

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de la seroprevalencia para Leptospirosis mediante la detección de anticuerpos IgM, con la prueba de ELISA, de muestras de sueros de pacientes con síndrome icterico no viral del Centro de Salud de Escuintla, Guatemala

Trabajo de investigación presentado
por Luisa Fernanda Duarte Flores
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

Caracterización de la seroprevalencia para Leptospirosis mediante
la detección de anticuerpos IgM, con la prueba de ELISA, de
muestras de sueros de pacientes con síndrome icterico no viral del
Centro de Salud de Escuintla, Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Caracterización de la seroprevalencia para Leptospirosis mediante
la detección de anticuerpos IgM, con la prueba de ELISA, de
muestras de sueros de pacientes con síndrome icterico no viral del
Centro de Salud de Escuintla, Guatemala

Trabajo de investigación presentado
por Luisa Fernanda Duarte Flores
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2008

Vo. Bo.

(f) _____
Lda. Carmen Lucía Contreras

Tribunal

(f) _____
Dra. Pamela Pennington

(f) _____
Lda. Carmen Lucía Contreras

(f) _____
Dr. Wenses Arvelo

Fecha de aprobación: 12 de junio del 2008

PREFACIO

En Guatemala la falta de investigación y atención que se le da al sector salud ha hecho que muchas enfermedades no sean investigadas pese a que las condiciones para su transmisión sean favorables y los pacientes se presenten con una sintomatología sospechosa. Esto ocurre con frecuencia en distintos centros de salud que son instituciones financiadas por el Estado. Estas razones motivaron la realización de este estudio, buscando aportar información valiosa respecto a una infección como lo es la Leptospirosis a la que no se le había dado la importancia que merece.

Este trabajo representa parte de un proyecto conjunto en el que se buscó analizar casos sospechosos de Leptospirosis icterica de pacientes que se presentaron al Centro de Salud de Escuintla, Guatemala, así como de la detección de Leptospiras en aguas superficiales y de abastecimiento como factor de riesgo.

Quiero agradecer a la Lda. Carmen Lucía Contreras por su asesoramiento en la realización de este trabajo, al Dr. Wenses Arvelo por su ayuda en el proceso del análisis estadístico, así como a la Dra. Pamela Pennington por sus recomendaciones y apoyo. A mis amigas, Mabel Taracena y Nancy Say con quienes formé parte de este trabajo en conjunto. A mis padres por su apoyo incondicional y a todas las personas que de una u otra forma me brindaron su ayuda.

ÍNDICE

	Pág.
PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
RESUMEN	xii

Capítulos

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
A. Historia y generalidades de Leptospirosis	3
1. Taxonomía y clasificación	4
2. Descripción de la bacteria	6
B. Epidemiología mundial	8
1. Situación mundial	10
2. Situación en Centro América	12
C. Fuentes de infección y modo de transmisión	14
1. Reservorios	14
2. Población en riesgo	16
D. Manifestaciones clínicas	17
1. Leptospirosis anictérica	18
2. Leptospirosis ictérica: Síndrome de Weil	20
a. Complicaciones	21
E. Patogénesis	22
1. Producción de toxinas	23
2. Adhesión	24
3. Proteínas de superficie	24
F. Inmunidad	25
G. Diagnóstico de laboratorio	28

1. Recolección de muestras, transporte y procesamiento.....	28
2. Pruebas serológicas.....	29
H. Tratamiento	32
1. Susceptibilidad a antimicrobianos	33
2. Tratamiento preventivo: vacunas	33
III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	
A. Objetivo general.....	35
B. Objetivos específicos	35
C. Hipótesis	35
D. Justificación	35
IV. METODOLOGÍA	
A. Descripción de área de estudio	37
B. Selección de muestras.....	37
C. Definición de caso.....	39
D. Obtención de muestras clínicas.....	39
E. Traslado y almacenamiento de muestras.....	39
F. Medidas de bioseguridad: manejo y descarte de muestras	41
G. Análisis serológico.....	41
1. Procedimiento de Elisa	41
2. Interpretación de resultados	43
H. Análisis Estadístico.....	43
V. RESULTADOS.....	45
VI. DISCUSIÓN	50
VII. CONCLUSIONES.....	55
VIII. RECOMENDACIONES.....	56
IX. BIBLIOGRAFÍA	57
X. ANEXOS	
Anexo I. Ficha de vigilancia epidemiológica	61
Anexo II. Solicitud de aprobación rápida de protocolo para el Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala	63

Anexo III. Propuesta para desarrollar proyectos y cursos extraordinarios en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología ..	65
Anexo IV. Verificación del flujo de la campana laminar modelo 36201, Labconco ..	69
Anexo V. Placas de ELISA ..	70
Anexo VI. Códigos utilizados para la tabulación y análisis de datos ..	72
Anexo VII. Datos epidemiológicos tabulados para cada caso sospechoso de Leptospirosis ..	72

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Clasificación de <i>Leptospira spp</i>	5
Cuadro 2: Serogrupos y serovares de <i>L. interrogans sensu lato</i>	5
Cuadro 3: Nombres de 13 especies genómicas identificadas del Género <i>Leptospira</i> a partir de estudios de hibridización de ADN.....	6
Cuadro 4: Incidencia anual de Leptospirosis en el mundo	11
Cuadro 5: Distribución de género, edad, mes y municipio de las muestras de pacientes incluidos en el estudio.....	40
Cuadro 6: Análisis por variable de la seropositividad para IgM contra Leptospirosis en pacientes con síndrome icterico no viral	46
Cuadro 7: Resultados de seroprevalencia según síntomas para la Prueba de ELISA IgM para Leptospirosis en pacientes con síndrome Ictérico no viral (N=102)	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Micrografía de escaneo electrónico de <i>L. interrogans</i> , serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> unido a un filtro de membrar de 0.2 um.....	7
Figura 2: Incidencia anual global de Leptospirosis Humana	9
Figura 3: Fuente de infección y modo de transmisión de la Leptospirosis	16
Figura 4: Características clínicas de la Leptospirosis Anictérica e Ictérica	18
Figura 5: Mapa de América, Guatemala y el Departamento de Escuintla.....	38
Figura 6: Ubicación de los 13 municipios del departamento de Escuintla, Guatemala.....	38
Figura 7: (Gráfico 1) Muestras con títulos positivos (n = 39) para IgM para Leptospirosis de pacientes con síndrome icterico no viral (N = 102) que se presentaron durante el año 2007 al Centro de Salud de Escuintla Guatemala. Se presenta la distribución de los casos positivos según el mes, se indica el número de casos positivos con el porcentaje correspondiente al total de las muestras.....	47
Figura 8. (Gráfico 2) Muestras con títulos positivos (n = 39) para IgM para Leptospirosis de pacientes con síndrome icterico no viral (N = 102) que se presentaron al Centro de Salud de Escuintla, según municipio de residencia. Se indica el número de casos positivos con el porcentaje sobre el total de muestras.....	48

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la detección de anticuerpos IgM contra Leptospirosis con la técnica ELISA en muestras de suero de pacientes con ictericia no viral que se presentaron durante el año 2007 al Centro de Salud del departamento de Escuintla, Guatemala. Se analizaron con el Kit para IgM de Leptospira (Diagnostic Automation) 102 muestras, de las cuales 39 (38.23%) resultaron con títulos positivos. De éstas, 21 fueron de sexo masculino y 18 de sexo femenino, presentándose el mayor número de casos entre los 2 a 14 años, y durante los meses de febrero, mayo y agosto. De 8 municipios Santa Lucía Cotzumalguapa y Escuintla tuvieron mayor prevalencia de casos. La sintomatología más frecuente en los casos positivos fue ictericia, fiebre, malestar general, dolor abdominal, diarrea, inapetencia, hepatomegalia y cefalea. Al realizar el análisis univariable no se encontró una significancia estadística entre las variables y la seropositividad. Se recomienda extender la selección de muestra en área geográfica y en tiempo para obtener datos más significativos sobre la región de la Costa Sur del país, que es el área con condiciones climáticas y topográficas más favorables para el desarrollo de la enfermedad. Asimismo realizar análisis sobre muestras recientes para que los resultados puedan incluirse en los diagnósticos y tratamientos de los pacientes, para identificar posibles fuentes de contagio y prevenir posteriores infecciones.

I. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. Se encuentra distribuida alrededor del mundo y es considerada como un problema de salud pública. Presenta especial importancia en áreas tropicales y subtropicales en donde las condiciones ambientales para su diseminación y transmisión son favorables (Pappas, G., *et al.* 2007). Estas condiciones son fácilmente encontradas en varias regiones de Guatemala, como es el caso del departamento de Escuintla. La magnitud del problema también se atribuye al contacto que la población tiene con ambientes contaminados con *Leptospira* en la vida cotidiana, como por ejemplo, prácticas de la agricultura local, estrecho contacto con la orina de ratas y perros que son reservorios, una higiene deficiente en los hogares y un inadecuado descarte de desechos.

Todos los factores anteriores son importantes fuentes de infección, cuando contaminan agua, alimentos o suelo. La enfermedad se puede presentar en su forma anictérica que es la menos grave y la icterica también conocida como enfermedad de Weil que es la manifestación grave y que puede llegar a ser mortal si no se le da la debida atención. La enfermedad se caracteriza principalmente por síndromes febriles que inician de forma brusca con escalofríos, fiebre elevada y dolores de cabeza; síntomas que al no ser específicos llevan a un diagnóstico erróneo de enfermedades que por lo general, son consideradas endémicas de la región. Un diagnóstico acertado requiere de pruebas de laboratorio que permitan identificar correctamente el agente etiológico y al mismo tiempo iniciar un tratamiento adecuado (Céspedes, M., 2005).

El problema en países como Guatemala, en donde el sistema de salud pública afronta graves problemas de financiamiento que lo limitan en cuanto a las pruebas de diagnóstico que puede realizarse, ha dado lugar a que muchos casos de Leptospirosis sean pasados por alto. Junto con este problema, la falta de una correcta documentación epidemiológica ha hecho difícil establecer la incidencia y prevalencia de la enfermedad en Guatemala.

Este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de determinar si la causa de los síndromes ictericos no virales en pacientes de Escuintla durante enero a diciembre de 2007, se debe

a la presencia de infecciones por *Leptospira*. Se realizó una detección de anticuerpos IgM con la prueba de Elisa en muestras de suero. Asimismo, se pretende informar a las autoridades correspondientes en salud para tomar las medidas pertinentes, buscando implementar el establecimiento de información epidemiológica para Leptospirosis.

II. ANTECEDENTES

A. Historia y generalidades de Leptospirosis

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica de alta morbilidad y baja mortalidad. La transmisión de la infección puede ser en forma indirecta o de manera directa. Afecta tanto a humanos como a animales siendo el hombre un hospedero accidental que adquiere la infección directamente por el contacto de la piel, membranas mucosas con orina, sangre o tejidos de animales contaminados. Indirectamente, puede ser, a través del contacto con agua o suelo húmedo, contaminado por orina de animales infectados. (Díaz, D., fecha desconocida; Laguna- Torres, 2000)

Se puede manifestar de diferentes formas: como una infección asintomática, como un estado gripal o puede desarrollar manifestaciones hemorrágicas y asociarse con meningitis, ictericia e insuficiencia renal. Es conocida como enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, enfermedad de Stuttgart, fiebre canicota, tífus canino e ictericia infecciosa. (Laguna-Torres, 2000; Aroca, G., *et al.* 2004)

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

Probablemente Lacereaux realizó en 1802, la primera descripción clínica de Leptospirosis mientras que en 1883 Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias denominándolo tífus hepático. Tres años después, en 1886, Mathieu en Francia y Weil en Alemania describen cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de agresión renal. Goldschmidt en 1887 propuso el nombre de Enfermedad de Weil. (Laguna-Torres, 2000)

En 1915, los japoneses Inada e Ido descubren la primera espiroqueta patogénica en el hígado de cobayos infectados con sangre de enfermos mineros febriles. (Broom, J. C., 1953)

En el cobayo aparecieron fenómenos hemorrágicos y es por esta razón que los investigadores japoneses llamaron al agente encontrado *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. El mismo equipo japonés encontró la relación de este microorganismo con las ratas de desagüe y al estudiarlas encontraron que el 40% de esas ratas eran portadoras de la bacteria. En 1917 y 1918 Noguchi estudió varias muestras aisladas en diferentes lugares y propuso la creación del género *Leptospira*. (Laguna-Torres, 2000)

1. Taxonomía y clasificación. En 1962 la subcomisión de Taxonomía de las *Leptospiras* de la Organización Mundial de la Salud acordó dividir a estas bacterias en dos especies: *interrogans* y *biflexa* (Cuadro 1). Esta división se hizo basándose en su comportamiento bioquímico, en la capacidad de infectar animales, resistencia a la acción de los iones de cobre bivalentes, en sus características biológicas y en las exigencias de cultivo. (*idem.*)

Tanto *L. interrogans* y *L. biflexa* se encuentran divididas en numerosos serovares definidos por la aglutinación luego de una absorción cruzada con un antígeno homólogo. Si más del 10% del título homólogo permanece en al menos uno de dos antisueros en una prueba repetida, las dos cepas pertenecen a diferentes serovares. Más de 60 serovares de *L. biflexa* se han reportado. Dentro de las especies de *L. interrogans* más de 200 serovares se han reconocido, y se han aislado serovares adicionales pero que hasta el momento no han sido publicados de forma válida. (Levett, P., 2001)

Cuadro 1. Clasificación de *Leptospira* spp. Clasificación de la bacteria *Leptospira* según su orden, familia, género y especie.

