | 171        | 086          | Escuintla       | Negativo             |
| septiembre   | F      | 26   | x      | x       |              |                | x           | x                |                       | x       |         |          | 172        | 087          | Escuintla       | Negativo             |
| septiembre   | F      | 8    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       | x       |         |          | 175        | 088          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | F      | 6    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       |         |          | 176        | 089          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | F      | 5    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       |         |         |          | 178        | 090          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | M      | 10   | x      | x       |              |                | x           | x                |                       | x       | x       |          | 180        | 091          | Escuintla       | Negativo             |
| septiembre   | M      | 35   | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       |         | x       |          | 187        | 092          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | M      | 8    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       | x       | x       |          | 188        | 093          | Escuintla       | Positivo             |
| septiembre   | M      | 4    | x      | x       | x            | x              |             |                  |                       |         | x       |          | 192        | 095          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | M      | 5    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       | x       | x       |          | 197        | 096          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| septiembre   | F      | 6    | x      |         | x            | x              | x           |                  |                       | x       | x       |          | 198        | 097          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| octubre  | F      | 8    | x      | x       | x            | x              |             |                  |                       | x       | x       |          | 200        | 099          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| octubre  | M      | 2    | x      |         | x            | x              | x           |                  |                       |         |         |          | 201        | 100          | Escuintla       | Negativo             |
| octubre  | M      | 4    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 138        | 101          | Escuintla       | Negativo             |
| octubre  | M      | 6    | x      |         | x            |                | x           | x                |                       |         |         |          | 195        | 102          | Tiquisate       | Negativo             |
| octubre  | M      | 28   | x      |         |              |                |             | x                |                       |         |         |          | 209        | 103          | Pto. San José   | Negativo             |
| octubre  | M      | 2    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       | x       | x       |          | 215        | 104          | Escuintla       | Negativo             |
| octubre  | M      | 11   | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       | x       | x       |          | 219        | 105          | Escuintla       | Negativo             |
| octubre  | F      | 28   | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       |         | x       |          | 220        | 106          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| noviembre  | M      | 4    | x      |         |              |                | x           |                  |                       |         | x       |          | 223        | 107          | Escuintla       | Negativo             |
| noviembre  | F      | 3    | x      | x       | x            |                | x           |                  |                       | x       |         |          | 234        | 108          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| noviembre  | M      | 12   | x      | x       | x            | x              |             | x                |                       | x       |         |          | 225        | 109          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |
| noviembre  | F      | 4    | x      | x       | x            | x              | x           | x                |                       | x       | x       |          | 237        | 111          | Escuintla       | Negativo             |
| noviembre  | F      | 3    | x      | x       | x            | x              | x           |                  |                       |         |         |          | 238        | 112          | Escuintla       | Negativo             |
| noviembre  | F      | 5    |        |         |              |                |             |                  |                       |         |         |          | 239        | 113          | Escuintla       | Negativo             |
| diciembre  | F      | 6    | x      | x       | x            | x              |             |                  |                       |         |         |          | 254        | 114          | St. Lucía Cotzu | Negativo             |

## Anexo X

### Mapa del departamento de Escuintla, Guatemala, dividido por municipios



Localización del departamento en el territorio nacional (mapa de Guatemala por departamentos)



#### División por municipios del departamento de Escuintla

- |                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| 1. Escuintla                 | 8. Guanagazapa         |
| 2. Santa Lucía Cotzumalguapa | 9. San José            |
| 3. La Democracia             | 10. Iztapa             |
| 4. Siquinalá                 | 11. Palín              |
| 5. Masagua                   | 12. San Vicente Pacaya |
| 6. Tiquisate                 | 13. Nueva Concepción   |
| 7. La Gomera                 |                        |