Orden	Familia	Género	Especies
Spirochaetales	Treponemataceae	Leptospira	- <i>interrogans</i> (más de 200 serovares) - <i>biflexa</i> (más de 60 serovares)

(Laguna-Torres, 2000)

L. interrogans comprende todas las cepas patogénicas, y *L. biflexa* contiene las cepas saprofíticas aisladas del ambiente. *L. biflexa* fue diferenciada de *L. interrogans* a partir de varias pruebas bioquímicas. (Levett, P., 2004)

Aquellos serovares que están antigénicamente relacionados son agrupados en serogrupos (Cuadro 2). Aunque los serogrupos no poseen una posición taxonómica han demostrado ser de utilidad para el entendimiento epidemiológico. (Levett, 2001)

Cuadro 2. Serogrupos y algunos serovares comunes de *L. interrogans* sensu lato

Serogrupo	Serovar
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe</i>
<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis, Jules, fremastos</i>
<i>Grippotuphosa</i>	<i>grippotyphosa, canalzonae, ratnapura</i>
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>
<i>Australis</i>	<i>australis, btarislava, lora</i>
<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>
<i>Javanica</i>	<i>Javanica</i>
<i>Sejroe</i>	<i>sejroe, saxkoebing, hardjo</i>
<i>Cynopteri</i>	<i>Cynopteri</i>
<i>Djasiman</i>	<i>Djasiman</i>
<i>Ranarum</i>	<i>Ranarum</i>
<i>Manhao</i>	<i>Manhao</i>

(Levett, 2001)

La clasificación fenotípica de *Leptospira* ha sido reemplazada por una clasificación genotípica, en la cual, el número de especies incluyen todos los serovares de *L. interrogans* y *L. biflexa*. La heterogenicidad genética fue demostrada en años anteriores, y los estudios de hibridización de ADN llevaron a la definición de 10 especies genómicas de *Leptospira*. Posteriormente, un estudio bastante extenso de cientos de cepas, llevado a cabo por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC), definió 13 especies genómicas (Cuadro 3) incluyendo las que se habían descrito anteriormente. (Levett, P., 2001)

Cuadro 3. Nombres de 13 especies genómicas identificadas del género *Leptospira* a partir de estudios de hibridización de ADN

Especies genómicas	
<i>L. interrogans</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. kirschneri</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>L. weilii</i>
<i>L. meyeri</i>	<i>L. inadai</i>
<i>L. wolbachii</i>	<i>L. parva</i>
<i>L. biflexa</i>	<i>L. alexanderi</i>
<i>L. fainei</i>	----

(Levett, 2001)

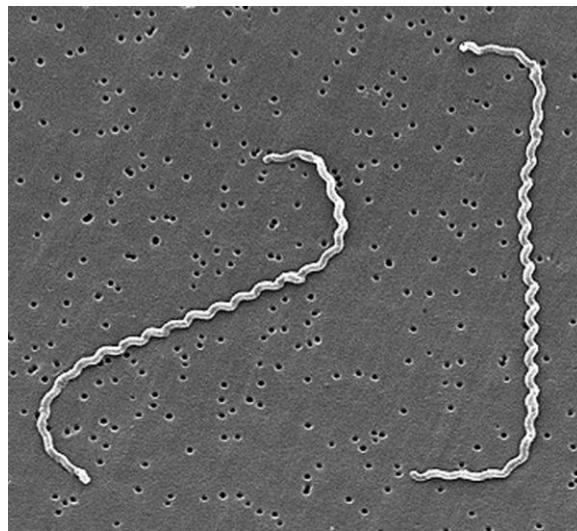
2. Descripción de la bacteria. Las *Leptospiras* son espiroquetas enrolladas estrechamente, delgadas, flexibles de 5-20 μm de longitud. Ocasionalmente pueden encontrarse especímenes con más de 85 μm . El diámetro puede variar comúnmente entre 0.1 y 0.2 μ , aunque también se han llegado a reportar valores entre 0.06 y 0.12 μ . (Schlossberger, H. y H. Brandis, 1954)

Son microorganismos helicoidales que están constituidos por un cuerpo citoplasmático y un axostilo que se disponen en forma espiral (Figura 1). Una membrana envolvente recubre ambas estructuras. El axostilo consiste en dos filamentos axiales que se insertan en la extremidad del cuerpo citoplasmático, por medio de botones terminales, siendo el

encargado de la motilidad de la bacteria. Tiene un activo movimiento de rotación, pero no se le conocen flagelos. Al microscopio de campo oscuro puede observarse que una de las extremidades termina en gancho. (Laguna-Torres 2000)

Todas son muy sensibles a la desecación, al calor y al frío excesivo así como a las variaciones del pH no tolerando el medio ácido. El pH óptimo para su multiplicación es 7.2- 7.4. En el agua salada no sobreviven al contrario de los largos períodos que pueden permanecer en el agua dulce principalmente si se encuentra almacenada. (*idem.*)

Figura 1. Micrografía de escaneo electrónico de *L. interrogans*, serovar *icterohaemorrhagiae* unido a un filtro de membrana de 0.2 μm . Se observa la forma de espiral característica.



(Levett, P., 2001)

Dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) con inserciones polares son localizados en el espacio periplasmático. La estructura de las proteínas flagelares es compleja. Las leptospiras exhiben dos formas distintivas de movimiento, translacional y no translacional. Morfológicamente todas las *Leptospiras* son indistinguibles, pero la morfología de individuos aislados varía con subcultivos in vitro y pueden ser restaurados al inocularlos en hamsters. Las *Leptospiras* poseen una estructura membranaria doble típica en común con otras espiroquetas, en las cuales la membrana citoplasmática y la

pared celular de peptidoglicano están fuertemente asociadas y cubiertas por una membrana exterior. El lipopolisacárido de *Leptospiras* tiene una composición similar a la de otras bacterias gram negativas, pero poseen una actividad endotóxica menor. (Levett, P., 2001)

Las *Leptospiras* son aerobias obligadas con un crecimiento óptimo a 28-30°C. Producen tanto catalasa como oxidasa. Crecen en medios simples enriquecidos con vitaminas (vitamina B₂ y B₁₂, como factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio. Los ácidos grasos de cadena larga son utilizados como su única fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación. (*idem.*)

Leptospiras vivas pueden ser observadas por microscopía de contraste de fase, aunque este método no presenta ventajas sobre la microscopía de campo oscuro. *Leptospirasi* que no son teñidas no se pueden observar bajo un microscopio de luz convencional, sin embargo, éstas son difíciles de teñir. (Schlossberger, H. y H. Brandis, 1954)

B. Epidemiología mundial

La Leptospirosis se considera como una de las infecciones zoonóticas alrededor del mundo. Tradicionalmente se ha relacionado con ciertas condiciones climáticas y socioeconómicas que favorecen la endemidad en los vectores animales y en la exposición de humanos, presentándose generalmente en las regiones en desarrollo del mundo, con menor presencia en países industrializados dándose como enfermedades importadas por viajes internacionales a destinos exóticos (Figura 2). (Pappas, G., *et al.* 2007)

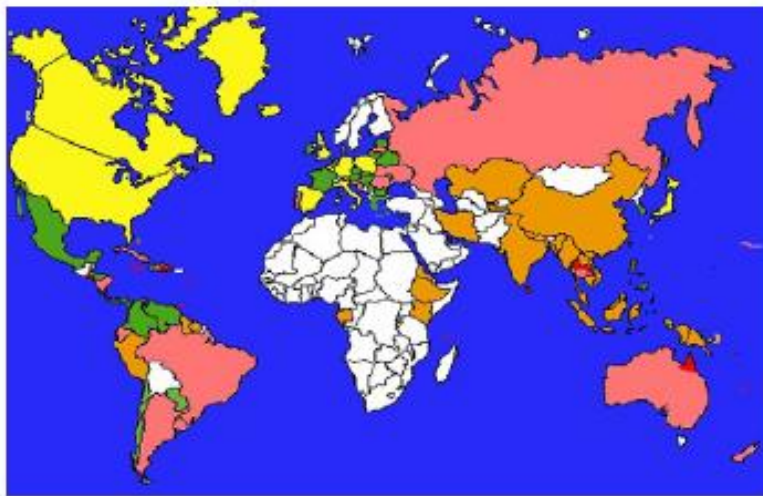
El patrón epidemiológico de la Leptospirosis ha cambiado de una enfermedad ocupacional ha reportes incrementados de infecciones contraídas por eventos accidentales en aguas contaminadas con *Leptospiras* y durante actividades recreativas. (Vieria, M. L., *et al.* 2006)

Por lo mismo, la Leptospirosis se ha convertido en un agente infeccioso que se puede presentar tanto en áreas rurales como urbanas, y en forma de epidemias. (Johnson, M. A. S., *et al.* 2004)

La Leptospirosis tiene alta prevalencia en los países con un clima templado, tropical o subtropical. Aunque un gran número de casos ocurren anualmente en el hombre y animales de regiones templadas, las áreas de mayor endemicidad son los que presentan climas tropicales y subtropicales. (Calero, M., 1957)

Tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados, la Leptospirosis puede ser asociada con catástrofes climáticas. (Baranton, G., 2006)

Figura 2. Prevalencia anual global de Leptospirosis humana. Los colores reflejan la prevalencia, en orden descendiente: rojo, rosado, verde, amarillo. El color oro refleja áreas con una probable alta prevalencia, pero que no se ha estimado. Las regiones en blanco presentan ausencia de datos.



(Pappas, G., *et al.* 2007)

Los datos que se conocen de la prevalencia de Leptospirosis humana para cada país datan de 1996 en adelante (Cuadro 4), reportados por ministerios de salud,

organizaciones internacionales de salud pública y otras entidades. (Pappas, G., *et al.* 2007)

En las diferentes regiones los serotipos varían y dependen de la ecología del medio que los alberga. Sin embargo hay serovares que son universales (*L. Interrogans* con sus serovares *icterohaemorrhagiae* y *canícola*) así como hay serovares que solo se presentan en algunas regiones. (Laguna-Torres, 2000)

La enfermedad se manifiesta por temporadas, con picos de incidencia en el verano u otoño en regiones templadas, donde la temperatura es el factor limitante para la supervivencia de las *Leptospira*. Durante la temporada de lluvias en regiones de climas húmedos, donde la rápida desecación podría de otra forma prevenir la supervivencia. (Levett, P., 2001)

La humedad, temperatura elevada y la abundancia de roedores son factores que pueden desencadenar brotes en áreas tropicales o semitropicales. (Jansen, A., *et al.* 2007)

Las *Leptospiras* patógenas, *L. interrogans*, sólo se multiplican dentro de los organismos animales por lo que los focos de Leptospirosis precisan de condiciones ambientales favorables para la supervivencia del agente causal en el medio exterior. Así, el agua salina no favorece su supervivencia al contrario del agua dulce. (Laguna-Torres, 2000)

1. Situación Mundial: Existen diversos estudios publicados recientemente sobre Leptospirosis en diversas partes del mundo que demuestran la importancia que esta infección ha tomado en los últimos años.

En Tailandia antes de 1996 el número de casos reportados por el CDC fue de aproximadamente 200 por año. Un cambio marcado se produjo en la década siguiente, con un incremento de 358 casos en 1996 a un pico de 14285 casos en el año 2000. Seguido de una disminución de 2868 casos para el 2005. (Wuthikanun, V., *et al.* 2007)

Cuadro 4: Incidencia anual de Leptospirosis en el mundo. Los datos provienen de entidades nacionales, organizaciones de salud internacionales o bien de la literatura médica.

Rango	Países con alta incidencia	Incidencia anual por millón de habitantes	Paises para los cuales no hay información	Otros países	Incidencia anual por Millón de habitantes
	País		País		
1		432.1	India	Belarus	3.4
2	Trinidad y tobago	120.4	Malasia	Bulgaria	3.7
3	Barbados	100.3	Bangladesh	Chile	1.6
4	Jamaica	78	Vietnam	Colombia	1.6
5	Costa Rica	67.2	Laos	República Checa	1.8
6	Sri Lanka	54	Nepal	Francia	3.9
7	Thailandia	48.9	Cambodia	Alemania	0.7
8	El Salvador	35.8	Indonesia	Grecia	3
9	Nueva Zelanda	26	Myanar	Honduras	3.1
10	Uruguay	25	China	Hungría	3.1
11	Cuba	24.7	Irán	Irlanda	2.2
12	Nicaragua	24.3	Suriname	Italia	0.7
13	Croacia	17.3	Haití	Lituania	2.2
14	Rusia	17.2	Perú	México	1
15	Ucrania	15.3		Netherlands	1.9
16	Rep. Dominicana	13.8		Panamá	1.3
17	Brasil	12.8		Paraguay	1.9
18	Ecuador	11.6		Serbia y Montenegro	1.5
19	Argentina	9.5		Singapur	2
20	Romania	9.4		Corea del Sur	2.8
21	Australia	8.9		España	0.3
22	Portugal	6.8		Reino Unido	0.6
23	Dinamarca	6		Estados Unidos	0.1
24	Latvia	5.6		Venezuela	3.8
25	Eslovenia	5.4			
26	Filipinas	4.8			
27	Eslovaquia	4.4			
28	Taiwan	4.1			

(Pappas, G., *et al.* 2007)

En algunos países de Europa, la incidencia de Leptospirosis ha disminuido, como es el caso de Alemania, Bélgica y Suiza. En algunas otras regiones como el Reino Unido, Portugal y España, las infecciones con *Leptospira* siguen siendo notificadas en los reportes de Salud Pública Nacional. (Baranton, G. y D. Postic., 2006)

En Francia, diversos estudios han demostrado que el número de casos aumentaron de 150 casos por año, en la década de 1930, a 300 casos año en los últimos 20 años, desde 1985. Con una incidencia de 0.83 casos por 100000 habitantes en el año 2002. Por las condiciones climáticas de la India la Leptospirosis se presenta como endémica de la región, con casos reportados desde finales de la década de 1980, aumentando en los últimos años. (Baranton, G. y D. Postic., 2006; Swapna, R. N., *et al.* 2006)

En México se reportó un pequeño aumento de casos anuales en años recientes de acuerdo a la información proveniente de la Dirección General de Epidemiología. En las islas del Caribe según reportes anuales del Centro de Epidemiología Caribeño, en el año 2000 más de 500 casos fueron confirmandos llevando a una incidencia anual de más de 100 casos por 1 millón de habitantes. En Sur América, aunque la enfermedad está presente, no es notificada en la mayoría de países. (Pappas, G., *et al.* 2007)

2. Situación en Centroamérica. La situación del sector salud en muchos países de Centroamérica enfrenta grandes problemas debido al poco presupuesto destinado por las autoridades. Esto genera limitaciones para los centros de salud en cuanto a las pruebas que se utilicen para el diagnóstico de muchas enfermedades. Asimismo, existe el problema de una falta de documentación de datos epidemiológicos que hace difícil establecer la incidencia y prevalencia de síndromes como la Leptospirosis.

De acuerdo a la información disponible se puede mencionar que sí existen casos reportados de Leptospirosis en varios países de Centroamérica.

En Nicaragua en el año de 1998 se reportó la ocurrencia de 264 casos sospechosos, de los cuales 42 resultaron positivos. (OPS, 1998). También en Nicaragua se realizó un estudio con 566 personas, de las cuales el 15% resultó positivo para Leptospirosis. (Ashford, D. A., *et al.* 2000)

Para el año 2005, el Ministerio de Salud de Nicaragua reportó mantener una estricta vigilancia epidemiológica en las personas que acuden a las unidades de salud con signos

y síntomas compatibles con los de Leptospirosis, realizando controles de foco a todos los casos confirmados para evitar el surgimiento de brotes epidémicos. En este país, se reportó una tasa de incidencia de 0.1 x 10,000 habitantes, en el año 2005. (Rodríguez y Suárez, fecha desconocida)

En El Salvador, también se han reportado sistemas de vigilancia para Leptospirosis, en los cuales se demuestra la presencia de personas con los síntomas que dan lugar a sospechar que se trata de Leptospirosis. En el año de 1999 se reportaron 40 casos de Leptospirosis confirmados con una letalidad del 5%, mientras que el año 2002 se confirmaron dos casos, uno de ellos letal. (*idem.*)

En Honduras, en septiembre del 2006 se reportaron al menos 10 casos de Leptospirosis debido a una plaga de roedores que afectó un municipio del país. (OPS, 1998)

En el año de 1998 la Organización Panamericana de la Salud presentó el *Informe Sobre la Situación Epidemiológica en Centroamérica*, en este informe se menciona que en Guatemala durante el mes de noviembre se presentaron seis casos de Leptospirosis, de los cuales cinco fueron confirmados. De estos casos cuatro correspondieron a la Ciudad de Guatemala y los otros dos al departamento de Escuintla, sin reportarse defunciones. (*idem.*)

En Guatemala, de acuerdo a las publicaciones de las Semanas Epidemiológicas del Ministerio de Salud, un reporte hasta el mes de julio del año 2004 indica cinco casos de Leptospirosis acumulados. (MSPAS, 2004)

Como bien se mencionó, la falta de datos epidemiológicos precisos dificulta poder concluir sobre la presencia de esta enfermedad en Guatemala. No es posible con la información reportada establecer los departamentos ni la época en donde la Leptospirosis se manifiesta en mayor grado.

Sin embargo, de acuerdo a los datos reportados anteriormente, es claro que el riesgo de contraer esta infección existe y que aunque los casos que si se han documentado no son numerosos, no debe descartarse la posibilidad de diagnósticos erróneos dadas confusiones con otras enfermedades debido a la sintomatología que se presenta, así como a la falta de pruebas para su confirmación en la mayoría de centros de salud.

C. Fuente de infección y modo de transmisión

1. Reservorios: La enfermedad afecta a numerosas especies animales, salvajes y domésticas, que son el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Los reservorios de las *Leptospiras* son animales que mantienen una relación de comensales con las bacterias y no sufren o sufren muy levemente la enfermedad, transfiriendo las *Leptospiras* a sus crías en el útero o en el período neonatal, favoreciendo la cadena de transmisión. Los portadores son aquellos animales que mantienen las *Leptospiras* viables y con capacidad de multiplicarse en sus riñones, excretándolas intermitentemente por la orina. (Céspedes, M., 2005)

Los animales, incluyendo al hombre, pueden ser divididos en hospederos de mantenimiento y hospederos accidentales (incidentales). La enfermedad se mantiene en la naturaleza por infecciones crónicas de los túbulos renales de los hospederos de mantenimiento. Un hospedero de mantenimiento se define como una especie en la cual la infección es endémica y usualmente se transfiere de un animal a otro por contacto directo. La infección usualmente se adquiere en una etapa temprana, y la prevalencia de la excreción crónica en la orina incrementa con la edad del animal. (Levett, P., 2001)

Los más afectados son los roedores salvajes, perros, vacas, cerdos, caballos y ovejas. En ellos la infección es desde inaparente a severa y causa pérdidas económicas importantes. (Braselli, A., fecha desconocida)

La serovariedad de la *Leptospira* infectante varía de acuerdo con el animal afectado. En las ratas el serotipo característico es el *icterohemorrhagiae*, en los cerdos el *pomona*,

en el ganado bovino es el *hardjo*, en los perros el *canicola*, y en los mapaches el *autumnales*. Sin embargo, los serotipos no son necesariamente específicos de la especie animal y pueden aparecer diferentes serotipos en los animales. (Laguna-Torres, 2000)

Otros reservorios han sido incriminados como portadores, entre los que se pueden mencionar, venados, ciervos, ardillas, zorros, marsupiales y leones de mar. Las variedades que infectan a los reptiles y anfibios (ranas) al parecer no infectan al ser humano. (Alfaro, C., Y. Aranguren y A. Clavijo. 2004)

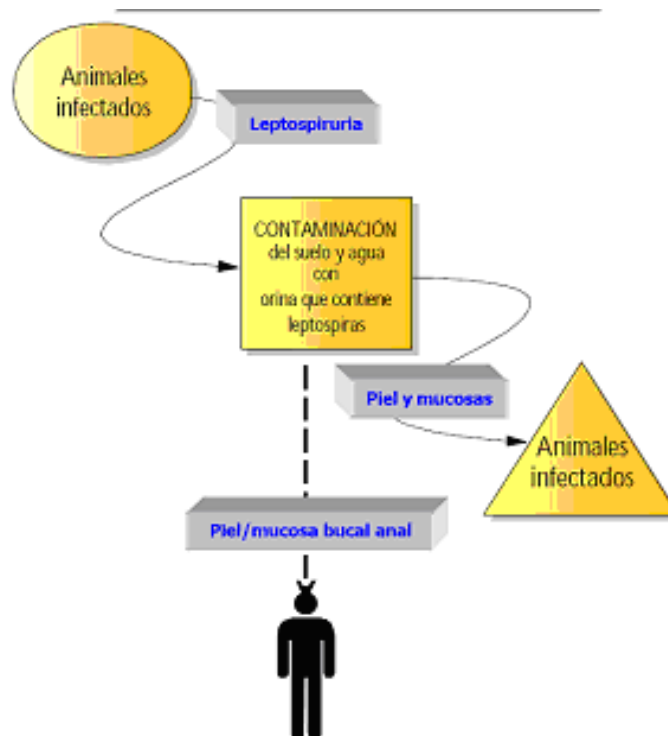
Los roedores son los animales más importantes en la transmisión de la Leptospirosis sobre todo la relacionada a las formas ictericas y de mayor cuidado en el humano (ver figura 3). La mayoría de ellos vive en ambientes silvestres en equilibrio con la naturaleza pero al producirse alteraciones de la misma como en el caso de fenómenos naturales que afectan este equilibrio, la redistribución del curso de las aguas por la lluvia excesiva lleva a la destrucción de las madrigueras, acercándolos hacia el abrigo de una vivienda humana. Asimismo, la conservación de cosechas dentro de las viviendas permite que los roedores incrementen el contacto con el humano aumentando las posibilidades de transmitir la infección. (Laguna-Torres, 2000)

Los animales infectados eliminan el patógeno con la orina, contaminando terrenos, aguas y alimentos. Las *Leptospiras* pueden permanecer durante largos períodos en sus túbulos renales, siendo excretados con la orina sin estar el animal enfermo. Incluso perros inmunizados pueden excretar *Leptospiras* infecciosas en la orina durante largo tiempo. La mayor fuente de infección para el hombre (Figura 3) la constituye la exposición directa a orina de esos animales o el contacto con agua y/o suelo contaminados con tales orinas, ya sea a través de actividades ocupacionales o recreativas. (Braselli, A., fecha desconocida)

La transmisión de persona a persona es sumamente rara. Sin embargo la transmisión por contacto sexual durante la etapa de convalecencia se ha reportado. (Levett, P., 2001 y Braselli, A., fecha desconocida)

2. Población en riesgo. La población con riesgo de enfermar comprende la que habita zonas endémicas de los países tropicales subdesarrollados; mientras que en los países desarrollados suele ser una enfermedad profesional de los que trabajan con animales o sus productos, o en medios contaminados especialmente por roedores (veterinarios, ganaderos, tamberos, carniceros, trabajadores de frigoríficos, agricultores, trabajadores de la red de saneamiento, limpiadores de alcantarillas). El humano pueden infectarse en actividades recreativas al entrar en contacto con agua dulce estancada contaminada (baño, pesca, deportes acuáticos) y por contacto con su mascota. (Braselli, A., fecha desconocida)

Figura 3. Fuente de infección y modo de transmisión de la Leptospirosis. Los animales infectados eliminan el patógeno con la orina, contaminando terrenos, aguas y alimentos. La mayor fuente de infección para el hombre la constituye la exposición directa a la orina por contacto con la piel o membranas mucosas, o bien de forma indirecta por el contacto con agua y/o suelo contaminados con tales orinas, ya sea a través de actividades ocupacionales o recreativas.



(Laguna-Torres, 2000)

La extensión de la transmisión de la enfermedad depende de varios factores, incluyendo el clima, la densidad de población y el grado de contacto entre los hospederos de mantenimiento y los hospederos accidentales. (Levett, P., 2001)

D. Manifestaciones clínicas





La leptospirosis presenta cuadros clínicos diversos, conforme al tropismo del agente, intensidad de la infección y posiblemente de las condiciones inmunitarias del hospedero. Entre los signos y síntomas, algunos son comunes a todas las formas clínicas. (Laguna-Torres, 2000)

Se presenta bajo dos formas básicas la icterica y la anictérica (Figura 4). La icterica es la más conocida, representa 10% de los casos y se denomina enfermedad de Weill, puede tener curso grave con desenlace fatal si el paciente no es tratado. Los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, ictericia, hemorragia no generalizada e insuficiencia renal. La forma anictérica se presenta en el 90% de los casos, generalmente en forma leve y puede pasar desapercibida o producir un cuadro clínico grave que comprende afecciones meníngeas y pulmonares. (Alfaro, C., Y. Aranguren y A. Clavijo. 2004)

En los humanos, la leptospirosis severa es frecuentemente, aunque no de manera invariable, causada por serovares del serogrupo *icterohaemorrhagiae*. Los serovares específicos involucrados dependen grandemente de la región geográfica y de la ecología de los hospederos. (Levett, P., 2001)

Para ambas formas clínicas se presenta una fase aguda o septicémica que dura aproximadamente una semana, seguida de la fase inmunogénica, caracterizada por la producción de anticuerpos y la excreción de leptospiras en la orina. La mayoría de las complicaciones de Leptospirosis están asociadas con la localización de las bacterias dentro de los tejidos durante la fase inmunogénica y que ocurre durante la segunda semana de la enfermedad. (Levett, P., 2001)

Figura 4. Características clínicas de la Leptospirosis Anictérica e Ictérica. Según la fase de leptospiremia o leptospiruria, con presentación de la sintomatología correspondiente y los fluidos en que las leptospiras se encuentran presentes según la evolución de la infección.

		LEPTOSPIROSIS ANICTERICA		LEPTOSPIROSIS ICTERICA	
		F..LEPTOSPIREMIA 3-7 días	F. LEPTOSPIRURIA 0-30 días	F..LEPTOSPIREMIA 3-7 días	F. LEPTOSPIRURIA 10-30 días
FIEBRE					
	HALLAZGOS CLINICOS	Mialgia Cefalea Dolor abdom. Vómitos Inyec.conj. Fiebre	Meningitis Uveitis Erupción Fiebre Vómitos	Ictericia Hemorragia Insuficiencia renal Miocarditis	
LEPTOSPIRAS PRESENTES		Sangre		Sangre	
		LCR	Orina	LCR	Orina

(Laguna-Torres, 2000)

Se presume que el porcentaje de formas graves sea menor pues existe un subdiagnóstico en relación a las formas benignas que no llegan al médico o éste no las sospecha. Aunque clásicamente se describe como una enfermedad bifásica, clínicamente suele ser monofásica, o porque en las formas leves la segunda fase es benigna y breve o inexistente, o porque en las formas graves ambas fases se funde. (Braselli, A., fecha desconocida)

1. Leptospirosis Anictérica. La gran mayoría de infecciones causadas por leptospiras son subclínicas o presentan una severidad baja, y por lo tanto los pacientes no buscan atención médica. Después de un período de incubación que es de 2 a 26 días (término medio de 5 a 14), la enfermedad generalmente se inicia en forma brusca como una enfermedad febril. (*idem.*)

Los síntomas como escalofríos, dolor de cabeza, mialgias, dolor abdominal, sufusión de la conjuntiva y en algunas ocasiones, salpullido en la piel. Si el salpullido se presenta, éste dura poco tiempo, desapareciendo en menos de 24 horas. Este síndrome anictérico usualmente dura una semana, y su resolución coincide con el apareamiento de los anticuerpos. (Levett, P., 2001)

En la segunda fase o fase inmune, después de 1 a 3 días de apirexia y aparente recuperación, reaparece la fiebre y los síntomas de localización en diversos órganos. Esta fase se correlaciona con la aparición de anticuerpos IgM circulantes mientras que la concentración de la proteína del complemento C3 se encuentra en el rango normal. (Braselli, A., fecha desconocida;Laguna-Torres, 2000)

El dolor de cabeza es, por lo general severo, parecido al que ocurre con el dengue, con dolor retro-orbital y fotofobia. La aparición de mialgia afecta la espalda baja y los muslos. Una meningitis aséptica puede ser encontrada en $\leq 25\%$ de todos los casos de Leptospirosis y puede contar como una minoría significativa de todas las causas de meningitis aséptica. Los pacientes con meningitis aséptica tienden a ser personas jóvenes en comparación con los pacientes que presentan una Leptospirosis icterica. (Levett, P., 2001 y Céspedes, M., 2005)

El dato más importante, desde el punto de vista clínico es la presencia de esta meningitis aséptica. En esta fase las *Leptospiras* ya desaparecieron del líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, aparecen las manifestaciones clínicas relacionadas a la aparición de los anticuerpos. Las manifestaciones no son específicas y el diagnóstico puede ser confundido con meningitis de etiología viral. Cuando las fases están bien definidas se tiene una mayor probabilidad de diagnosticar meningitis aséptica por Leptospirosis. Esta manifestación neurológica dura algunos días (raramente hasta 3 semanas) y no es fatal sobre todo en los casos anictéricos. (Laguna-Torres, 2000)

Todos los serotipos patogénicos para el humano son probablemente capaces de causar meningitis aséptica. Los serotipos con mayor prevalencia son *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *pomona*. (Levett, P., 2001)

2. Leptospirosis icterica: Síndrome de Weil. La forma icterica fue descrita originalmente con la especie *icterohaemorrhagiae* pero se observa casi en cualquier tipo de *Leptospira*. (Laguna-Torres, 2000)

La Leptospirosis icterica es una enfermedad mucho más severa en el cual el curso del padecimiento presenta un progreso rápido. Los casos severos, por lo general se presentan tarde en el curso de la enfermedad, y esto contribuye a la alta mortalidad, que varía entre 5 al 15%. Entre 5 y 10% de todos los pacientes con Leptospirosis presentan la forma icterica de la enfermedad. (Levett, P., 2001)

Las manifestaciones de este síndrome comienzan a aparecer entre el tercero y sexto día de enfermedad, pero es en la segunda semana que se les identifica plenamente. La ictericia que se presenta en Leptospirosis está asociada con daño hepatocelular sin necrosis, y la función del hígado regresa a la normalidad cuando el paciente se recupera. Los niveles en suero de la bilirrubina pueden presentarse altos, y varias semanas se requieren para su normalización. Cuando se presenta 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 hepatomegalia dolorosa. (Céspedes, M., 2005)

Las complicaciones de una Leptospirosis severa enfatizan la naturaleza multisistémica de la enfermedad. La Leptospirosis es una causa común de fallas renales agudas, las cuales ocurren en 16 ó 40% de los casos. (Levett, P., 2001)

El compromiso renal es bastante variable, puede ser poco expresivo y presentar solo albuminuria y hematuria en muchos casos o presentarse como insuficiencia renal grave con oliguria progresiva. La insuficiencia renal generalmente es producto de la

disminución de la perfusión renal, relacionada a la deshidratación y con menor frecuencia a la disfunción miocárdica. La excreción urinaria cae y en ocasiones hay anuria. (Laguna-Torres, 2000)

a. Complicaciones. Existen complicaciones raras como la colecistitis aguda de tratamiento quirúrgico que se asocia con la infección de *L. autumnalis*. En los niños pueden presentarse hipertensión, colecistitis acalculosa, pancreatitis y causalgia abdominal así como vasculitis necrotizante periférica. En los casos graves hasta el 10% de los pacientes pueden presentar alteraciones respiratorias. También se han relatado neumonías intersticiales y bronconeumonías aisladas. En ocasiones estas complicaciones respiratorias dificultan el diagnóstico inicial. Los pacientes graves pueden presentar tos, disnea y hemoptisis. Inclusive hasta Síndrome de Dificultad Respiratoria del Adulto que puede ser de difícil diagnóstico con el cuadro pulmonar que presenta el compromiso por hantavirus. Algunos autores mencionan que, inclusive, en la fase séptica pueden aparecer manifestaciones pulmonares en el 25-86% de los pacientes las cuales se caracterizan por tos y dolor torácico, siendo la hemoptisis de presentación muy rara. (Laguna-Torres, 2000)

También están descritas manifestaciones oculares de las cuales la más común es la iridociclitis que puede surgir en el período de la diseminación a los tejidos o también más tarde cuando el cuadro clínico empieza a regresar siendo por esto considerada una manifestación auto-inmunitaria. (*idem.*)

Las manifestaciones oculares de Leptospirosis severa, se pueden presentar como sufusiones de la conjuntiva en la mayoría de pacientes. La sufusión conjuntival es la presencia de icterus escleral y se dice que es patognómico de la enfermedad de Weil. Una uveítis, ya sea unilateral o bilateral, ocurre luego de la recuperación de la enfermedad aguda en la minoría de casos. La uveítis puede presentarse, semanas, meses y ocasionalmente años luego de la etapa aguda. Problemas crónicos visuales que persistieron 20 años o más luego de la etapa aguda han sido reportados. (Levett, P., 2001)

La Leptospirosis puede presentar coagulación intravascular diseminada que podría ser consecuencia del ingreso a la circulación de sustancias procoagulantes como la tromboplastina de los tejidos o de coágulos en la superficie del vaso lesionado. Las alteraciones cardíacas son también relativamente frecuentes. Pero con expresión electrocardiográfica más que clínica. La insuficiencia cardíaca congestiva y el shock cardiogénico pueden estar presentes en los casos graves. Sin embargo, son menos frecuentes que las alteraciones electrocardiográficas. Como las alteraciones del ritmo y bloqueos diversos que pueden verse agravados por los disturbios metabólicos como la hiperpotasemia y la uremia. (Laguna-Torres, 2000)

La miocarditis es otra de las formas de expresión y presenta intensidad variable. Hay relatos de hasta 13 de 26 casos necropsiados con miocarditis hemorrágica. Se describen diferentes tipos de arritmia cardíaca, como fibrilación y taquicardia ventricular, las cuales, frecuentemente, son de poca significancia clínica. De cualquier manera en algunas ocasiones se ha descrito insuficiencia ventricular izquierda como consecuencia de miocardiopatía dilatada. Los serotipos que han sido relacionados con la miocarditis son el *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *grippothyphosa*. Se ha determinado también que una infección aguda por leptospirosis puede causar abortos y muerte fetal. Algunos reportes han llegado a sugerir que leptospirosis puede inducir síntomas análogos a aquellos producidos por otras infecciones de espiroquetas, como la enfermedad de Lyme producida por *Borrelia burgdorferi*. (Levett, P., 2001)

E. Patogénesis

La mucosa y la piel dañada son los sitios de entrada más frecuentes para las *Leptospiras* patogénicas. Una infección generalizada sobreviene, pero no se desarrolla una lesión en el sitio de entrada. Bacteremia ocurre durante la fase aguda de la enfermedad. El hospedero responde produciendo anticuerpos, que en combinación con el complemento, son leptospiricidas. Las *Leptospiras* son rápidamente eliminadas de todos los tejidos del hospedero excepto del cerebro, los ojos y riñones. Las *Leptospiras* sobreviven en el cerebro y ojos multiplicándose lentamente, sin embargo, en los riñones

se multiplican en los túbulos renales llegando a la orina. Las *Leptospiras* pueden persistir en su hospedero por semanas a meses, mientras que en los roedores pueden ser excretadas en la orina de por vida. (Johnson, R. C., fecha desconocida)

Después de la penetración por la piel, la *Leptospira* patógena, invade la corriente sanguínea y se disemina por todo el cuerpo incluyendo el sistema nervioso central y el humor acuoso. Parece ser que existe tropismo por algunos órganos como el hígado, los riñones, corazón y músculo esquelético. La penetración puede producirse, también por las mucosas sobre todo la ocular o mucosa nasal. No muy frecuentemente la piel íntegra puede servir como puerta de entrada, salvo que la exposición al agua sea prolongada. (Laguna-Torres, 2000)

La movilidad que el microorganismo posee, así como su hialuronidasa lo capacita para penetrar en los tejidos. Se piensa que toxinas y enzimas producidas por *Leptospira* contribuyen en su patogenicidad. (Levett, P., 2001)

1. Producción de toxinas. Respecto a la producción de toxinas, en estudios in vivo de toxinas de *Leptospiras* patógenas se ha reportado una actividad endotóxica en varios serovares. Las preparaciones del lipopolisacárido de la bacteria exhiben actividad en ensayos biológicos para endotoxinas, pero a más bajas potencias. El serovar *pomona* es notable por la producción de enfermedades hemolíticas en ganado, mientras que el serovar *ballum* produce síntomas similares en hamsters. La hemolisina de varios serovares ha sido caracterizada. La hemolisina de los serovares *ballum*, *hardjo*, *pomona* y *taravosovi* son esfingomielinasas. Cepas virulentas exhiben quimiotaxis hacia la hemoglobina. Se ha observado que el plasma previene la hemólisis. La actividad de la fosfolipasa C se ha reportado en el serovar *canicola*. Una hemolisina del serovar *lai* no se asoció con actividades de esfingomielinasas ni de fosfatasas, por lo que se piensa que puede estar involucrada en la formación de poros. (Levett, P., 2001)

Cepas de serovares *pomona* y *copenhageni* elaboran una citotoxina, y una actividad citotóxica se ha detectado en el plasma de animales infectados. In vivo, esta toxina

provoca un típico efecto histopatológico, con infiltración de macrófagos y células polimorfonucleares. Una fracción de una glicoproteína con actividad citotóxica fue recuperada del serovar *copenhageni*. Otra fracción similar del serovar *canicola* demostró inhibir a la ATPasa, iones Na^+ y K^+ . Estas actividades inhibidoras fueron asociadas con ácidos grasos insaturados, particularmente ácido oleico y palmítico. Sin embargo, iguales actividades fueron demostradas en *L. biflexa* patoc, implicando que otros factores de virulencia deben ser de mayor significancia. (*idem.*)

2. Adhesión. Las *Leptospiras* han mostrado adhesión a las células epiteliales. Las *Leptospiras* virulentas se adhieren a las células renales in Vitro, y esta adhesión es aumentada por concentraciones subaglutinadas de anticuerpos homólogos. Las *Leptospiras* son fagocitadas por macrófagos en presencia de anticuerpos específicos. La inhibición de la actividad de los macrófagos incrementa la sensibilidad a la infección. Las *Leptospiras* virulentas se asocian con neutrófilos, pero no mueren. La fagocitosis ocurre sólo en presencia de suero y el sistema del complemento, sugiriendo que la membrana externa de las leptospiras posee un componente antifagocítico. (*idem.*)

El lipopolisacárido (LPS) de las *Leptospiras* estimula la adhesión a las células endoteliales y plaquetas. El LPS desencadena entonces graves fenómenos inflamatorios, que agraden a la célula endotelial y liberan citoquinas y potentes compuestos casoactivos. (Laguna-Torres, 2000)

3. Proteínas de superficie. La membrana externa de *Leptospiras spp.* contiene LPS y varias lipoproteínas. El LPS es altamente inmunogénico y es responsable de la especificidad del serovar. Una relación inversa se da entre la expresión de las proteínas de la membrana exterior y la virulencia demostrada en el serovar *grippotyphosa*. La lipoproteína de la membrana externa, la LipL36 es regulada corriente abajo in vivo y no es reconocida por la respuesta inmune humoral en hamsters adaptados a la enfermedad previamente. Los componentes de la membrana exterior pueden ser importantes en la patogénesis de la nefritis intersticial. Una proteína de fibronectina se ha encontrado que sólo es producida por cepas virulentas. (Levett, P., 2001)

F. Inmunidad

El desarrollo de la inmunidad en Leptospirosis requiere de la producción de anticuerpos específicos según la cepa. La presencia de los anticuerpos promueven la fagocitosis por opsonización y la aglutinación del agente infectante. Aparentemente se requieren niveles elevados de anticuerpos para eliminar la infección, ya que *Leptospira* pueden persistir en los tejidos con títulos bajos de anticuerpos, como en el filtrado glomerular y en el humor acuoso del ojo. (Tong, M. J., *et al.* 1971)

La segunda etapa aguda de la Leptospirosis también se conoce como la fase inmune, en el cual el desaparecimiento de las bacterias del organismo coincide con el apareamiento de los anticuerpos. Una enfermedad mediada por la respuesta inmune se ha propuesto como un factor determinante en la severidad de los síntomas que presenten los infectados con *Leptospira*. (Levett, P., 2001)

La producción en la fase inmune de IgM, IgG e IgA, como respuesta inmune defensiva, puede dar lugar a formación de inmunocomplejos, que depositados en tejidos, ocasionan daño. Por microscopía electrónica se han observado depósitos de IgM y C1q en el área mesangial renal. Se señala que los complejos inmunes y factores del complemento pueden estar involucrados en el daño renal de la enfermedad. También se presentan autoanticuerpos contra corazón y músculo. (Narbona, I. M., *et al.* 2007)

Los niveles de complejos inmunes que circulan han sido correlacionados con la severidad de los síntomas, y en pacientes que sobrevivieron, los complejos inmunes circulantes disminuyeron con el mejoramiento clínico. (Levett, 2001)

La respuesta humoral específica en infecciones de Leptospirosis es caracterizada por la detección de anticuerpos IgM iniciando en el tercer día de síntomas y a partir de la segunda semana en adelante, así como con la detección de anticuerpos IgG. Pero no todos los pacientes producen anticuerpos IgG. Anticuerpos IgA específicos son usualmente detectados a partir del quinto día hasta el noveno mes de la infección. Una detección

temprana de IgM e IgG es un indicador general de una reinfección en varias enfermedades infecciosas. (Abdulkader, R., *et al.* 2002)

La respuesta inmune está implicada en la patogénesis de la Leptospirosis, como la formación de inmunocomplejos, liberación de citoquinas y vasculitis autoinmune. Es así que los signos y síntomas del compromiso pulmonar, renal y hepático aparecen en la fase inmune cuando las aglutininas específicas comienzan a ser detectadas. (Braselli, A., fecha desconocida)

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos antiplaquetas en la Leptospirosis humana. En la Leptospirosis y en la septicemia, estos anticuerpos son dirigidos contra criptoantígenos expuestos en plaquetas dañadas y no participan como un factor causal de la trombocitopenia. Otros autoanticuerpos se han detectado en la enfermedad aguda, incluyendo IgG anticardiolipina y anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos. Sin embargo, la significancia de los anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos en la patogénesis en el daño vascular se ha cuestionado. (Levett, P., 2001)

La inmunidad a Leptospirosis es principalmente de tipo humoral. Una inmunidad pasiva puede ser conferida únicamente por anticuerpos. Un antígeno específico (F4) de un serovar extraído del LPS no presenta actividad endotóxica e induce una protección inmune en ratones, cobayos y conejos. Un antígeno similar (TM), que inhibe la aglutinación por antisuero homólogo, demostró ser diferente al F4 pero con un epítipo común. Extractos de dodecil sulfato de sodio de células enteras inducen producción de anticuerpos protectores, los cuales también aglutinan y promueven la fijación del complemento. (*idem.*)

Respuesta inmune mediada por células hacia Leptospirosis ha sido reportada. Sin embargo, la supresión de esta respuesta se ha relacionado con la reducción del número de linfocitos CD4⁺ y en respuesta a algunos mitógenos. (*idem.*)

Se ha encontrado que el lipopolisacárido (LPS) de las *Leptospiras* patógenas, activa los macrófagos, linfocitos B y en menor medida a linfocitos T y células NK. Se ha observado una disminución transitoria de los linfocitos T CD4+, así como una expansión policlonal de los linfocitos B, lo que sugiere una causa autoinmune por mimetismo molecular. En animales de laboratorio, los cambios morfológicos en riñones y en pulmones inducidos por variedades patógenas de *Leptospiras*, son más severos en sujetos depletados de linfocitos T CD4+ y CD8+, lo que sugiere un papel protector importante de los mecanismos inmunológicos dependientes de células. Los macrófagos estimulados producen interleucina 1 e interferón y tienen una mayor actividad bactericida, No obstante, se ha establecido, in vitro, que el LPS de las *Leptospiras* es menos activo biológicamente, que el de algunas enterobacterias. (Narbona, I. M., *et al.* 2007)

Las *Leptospiras* virulentas inducen la apoptosis in vivo e in Vitro. En ratones, la apoptosis de linfocitos es llevada a cabo por el LPS, por inducción del factor alfa de necrosis de tumor. Niveles elevados de citoquinas inflamatorias como el factor mencionado se han reportado en pacientes con Leptospirosis. (Levett, P., 2001)

Se he determinado la producción de factor de necrosis tumoral en pacientes con Leptospirosis y se ha relacionado la presencia de este factor con la severidad y con la mortalidad de la enfermedad. En algunos pacientes con Leptospirosis severa, se ha logrado identificar altas concentraciones de anticuerpos anticardiolipina de la clase Ig G. (Narbona, I. M., *et al.* 2007)

La inmunidad está fuertemente restringida a serovares homólogos o cercanamente relacionados. Como ya se mencionó, la especificad de un serovar es dada por antígenos de LPS. Varias de las proteínas de la membrana externa están altamente conservadas, y el potencial para vacunas que puedan generar una amplia inmunidad protectora cruzada se ha sugerido en estudios recientes. (Levett, P., 2001)

G. Diagnóstico de laboratorio

La enfermedad se diagnostica generalmente en el laboratorio por la detección de anticuerpos, por cultivo de la bacteria de muestras de sangre, orina o tejidos, por microscopía de campo oscuro, tinciones, inmunofluorescencia, por técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) o por hibridización “in situ”. (Narbona, I. M., *et al.* 2007)

1. Recolección de muestras, transporte y procesamiento. Las muestras que se colectan para ser examinadas dependen de la fase de infección. Durante los primeros 10 días de la enfermedad, las *Leptospiras* se encuentran presentes en la sangre y en el fluido cerebroespinal. (Forbes, *et al* 2002)

Títulos detectables de anticuerpos aparecen en la sangre alrededor del 5-10 día luego del establecimiento de la enfermedad, pero algunas veces, pueden aparecer más tarde especialmente si se ha dado tratamiento antibiótico. (WHO, ILS, fecha desconocida)

Las muestras que son útiles y comúnmente recolectados son a partir de sangre, orina, muestras postmortem y del fluido cerebroespinal.

Respecto a las muestras de sangre, éstas pueden ser:

- Sangre con heparina (para prevenir coagulación) para cultivo en los primeros 10 días de la enfermedad. Cultivos de sangre de más de 10 días luego del establecimiento de la enfermedad no son aconsejables ya que la mayoría de *Leptospiras* han desaparecido de la sangre, mientras que los anticuerpos empiezan a ser detectables. Las muestras para cultivos deben ser almacenadas y transportadas a temperatura ambiente, ya que bajas temperaturas dañan a las *Leptospiras* patógenas. (WHO, ILS, fecha desconocida)
- Sangre coagulada o suero para serología. Estos deben ser colectados preferentemente dos veces en intervalos de varios días basados en la fecha del establecimiento de la enfermedad y el tiempo probable de seroconversión. El

análisis pareado del suero es necesario para detectar el aumento de los títulos entre las dos muestras o seroconversión. (WHO, ILS, fecha desconocida)

Los métodos actuales para la detección de *Leptospiras* son lentos o limitados por lo que la serología es, por lo general, el método de diagnóstico más adecuado. Sin embargo, una prueba positiva de serología no es siempre señal de una infección actual, ya que algunos anticuerpos pueden persistir por largos períodos luego de la infección. Generalmente la seroconversión o un aumento de cuatro veces o mayor en el aumento del título en muestras de suero consecutivas son consideradas como una prueba diagnóstica de una infección actual o reciente. Los datos serológicos son importantes en el proceso de diagnóstico pero siempre deben ser considerados en conjunto con la presentación clínica y la información epidemiológica. El aislamiento de las *Leptospiras* patogénicas es la única prueba directa y definitiva de una infección. (Levett, P., 2001)

2. Pruebas serológicas. Varias técnicas serológicas son utilizadas en el diagnóstico de *Leptospirosis*, cada una con una sensibilidad y especificidad específica. La prueba de ELISA y la prueba de microaglutinación microscópica (MAT por sus siglas en inglés) son las técnicas generalmente utilizadas. Por mucho tiempo se ha usado la prueba MAT la cual tiene una alta sensibilidad y especificidad y es la prueba estándar de referencia para el diagnóstico serológico de *Leptospirosis*. (Céspedes, M., 2005)

Sin embargo, esta prueba consume mucho tiempo y requiere de sueros pareados, además de que la interpretación de resultados necesita de expertos. También puede mostrar baja sensibilidad y necesita del uso de una batería de las 12-25 *Leptospiras* de diferentes serogrupos prevalentes en la región de análisis. (Sharma, B., *et al.* 2007 y Effler, P., 2002)

Es por esto, que se requiere del uso de pruebas serológicas sencillas que puedan ser utilizadas en laboratorios que no sean de referencia. (Levett, P. y S. Branch, 2002)

El diagnóstico de laboratorio de Leptospirosis, un prerrequisito para el tratamiento, se lleva a cabo a partir del aislamiento del organismo causante o por evidencia serológica indicando una infección reciente. El aislamiento de los organismos a partir de muestras clínicas es confirmatorio, pero un cultivo positivo puede tardar 6 semanas y por lo tanto no contribuye a un diagnóstico rápido. (Sharma, B., *et al.* 2007)

Debido a la complejidad del MAT, se han desarrollado diversas pruebas para detectar anticuerpos contra *Leptospira* en una infección aguda. La fijación de complemento fue usada extensamente. Posteriormente, se ha desarrollado la hemaglutinación indirecta, la aglutinación en lámina, la inmunofluorescencia, la contraelectroforesis y la aglutinación microcápsula; todos estos métodos han tenido sus dificultades ya sea por su baja sensibilidad y especificidad además que muchos no eran reproducibles o requerían de reactivos y equipamiento muy sofisticado. (Céspedes, M., 2005)

Todas estas pruebas han sido sustituidas generalmente por el método de ELISA, que detecta los anticuerpos IgM durante la primera semana de la enfermedad, permitiendo que el diagnóstico sea rápido y se pueda iniciar un tratamiento oportuno. La detección de IgM en suero por ELISA, es más sensible que el MAT cuando la primera muestra se toma en la fase aguda de la enfermedad. Los anticuerpos IgM han sido detectados por ELISA en LCR en 15% de pacientes con meningitis sin una etiología probada. También se han detectado IgM en saliva. (*idem.*)

Los anticuerpos IgM contra *Leptospira* llegan a ser perceptibles durante la primera semana de enfermedad. La mayoría de los análisis usan antígenos crudos de la célula entera, pero en la actualidad se han desarrollado antígenos recombinantes de la lipoproteína de la superficie de la célula. Varios métodos están comercialmente disponibles; la principal ventaja de tales análisis es que llegan a ser a menudo positivos antes del MAT. (*idem.*)

El método de ELISA se ha aplicado con un amplio número de modificaciones. Un dot-ELISA IgM fue desarrollado, en el cual un antígeno polivalente de *Leptospira* fue

“punteado” en discos de filtros de nitrocelulosa en pozos microtítulo de placas, permitiendo el uso de volúmenes más pequeños de reactivos. Otras modificaciones se han realizado para detectar IgG e IgA además de IgM, y han empleado un antígeno inmunodominante y un soporte de una resina fabricada de poliéster en lugar de la nitrocelulosa. Otros sistemas de detección de anticuerpos son mediante el dipstick IgM, que se ha evaluado extensamente en varias poblaciones. Los sistemas de ELISA también se han aplicado al diagnóstico de Leptospirosis en animales con un eficiente resultado. (Levett, P., 2001)

El método de ELISA convencional y sus modificaciones representan una buena alternativa respecto a otras pruebas serológicas existentes en el mercado, que permiten un análisis fácil y rápido con una sensibilidad y especificidad aceptada. (WHO, ILS, fecha desconocida)

Es por esto, que entre las ventajas de ELISA se pueden mencionar:

- El método de ELISA puede detectar anticuerpos IgM en la fase temprana de la enfermedad por lo que una infección recurrente o reciente puede ser indicada. Cuando no hay detección de anticuerpos o cuando se encuentra un título en ELISA muy bajo, de ser posible, una segunda muestra del suero del paciente deber ser examinada para una seroconversión o un aumento significativo en el título.
- Se utiliza un solo antígeno, llamado el antígeno género-específico, el cual es compartido tanto por las *Leptospiras* patogénicas como saprofíticas.
- En contraste a la técnica MAT, el método de ELISA puede ser estandarizado.
- El cultivo de *Leptospiras* en el laboratorio local para proveer el antígeno no es requerido si se utiliza un kit comercial disponible. (WHO, ILS, fecha desconocida)

En este estudio se utiliza un kit comercial de ELISA para la detección de anticuerpos hacia *Leptospira biflexa* (serovar patoc 1) buscando determinar la presencia de infecciones en suero y plasma.

El principio de esta prueba es que los pozos de la placa microtítulo, están cubiertos con el antígeno purificado de *Leptospira*. (Diagnostic Automation)

Durante la primera incubación con el suero diluido del paciente, cualquier anticuerpo que sea reactivo con el antígeno se unirá a los pozos cubiertos. Luego del lavado para remover el resto de la muestra, la enzima conjugada es agregada. Si los anticuerpos se han unido a los pozos, la enzima conjugada se unirá a estos anticuerpos. Luego de una serie de lavados, se agrega el cromógeno, tetrametilbenzidina. Si la enzima conjugada está presente, la peroxidasa catalizará una reacción que consume el peróxido y provoca un cambio de color del cromógeno de claro a azul. La adición de la solución de parada, finaliza la reacción y provoca un cambio del color azul a amarillo brillante. La reacción puede luego ser visualizada por lectura visual o por un lector de ELISA a una determinada longitud de onda. (Diagnostic Automation)

H. Tratamiento

El tratamiento de esta infección es más efectivo cuando es iniciado tempranamente, durante la enfermedad aguda. Las opciones de tratamiento pueden incluir doxicilina oral o penicilina G intravenosa. La doxicilina se ha considerado para quimioprofilaxis si se anticipan exposiciones de alto riesgo. (Levett, P., 2004)

Derivados de ensayos aleatorizados y controlados, se recomienda que el tratamiento se realice con penicilina, en dosis de 6.000.000 U/día por 7 días, o doxiciclina, aplicando dosis de 100 mg/cada 12 horas, durante una semana. Estos esquemas acortan la duración de la fiebre y el compromiso renal. De acuerdo con la patología subyacente y la gravedad del caso, deberán aplicarse las medidas terapéuticas y de apoyo requeridas. La leptospirosis severa se maneja en UCI mediante vigilancia hemodinámica invasiva y de la oxigenación tisular, con objetivos definidos en términos de perfusión tisular, fluidoterapia, uso o no de vasopresores, reemplazo iónico, soporte ventilatorio y terapia sustitutiva renal. El pronóstico es en general favorable y la tasa de mortalidad oscila del 5 a 20%. Para individuos expuestos a actividades de alto riesgo o los que visitan áreas

endémicas por corto tiempo, una dosis semanal de doxiciclina de 200mg ha resultado eficaz. (Aroca, G., 2004)

1. Susceptibilidad a antimicrobianos. Las *Leptospiras* son susceptibles a beta-lactamas, tetraciclinas, fluoroquinolonas y estreptomycin. Problemas en la determinación de la susceptibilidad incluyen el largo período de incubación necesario, el uso de un medio de cultivo que contenga suero, y la dificultad en la cuantificación exacta de crecimiento. Estos aspectos han mantenido limitado el desarrollo de métodos rápidos y estandarizados para las pruebas de susceptibilidad. La mayoría de estudios han utilizado un número limitado de cepas de laboratorio o un número pequeño de agentes antimicrobianos. Sin embargo, métodos de microdilución pueden facilitar el estudio de grandes números de aislamientos en contra de un rango amplio de agentes antimicrobianos, con el potencial de identificar nuevos agentes para la profilaxis o tratamiento de Leptospirosis. (Levett, P., 2004)

2. Tratamiento preventivo: Vacunas. Las *Leptospiras* han evolucionado en formas que les permite escapar del sistema inmune. Las *Leptospiras* patógenas son capaces de translocarse a través de monocapas celulares a una velocidad significativamente mayor que las *Leptospiras* no patogénicas. Esta rápida translocación entre las células de los mamíferos permite a la bacteria llegar rápidamente al torrente sanguíneo y diseminarse a diferentes órganos. Las *Leptospiras* virulentas pueden entrar rápidamente a los fibroblastos del riñón e inducir una muerte celular programada. Por esto existe un reto para el desarrollo de una vacuna segura y efectiva. Actualmente, estudios celulares y moleculares en vacunas contra Leptospirosis se han concentrado en la motilidad bacterial, en lipopolisacáridos (LPS), en lipoproteínas, proteínas de la membrana exterior y en factores potenciales de virulencia. Se está trabajando en vacunas de proteínas recombinantes, vacunas de LPS, vacunas atenuadas e inactivadas y en vacunas de ADN. (Wang, Z.; L. Jin y A. Wegrzyn, 2007)

Existen dos tipos básicos de vacunas disponibles para Leptospirosis, atenuadas e inactivadas. Sin embargo, estos dos tipos de vacunas revelan problemas de seguridad. Las

vacunas atenuadas se consiguieron por propagación del microbio bajo condiciones diferentes a aquellas en el hospedero infectado buscando un crecimiento favorable en él. Siendo los mayores problemas la seguridad y eficacia de las mismas. Parece ser que una combinación de las vacunas atenuadas y las inactivadas puede ser altamente efectiva. (*idem.*)

Uno de los mayores avances para las vacunas de Leptospirosis es la tecnología genética que permite la expresión de genes leptospirales en organismos heterólogos. De hecho, varias proteínas de la membrana exterior se han obtenido, y son candidatas para vacunas. Las ventajas de la producción de antígenos recombinantes en un organismo hospedero heterólogo seleccionado es la simplicidad para el cultivo del hospedero y purificación de las proteínas recombinantes. Se ha reportado que las vacunas de Leptospirosis con adyuvantes son más inmunogénicas que aquellas sin adyuvante. La administración de las vacunas por vía mucosa, oral, o por aerosoles para la nariz, o aplicaciones tópicas en la piel son todas buenas opciones de vacunas. Las formulaciones óptimas, adyuvantes, dosis y programación de vacunación son cruciales para la eficacia de las vacunas. (*idem.*)

III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

A. Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de Leptospirosis asociada al síndrome icterico no viral en sueros de pacientes que acuden al Centro de Salud del departamento de Escuintla, Guatemala.

B. Objetivos específicos

1. Determinar si el Kit de ELISA IgM para Leptospirosis (Diagnostic Automation) es eficiente para el análisis de muestras sospechosas de la infección.
2. Identificar y reportar el cuadro clínico común entre los pacientes que presenten resultados positivos para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira*.
3. Aportar información epidemiológica sobre la prevalencia de Leptospirosis en Escuintla.

C. Hipótesis

Las muestras de sueros de pacientes con síndrome icterico no viral analizados con la prueba de ELISA presentan títulos positivos de anticuerpos IgM contra Leptospirosis.

D. Justificación

En el departamento de Escuintla en Guatemala, se presentan las condiciones ambientales propicias para el establecimiento de casos de Leptospirosis. Cada año en el Centro de Salud de la ciudad de Escuintla hay un 30% de casos con síndrome icterico no viral que corresponde a casos que quedan sin un diagnóstico confirmado.

Una de las causas para que estos casos queden sin un diagnóstico concreto se debe a las limitaciones que afectan al sector de salud en el país. La falta de fondos destinados para los centros de salud evita que muchas pruebas diagnósticas no sean realizadas, limitándose a pruebas de rutina para las enfermedades comunes o endémicas de la región.

Debido a que la sintomatología presentada por estos pacientes permite la sospecha de Leptospirosis, se plantea realizar la detección de anticuerpos IgM en suero. Esto permitiría determinar la presencia de una infección por *Leptospira*.

La relevancia de este estudio es poder determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en los pacientes con ictericia no viral en el departamento de Escuintla. Estos resultados permitirán dar los primeros pasos para la implementación de un sistema eficiente para vigilancia de Leptospirosis.

IV. METODOLOGÍA

A. Descripción del área de estudio

Las muestras de suero utilizadas en este estudio serán recolectadas en el Centro de Salud de Escuintla, Guatemala, ubicado en la 2a calle 1-70, zona 4, Col. Izcuintlan (Figura 5). El Departamento de Escuintla se encuentra situado en la región V o región Central, su cabecera departamental es Escuintla, limita al Norte con los departamentos de Chimaltenango, Sacatepéquez y Guatemala; al Sur con el Océano Pacífico; al Este con Santa Rosa; y al Oeste con Suchitepéquez. Se ubica en la latitud $14^{\circ} 18' 03''$ y longitud $90^{\circ} 47' 08''$, y cuenta con una extensión territorial de 4,384 kilómetros cuadrados. Su cabecera departamental es Escuintla y se encuentra a 58 kilómetros de la ciudad capital de Guatemala. Cuenta con 13 municipios, Escuintla, Santa Lucía Cotzumalguapa, La Democracia, Siquinalá, Managua, Tiquisate, La Gomera, Guanagazapa, San José, Iztapa, Palín, San Vicente Pacaya y Nueva Concepción (Figura 6). Presenta un clima cálido, registrándose temperaturas entre 21° y 34°C como promedio en la mayoría de los municipios. Se observa una precipitación pluvial abundante durante los meses de mayo a octubre, mientras que en los meses de noviembre a abril se considera una época seca, aunque hay lluvias esporádicas. La humedad se encuentra en el 80%. (Dirección de Análisis Económico, 2005)

B. Selección de la muestra

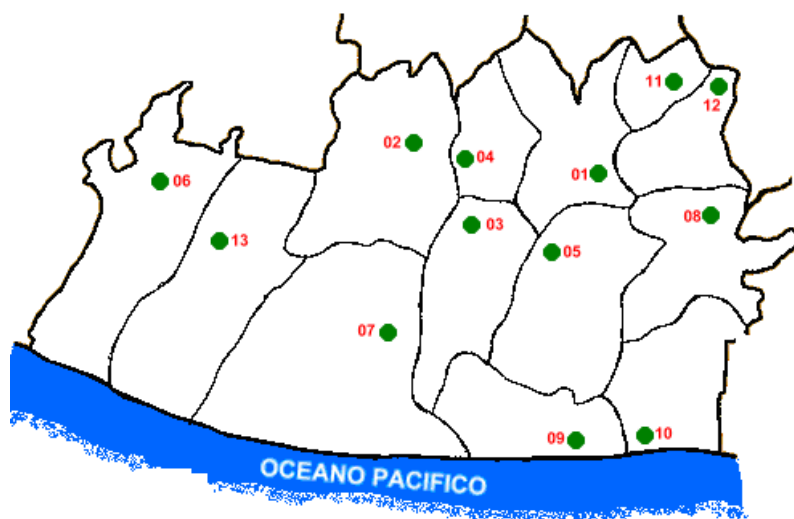
Las muestras que se utilizaron en este estudio fueron seleccionadas durante el año 2007 por el personal del Centro de Salud de Escuintla, Guatemala. Como rutina del Centro de Salud, a los pacientes se les pide información que es recolectada en la “Ficha epidemiológica para investigación de hepatitis viral” o “Ficha epidemiológica nacional para enfermedades transmitidas por alimentos o agua” (Anexo I). Las muestras que se analizaron corresponden a aquellas que fueron descartadas para hepatitis viral y que presentaron una sintomatología compatible con una posible Leptospirosis.

Figura 5. Mapa de América, Guatemala y el Departamento de Escuintla. Se muestra la ubicación del área de estudio, ampliando a Guatemala y al departamento con sus municipios.



(Dirección de Análisis Económico, 2005)

Figura 6. Ubicación de los 13 municipios del departamento de Escuintla, Guatemala. 1. Escuintla, 2. Guanagazapa, 3. Iztapa, 4. La Democracia, 5. La Gomera, 6. Masagua, 7. Nueva Concepción, 8. Palín, 9. Puerto de San José, 10. San Vicente Pacaya, 11. Santa Lucía Cotzumalguapa, 12. Siquinalá y 13. Tiquisate.



(Dirección de Análisis Económico, 2005)

C. Definición de caso

En este estudio se analizaron muestras de pacientes con edades comprendidas entre 2 a 65 años, que presentaron ictericia y cuyo resultado para la prueba de hepatitis viral dio negativo.

Síntomas como fiebre, cefalea, dolor abdominal, hepatomegalia, diarrea, inapetencia y malestar en general, también fueron considerados para la selección de las muestras que se analizaron, sin ser obligatorios como la presencia de ictericia.

D. Obtención de muestras clínicas

Se trabajó con sueros de pacientes que cumplieron con los requisitos de la definición de caso. El proceso de obtención de las muestras de sangre y la posterior separación de suero fue realizado por el personal médico del Centro de Salud.

En esta investigación no se tuvo contacto con los pacientes, por lo que se requirió de una solicitud de aprobación rápida al Comité de Ética de la Universidad del Valle de Guatemala (Anexo II). A cada muestra se le asignó un número en orden según la fecha en que se presentaron al Centro de Salud. Los resultados del análisis que se hizo no pudieron ser relacionados con el nombre del paciente y por tratarse de muestras históricas tampoco fue útil para brindar un tratamiento.

E. Traslado y almacenamiento de las muestras

Las muestras fueron recogidas personalmente en el Centro de Salud, y trasladadas en un sistema de triple embalaje en frío a 4°C con hielo. Se trasladaron directamente a la Universidad del Valle de Guatemala, en el laboratorio de bioquímica en el edificio CI-102, almacenándolas debidamente identificadas con la respectiva ficha de bioseguridad en un congelador a -20°C hasta el momento de su análisis.

Cuadro 5. Distribución de género, edad, mes y municipio de las muestras de pacientes incluidas en el estudio

Género	Femenino	49	Se indica la distribución por separado de cada variable para las 102 muestras
	Masculino	53	
Edad	2 a 4	42	
	5 a 9	21	
	10 a 13	6	
	14 a 17	3	
	18 a 21	5	
	22 a 25	2	
	26 a 29	8	
	30 a 33	4	
	34 a 37	2	
	38 a 41	3	
	42 a 45	0	
	46 a 49	1	
	50 a 53	1	
	54 a 57	1	
	58 a 65	3	
Mes	Enero	12	
	Febrero	15	
	Marzo	7	
	Abril	3	
	Mayo	8	
	Junio	5	
	Julio	5	
	Agosto	20	
	Septiembre	12	
	Octubre	8	
	Noviembre	5	
	Diciembre	2	
Municipio	Sta. Lucía Cotzumalguapa	40	
	Siquinalá	10	
	Tiquisate	2	
	Masagua	4	
	Escuintla	35	
	Pto. San José	7	
	Palín	2	
	San Vicente Pacaya	2	

F. Medidas de bioseguridad: manejo y descarte de muestras

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, para lo que fue necesario realizar una propuesta para desarrollar proyectos y cursos extraordinarios en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología. (Anexo III).

Se trabajó con un nivel de bioseguridad tipo II (CDC, NIH, fecha desconocida; WHO, ILS, fecha desconocida). Se verificó que la campana de flujo laminar (campana de bioseguridad II, modelo 36201, Labconco) en la cual se realizó la manipulación de las muestras estuviera en las condiciones adecuadas para su uso (Anexo IV)

Como protección personal se utilizó bata y guantes en todo momento durante la manipulación de las muestras. El equipo utilizado, campana y pipetas, fue desinfectado con etanol al 70% posterior a su uso. Las puntas de las pipetas fueron descartadas en un beaker con cloro al 10% dejándolas reposar durante 24 horas. Posteriormente el cloro se descartó en el lavadero, lavando las puntas con abundante agua. Las puntas se colocaron en una bolsa biohazard. Los tubos con las diluciones de los sueros se descartaron en cloro al 10%, dejando reposar durante 24 horas.

Todo el material biológico debidamente identificado en bolsas biohazard fue entregado a la empresa Ecotermo para su desecho.

G. Análisis serológico

Se utilizó un kit de Elisa (Diagnostic Automation, Inc.) para detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira*.

1. Procedimiento de Elisa

- a. Agregar el contenido del buffer de lavado a 475mL de agua destilada, en una piseta.

- b. Las muestras de suero mantenidas en congelación a -20°C , se descongelan a temperatura ambiente.
- c. El suero del paciente se diluye 1:40 en buffer de dilución, en tubos eppendorf de 0.6uL debidamente identificados.
- d. A 100uL de suero diluido trasladados a otro tubo de 0.6uL se le agregan 40uL del absorbente RF (IgG cabra anti-humano).
- e. Mezclar bien e incubar en el tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- f. El volumen final de 140uL se transfiere a los respectivos pozos.
- g. Se determina el número de pozos para los controles. El kit posee controles positivos y negativos pre-diluidos.
- h. En dos tubos eppendorf de 0.6 uL, debidamente identificados se agrega 40uL del absorbente RF (IgG cabra anti-humano) para cada uno y se agregan 100uL del control positivo y negativo en cada tubo por separado.
- i. Se transfiere el volumen final de cada tubo a los pozos luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente.
- j. Luego de transferir las muestras y controles a los pozos de la placa, se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- k. Se descarta el contenido de los pozos, volteando la placa con fuerza contra el lavadero y se lava 3 veces con el buffer de lavado preparado previamente en el inciso a.
- l. Se agregan 2 gotas de la enzima conjugada (anti-IgM humano conjugada a peroxidasa) a cada pozo (Anexo V)
- m. Se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- n. Se descarta el contenido de los pozos, volteando la placa con fuerza contra el lavadero y se lava 3 veces con el buffer de lavado preparado previamente en el inciso a.
- o. Se voltea la placa con fuerza contra toallas de papel para remover todo el líquido que se encuentra en los pozos.
- p. Se agregan 2 gotas del cromógeno (tetrametilbenzidina) a cada pozo (Anexo V).

- q. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- r. Se agregan 2 gotas de la solución de parada (solución de ácido fosfórico 1M) (Anexo V)
- s. Se realiza la lectura a la hora de haber agregado la solución de parada (Anexo V)
- t. Se utiliza un lector de placas de ELISA con filtros de 450 y 620-650 nm.

2. Interpretación de Resultados

- a. Interpretación visual. Se observó cada pozo contra un fondo blanco y se interpretó cada reacción como +, ++ o +++ en base a la intensidad de color amarillo presentada en los pozos.
- b. Interpretación usando un lector de ELISA. Se da lectura de cero en aire. Se configuró para lecturas dicromáticas a 450/620-650 nm.
 - 1) Muestra no reactiva. Las muestras interpretadas como no reactivas (0.0-0.3 DO o ningún color) indican que no se encuentran presentes anticuerpos en la muestra.
 - 2) Muestra reactiva. Cuando una muestra tiene una lectura de ≥ 0.5
- c. Control de calidad. El uso de los controles permitió la validación de la estabilidad del kit. Los valores esperados para los controles fueron:
 - 1) Control negativo: 0.0 a 0.3 unidades de DO
 - 2) Control positivo: 0.5 unidades de DO o mayor

H. Análisis estadístico

Como referencia para la determinación del tamaño de la muestra se utilizaron datos de prevalencia de otros países.

Los resultados se analizaron para determinar la relación entre aquellos resultados positivos según la edad, y sexo. Así mismo, determinar los meses de mayor número de infección y los municipios con el mayor número de casos.

Para el análisis estadístico de los datos se asignó un código a cada variable (Anexo VI) y se tabularon los datos de cada caso sospechoso. (Anexo VII)

Métodos estadísticos que se utilizaron para el análisis de resultados:

- 3) Prueba de Chi Cuadrado
- 4) Determinación de intervalos de confianza al 95% en porcentajes
- 5) Determinación de razón de probabilidad
- 6) Prueba Exacta de Fisher

Se utilizó el programa en línea GraphPad y EpiInfo para el análisis estadístico y Microsoft Office Excel, para la elaboración de cuadros y gráficos.

V. RESULTADOS

Para este estudio se analizaron 102 muestras por medio del Kit para IgM de *Leptospira* (Diagnostic Automation). Las muestras correspondieron a pacientes cuya prueba para hepatitis viral tuvo un resultado negativo y que cumplieron con la definición de caso. Treinta y nueve (38%) muestras resultaron con títulos positivos para IgM de *Leptospirosis* (intervalo de confianza 95% (IC 95%) 29-48%).

Se encontró que no hubo diferencia significativa entre los resultados según género. La edad de los pacientes con mayor número de casos positivos para la infección correspondió al grupo etareo de 2 a 14 años (ver cuadro 6). Respecto a la época del año en que se presentaron los casos positivos, no se encontró una diferencia entre la época lluviosa y seca fría (ver cuadro 6). El mayor número de casos se reportó en el mes de febrero (ver gráfica 7).

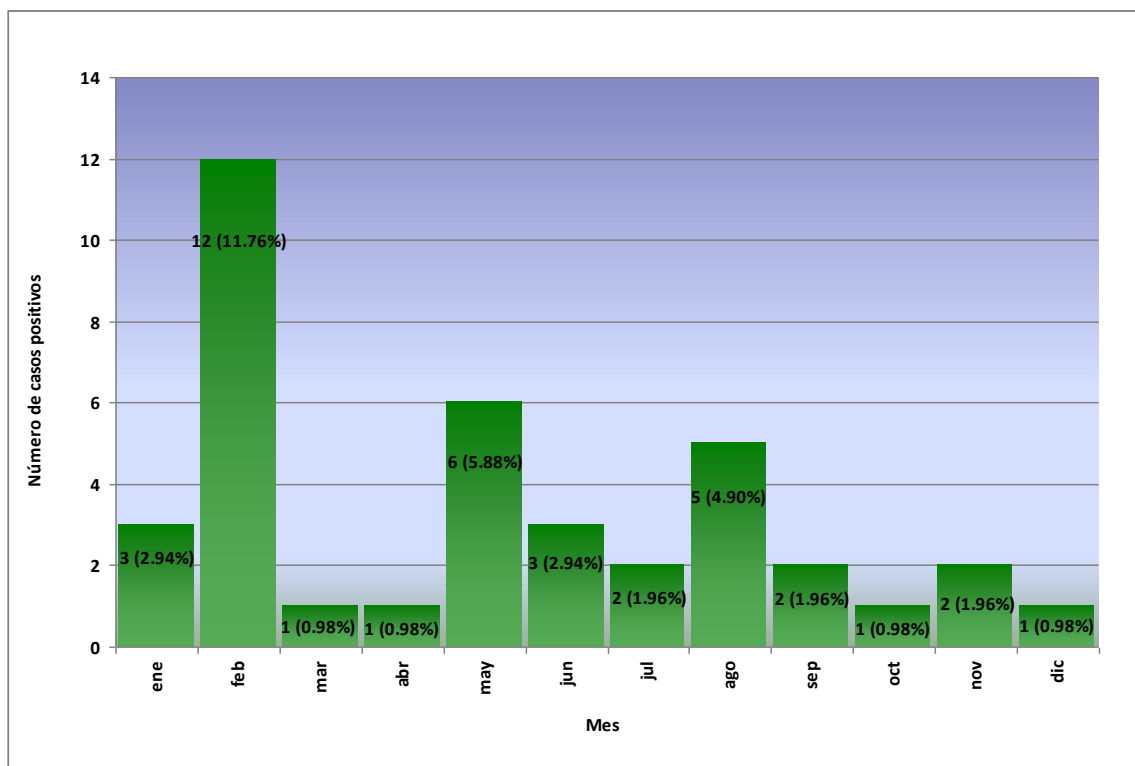
Los municipios con mayor número de casos positivos fueron Escuintla y Santa Lucía Cotzumalguapa, agrupando en una sola categoría los municipios restantes por no ser sobresalientes en cuanto al número de casos positivos (ver cuadro 6 y gráfica 8).

Cuadro 6. Análisis por variable de la seropositividad para IgM contra Leptospiriosis en pacientes con síndrome icterico no viral

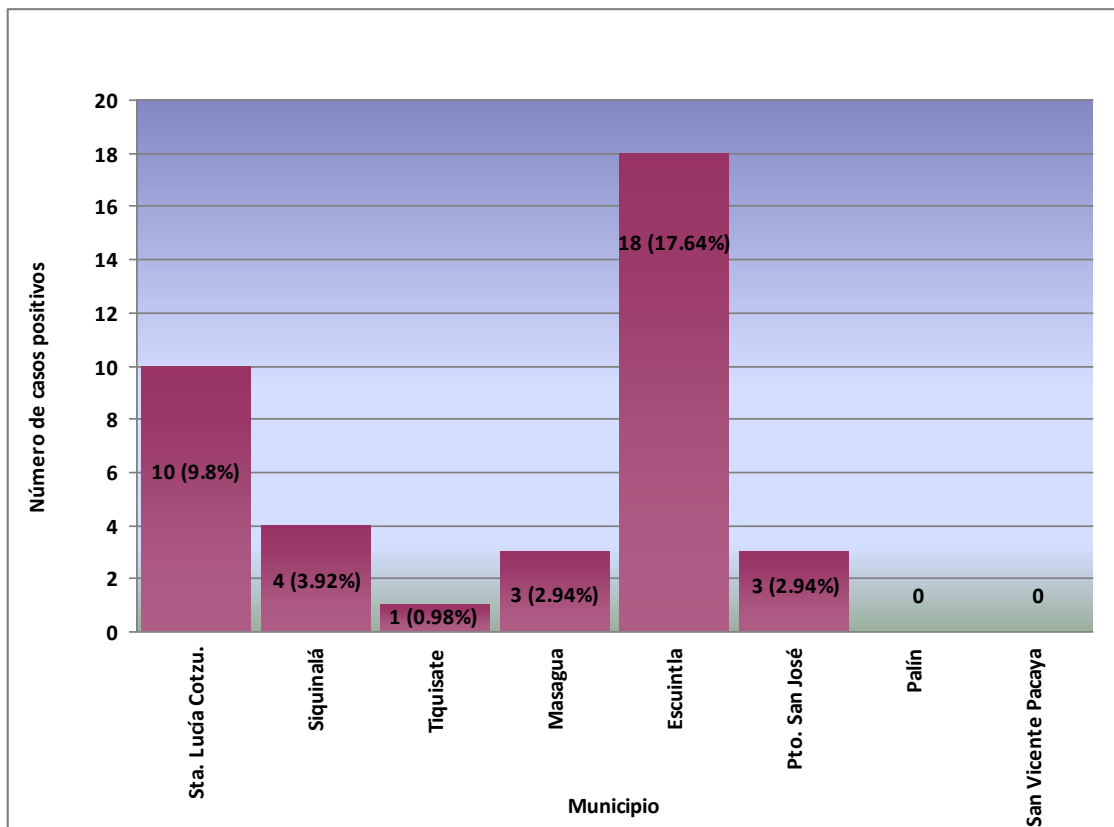
Variable	Total de casos (%)	Seropositividad (%)	Razón de probabilidad (IC 95%)	Valor p (Fisher Exacto)
Total	102	39 (38)	NA	NA
Sexo			1.23 (0.55-2.75)	0.38
Femenino	53 (52)	18 (34)		
Edad			0.96 (0.40-2.26)	0.55
2 a 14	70 (69)	27 (39)		
15 a 64	32 (31)	12 (38)		
Lugar			NA	0.06 ^t
Sta. Lucía				
Cotzumalguapa	40 (39)	10 (25)		
Escuintla	35 (34)	18 (51)		
Otros municipios	27 (26)	11 (41)		
Mes			0.53 (0.24-1.18)	0.09
Seca (ene-abr y nov-dic)	44 (43)	20 (46)		
Lluviosa (may-oct)	58 (57)	19 (33)		

Se realizó un análisis con cada una de las variables contra la seropositividad utilizando el programa EpiInfo. * $p < 0.05$, estadísticamente significativo. ^t valor p correspondiente a la prueba de Chi Cuadrado. NA, no aplica.

Gráfica 7. Muestras con títulos positivos (n = 39) para IgM para Leptospirosis de pacientes con síndrome icterico no viral que se presentaron durante el año 2007 al Centro de Salud de Escuintla Guatemala. Se presenta la distribución de los casos positivos según el mes, se indica el número de casos positivos con el porcentaje correspondiente al total de las muestras (N = 102)



Gráfica 8. Muestras con títulos positivos (n = 39) para IgM para Leptospirosis de pacientes con síndrome icterico no viral que se presentaron al Centro de Salud de Escuintla, según municipio de residencia. Se indica el número de casos positivos con el porcentaje sobre el total de muestras (N = 102)



Los síntomas analizados en los pacientes que presentaron muestras positivas para Leptospirosis variaron entre los pacientes no presentándose por igual en todos los casos (ver cuadro 7)

Cuadro 7. Resultados de seroprevalencia según síntomas para la prueba de ELISA IgM para Leptospirosis en pacientes con síndrome icterico no viral (N = 102)

Sintoma	Presencia			
	sobre el total de muestras (N = 102) (%)	Seropositividad por ssintoma (%)	Razón de Probabilidad (IC al 95%)	Valor p (Fisher Exacto)
Fiebre	97 (95)	37 (38)	0.93 (0.15-5.80)	0.64
cefalea	90 (88)	39 (43)	4.35 (0.92-20.63)	0.04*
dolor abdominal	89 (87)	34 (38)	0.99 (0.30-3.27)	0.61
hepatomegalia	79 (77)	34 (43)	2.72 (0.92-8.06)	0.05*
inapetencia	90 (88)	36 (40)	2.00 (0.51-7.90)	0.25
malestar general	80 (78)	37 (46)	8.60 (1.88-39.29)	0.0009*
diarrea	45 (44)	19 (42)	1.31 (0.61-3.02)	0.30

Se realizó un análisis univariable con cada uno de los síntomas utilizando el programa EpiInfo. * p < 0.05, estadísticamente significativo.

VI. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de Leptospirosis asociada al síndrome icterico no viral en sueros de pacientes que acudieron al Centro de Salud del departamento de Escuintla, Guatemala, durante el año 2007. Para esto, se utilizó la técnica de ELISA, la cual permite detectar la infección por *Leptospira* en un rango considerable de tiempo (a partir del sexto o décimo día, con títulos pico entre la tercera y cuarta semana). Esta técnica ofrece la ventaja de una detección efectiva, sensible y rápida, ya que elimina la necesidad de realizar un cultivo, que podría tomar hasta 6 semanas para obtener un resultado. Por otro lado, no es indispensable que el paciente se presente en la fase aguda, a diferencia de la microscopía por campo oscuro que requiere de esta fase, para poder detectar la bacteria. Este aspecto resulta importante para este trabajo ya que implica que el ELISA no sólo puede ser utilizado en los laboratorios de diagnóstico, si no también con fines puramente epidemiológicos pues permite la detección de anticuerpos en muestras históricas, como se demostró con este trabajo.

Con la utilización de un kit comercial, se eliminó la necesidad de obtener el antígeno específico para la prueba, permitió un diagnóstico estandarizado por medio de la detección de IgM para *Leptospira*, y disminuyó la probabilidad de obtener falsos positivos debido a que está diseñado para realizarse en áreas endémicas.

La necesidad de realizar un diagnóstico rápido en los pacientes para iniciar un tratamiento a tiempo y prevenir cualquier complicación, requiere que los resultados de los exámenes clínicos sean obtenidos de una forma rápida, lo cual se logra con la utilización de esta técnica. El tiempo de análisis de las muestras es de aproximadamente 3 horas con el kit empleado.

También se ha reportado que a pesar que el MAT es la técnica de referencia para la detección de Leptospirosis, el ELISA puede llegar a detectar anticuerpos en una etapa más temprana de la infección. Debe tenerse presente la importancia de tomar en cuenta

aspectos epidemiológicos, hallazgos clínicos, grado de exposición y otros resultados de laboratorio que ayuden en la confirmación de los casos positivos.

Todo lo anterior deja claro las características positivas que la técnica de ELISA presenta, haciéndola adecuada para este tipo de estudios. En países como Guatemala, en donde la atención médica a nivel pública tiene recursos limitados, es factible su implementación en el sector público y en los laboratorios de diagnóstico.

Se analizaron 102 muestras, las cuales cumplieron con los parámetros de la definición de caso, en cuanto a edad y sintomatología del paciente. De estas muestras, 39 presentaron títulos positivos para IgM de *Leptospira*. Un resultado positivo o negativo fue determinado en base a lo indicado por el kit comercial, realizando lecturas bicromáticas a 450/630. Una lectura igual o mayor de 0.5 unidades de densidad óptica de absorbancia se consideró como positiva de acuerdo a lo indicado por el fabricante.

De este modo, se obtuvo una prevalencia del 38% con límites de confianza al 95% de 29% a 48%.

Se ha reportado que los hombres presentan un mayor riesgo debido a las actividades económicas que realizan (Céspedes, M., 2005). Por las características del departamento de Escuintla, inicialmente se consideró que las prácticas de la agricultura local exponían en mayor grado a este género, incrementando el riesgo de contagiarse con Leptospirosis. Los resultados que se obtuvieron no permitieron corroborar esta suposición pues la diferencia en cuanto a casos positivos entre hombres (21 casos) y mujeres (18 casos) fue muy baja. Lo anterior puede justificarse por el hecho de que para los varones acudir al centro de salud involucra la pérdida de un día de trabajo, lo que reduce la proporción de la llegada de este género al centro de salud. Por otro lado, esta similitud de casos positivos pudiera estar indicando que el riesgo de infección no está ligado a la ocupación del paciente si no más bien a una exposición peridomiciliar o bien que las actividades de ambos géneros representan un riesgo similar (Agudelo-Florez, P. *et al.*, 2007).

Al observar la distribución de las edades de los pacientes con una sintomatología sospechosa de Leptospirosis, se encontró que 70 casos corresponden a menores de edad comprendidos entre los 2 a 14 años. Sin embargo, los resultados de seropositividad no mostraron una diferencia significativa entre los rangos analizados.

Como se mencionó anteriormente, las muestras analizadas corresponden al año 2007. Se encontró que el mes con mayor número de casos positivos fue febrero (12 casos de 15), seguido del mes de mayo (6 casos de 8) y agosto (5 casos de 20). El mes de febrero se encuentra en la época seca fría, sin embargo, debido a que Escuintla es un lugar de clima cálido, este mes presenta la temperatura propicia para la viabilidad de la bacteria, así como la presencia de lluvias esporádicas, que implican la posibilidad de un riesgo de contagio durante esta época. En la temporada de lluvia, los meses de mayo y agosto fueron los que presentaron el mayor número de casos positivos. Al realizar el análisis estadístico no se encontró una diferencia significativa que indicara una preponderación para la presencia de la infección en una determinada época.

Sin embargo es de importancia considerar que debido a que la epidemiología de la Leptospirosis es dinámica y depende del lugar, densidad de los reservorios y las actividades humanas que se realicen en ese período, la prevalencia de casos es resultado de múltiples factores no pudiéndose analizar exclusivamente en base al clima. La mayoría de familias en la región poseen perros que no reciben la atención de salud adecuada, y que, por lo general, están en contacto estrecho con sus dueños, tanto dentro como fuera del domicilio, incrementando un posible contagio por el contacto con orina de estos animales. De igual forma, las condiciones de higiene dentro del hogar facilita la exposición de los alimentos y el agua a la orina de roedores.

Escuintla y Santa Lucía Cotzumalguapa fueron los municipios que mostraron el mayor número de casos positivos, 18 y 10 respectivamente. Estos dos municipios presentan cierto grado de urbanización y densidad poblacional. En este caso el grado de urbanización no implica necesariamente que el riesgo de una exposición directa o indirecta sea menor, siendo las condiciones económicas prevaletentes en la población,

las que ocasionan que el tipo de vivienda, grado de exposición y medidas de higiene en general aumenten el riesgo de contraer la infección (Laguna-Torres, 2000).

Debe tomarse en cuenta además que la cantidad de muestras analizadas provenientes de cada municipio varió, esto como posible consecuencia de la distancia que las familias deben recorrer para llegar al centro de salud. Los municipios de Escuintla y Santa Lucía Cotzumalguapa son los que se encuentran más cercanos y por lo tanto la mayor afluencia de pacientes provenientes de estos lugares puede deberse a este factor y no estar representando la realidad de la Leptospirosis en los demás municipios.

Para el análisis estadístico se realizó un análisis univariable calculando el valor p para cada variable y el valor de razón de probabilidad con su respectivo intervalo de confianza al 95%. Se buscó una significancia estadística con ($p < 0.05$) entre las variables respecto a la seropositividad de IgM para Leptospirosis.

De acuerdo a este criterio no se encontró una relación significativa para ninguna de las variables analizadas, género, edad, lugar y época. Como se mencionó, para cada aspecto se tuvieron suposiciones de acuerdo a estudios realizados en otros países, sin embargo, dada la epidemiología variable para Leptospirosis, los resultados obtenidos se justifican tomando en cuenta las condiciones propias del departamento de Escuintla y la cantidad de muestras analizadas.

De los casos positivos encontrados en el estudio, se analizaron los síntomas que presentaron estos pacientes, encontrando que los más comunes fueron: fiebre, malestar general, dolor abdominal, cefalea, inapetencia, diarrea, hepatomegalia y la ictericia que fue el único síntoma obligatorio para considerar un caso dentro de la muestra a analizar. Cabe mencionar que el espectro de síntomas es amplio, sin embargo, para esta investigación en donde los parámetros no estaban establecidos, estos fueron relevantes en las fichas epidemiológicas utilizadas. De acuerdo a ($p < 0.05$), la cefalea, hepatomegalia y malestar general fueron los síntomas con significancia estadística, sin embargo, al notar

el intervalo de confianza (que no incluya el valor 1), el único síntoma que presenta una significancia es el malestar general.

Con el análisis que se hizo en esta investigación, se considera que la Leptospirosis es una infección a la que debe dársele mayor atención, debido a que el índice de prevalencia resultó elevado. También se debe mencionar, que al trabajar exclusivamente con muestras procedentes del Centro de Salud de Escuintla, no se puede tomar este dato como representativo de todo el departamento, pero sí como una idea del riesgo que la infección puede llegar a presentar.

No todas las personas con una sintomatología sospechosa de Leptospirosis se presentaron al Centro de Salud de Escuintla, ya sea porque acudieron a otro hospital o bien por razones económicas, de distancia o algún criterio personal, por lo que esto altera de forma negativa la distribución encontrada según el aspecto analizado, representando parcialmente la realidad del problema. Se esperaría que un estudio más amplio diera mayor número de casos positivos para Leptospirosis.

Finalmente, los resultados obtenidos indican un elevado riesgo de Leptospirosis, lo que es útil para alertar a las autoridades en el área.

VII. CONCLUSIONES

- A. Al utilizar la prueba de ELISA, se detectaron títulos positivos de IgM para *Leptospira* en 39 muestras, lo cual representa una prevalencia de 38.27% para el año 2007 en muestras de pacientes con síndrome icterico no viral, del Centro de Salud de Escuintla, Guatemala.
- B. El uso de un kit comercial de ELISA para IgM de *Leptospira* fue eficiente y sensible para el análisis de muestras históricas en el área del departamento de Escuintla con las condiciones propicias para el desarrollo de la infección.
- C. No se encontró una significancia estadística para las variables de género, edad, lugar y época respecto a los resultados seropositivos para IgM de *Leptospira*.
- D. Entre los síntomas que se presentaron en los pacientes con resultados de ELISA positivos para IgM de *Leptospira* está la ictericia, fiebre, hepatomegalia, dolor abdominal, diarrea, inapetencia, cefalea y malestar general.
- E. El único síntoma con significancia estadística en el análisis univariable fue la presencia de malestar general.

VIII. RECOMENDACIONES

Se deben continuar con estudios sobre la enfermedad en la región, ya que los resultados sugieren que en el municipio de Escuintla hay un elevado índice de Leptospirosis.

Se sugiere extender la selección de muestra en área geográfica y en tiempo, lo cual permitiría obtener datos más significativos sobre la región de la Costa Sur del país, que es el área con condiciones climáticas y topográficas más favorables para el desarrollo de la enfermedad.

La sensibilidad del ELISA en muestras de pacientes con sintomatología aguda es de aproximadamente el 70%, sería de utilidad realizar pruebas confirmatorias por métodos moleculares para descartar posibles falsos negativos. Finalmente, ya que en el presente estudio se utilizaron solamente muestras históricas, es recomendable realizar análisis sobre muestras recientes para que los resultados puedan incluirse en los diagnósticos y tratamientos de los pacientes; así como para identificar posibles fuentes de contagio y prevenir posteriores infecciones.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abdulkader, R., *et al.* 2002. *Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 44(2): 79-83.
2. Acha, P. N., *et al.* 1963. *Serological studies on leptospirosis in Guatemala*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 12: 580-585.
3. Agudelo-Florez, P., B. Restrepo-Jaramillo y M. Arboleda-Naranjo. 2007. *Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana*. Instituto Colombiano de Medicina Tropical-Universidad CES. Medellín, Colombia. [web en línea] en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2007000900017
4. Aidorevich, L., Tover, C. 2003. *Muestras a tomar en caso de sospecha de leptospirosis e interpretación de resultados en animales*. INIA-CENIAP Sanidad Animal. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. Venezuela. [web en línea] en: <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/laidorevich.htm>
5. Alfaro, C., Y. Aranguren y A. Clavijo. 2004. *Epidemiología y diagnóstico de la Leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control*. Revista Digital CENIAP HOY Número 6, septiembre-diciembre 2004. Maracay, Aragua, Venezuela. [web en línea] en: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaro_c/arti/alfaro_c.htm
6. Anderson, D. R.; D. J. Sweeney y T. H. Williams. 2004. *Estadística para administración y economía*. 8ª Edición. Thomson. México. 977 pp.
7. Aroca, G., Accini, J., R. Pérez, E. Rodelo, H. Dau. 2004. *Leptospirosis icterica: Síndrome de Weil's*. Salud Uninorte. Barranquilla, Colombia. 19: 31-40. [web en línea] en: ciruelo.uninorte.edu.co/pdf/salud_uinorte/19/4.Lectospirosis_ictERICA.pdf
8. Asfhord, D.A., *et al.* 2000. *Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 63(5,6): 249-254.

9. Baranton, G. y D. Postic. 2006. *Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty years of passive serological surveillance from 1920 to 2003*. International Journal of Infectious Diseases. 10, 162-170.[web en línea] en: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/ijid>
10. Braselli, A. fecha desconocida. *Leptospirosis*. INFECTO. Uruguay. [web en línea] en: <http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm>
11. Broom, J. C. 1953. *Leptospirosis in tropical countries*. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 273-291.
12. Bursac, Z., et al. 2007. *A purposeful selection of variables macro for logistic regresion*. University of Kansas for Medical Sciences. SAS Global Forum. [web en línea] en: <http://www2.sas.com/proceedings/forum2007/173-2007.pdf>
13. Calero, C.; K. R. Reinhard y C. R. Owen. 1957. *Leptospirosis of man in the isthmus of Panama*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 6: 1054-1060.
14. NIH. Fecha desconocida. *Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina*. Departamento de Salud y Servicios Humanos.
15. Céspedes, M. 2005. *Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Reemergente*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Lima, Perú. [web en línea]en:http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/Medicina_Experimental/V22_n4/PDF/a08v22n4.pdf
16. Díaz, D. V. fecha desconocida. *Leptospirosis*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia. Venezuela.
17. Dirección de Análisis Económico. Ministerio de Economía de Guatemala. 2005. Departamento de Escuintla.[web en línea] en: <http://www.mineco.gob.gt/mineco/analisis/departamentos/escuintla.pdf>
18. Effler, P. V. et al. 2002. *Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii*. Journal of Clinical Microbiology. 40(4): 1464-1469.
19. Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. 2002. *Diagnostic Microbiology*. 11a Edición. Mosby. Estados Unidos de América. 1069 páginas.
20. GraphPad Software, Inc. 2002-2005. [programa informatico en línea]. Disponible via Internet en: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>

21. Jansen, A., *et al.* 2007. *Leptospirosis in Urban Wild Boars, Berlin, Germany*. *Emerging Infectious Diseases*. 13(5): 739-742. [web en línea] en: www.cdc.gov/eid
22. Johnson, M. A. S., *et al.* 2004. *Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru*. *Emerging Infectious Diseases*. 10(6):1016-1022. [web en línea] en: www.cdc.gov/eid.
23. Johnson, R. C., fecha desconocida. *Leptospirosis MedMicro*. Capítulo 35. [web en línea] en: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch035.htm>
24. Laguna-Torres. 2000. *Leptospirosis. Oficina General de Epidemiología*. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. 56 páginas. [web en línea] en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/M%C3%B3dulo%20T%C3%A9cnico%20leptospirosis.PDF>
25. Levett, P. 2004. *Leptospirosis: A forgotten zoonosis?*. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 4 :435-448.
26. -----, 2001. *Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. 14 (2): 296-326.
27. Levett, P. y S. L-. Branch. 2002. *Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis*. *American Journal of Tropical Medicine*. 66(6): 745-748.
28. Microsoft Excel. 2003. Microsoft Office 2007.
29. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 2004. *La Semana Epidemiológica en Guatemala. No. 426*. [web en línea] en: <http://www.mspas.gob.gt/cms2/docs/epi/SEM%20No%2012-2006.pdf>
30. Narbona, I. M., *et al.* 2007. *Leptospirosis Humana*. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. [web en línea] en: <http://www.uvfajardo.sld.cu/Members/Ioana/leptospirosis-humana-revision-de-tema/>
31. Organización Panamericana de la Salud. 1998. *Informe sobre la Situación Epidemiológica en Centroamérica*. [web en línea] en: <http://www.paho.org/Spanish/dd/Ped/pedhsit2.htm>

32. Pantaleón. 2000. [web en línea] en: <http://www.pantaleon.com/index.php?contact=1>
33. Pappas, G., et al. 2007. *The globalization of leptospirosis: worldwide incidente trends*. International Journal of Infection Diseases. 1:7.
34. Rodríguez, T., Suárez, G. fecha desconocida. *Evaluación del sistema de vigilancia para leptospirosis*. Vigilancia Epidemiológica. El Salvador. [web en línea] en: <http://desastres.cies.edu.ni/digitaliza/tesis/t276/seccione.pdf>
35. Schlossberger, H. y H. Brandis. 1954. *Leptospira*. *Annual Reviews of Microbiology*. 8: 133-152. [web en línea] en: www.annualreviews.org/aronline.
36. Sharma, B., et al. 2007. *Application of rapid dot-Elisa for antibody detection of leptospirosis*. Journal of Medical Microbiology. 56: 873-874.
37. Swapna, R. N.; U. Tuteja y L. N. Sudarsana. 2006. *Seroprevalence of leptospirosis in high risk groups in Calicut, North Kerala, India*.
38. Tong, M. J., et al. 1971. *Immunological response in leptospirosis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 20(4): 625-630.
39. Vieria, L.V.; M. J. Gama-Simoes y M. Collares- Pereira. 2006. *Human Leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years*. International Journal of Infectious Diseases. 10: 378-386. [web en línea] en: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/ijid>.
40. Wang, Z.; L. Jin y A. Wefrzyn. 2007. *Leptospirosis vaccines*. *Microbial Cell Factories*. [web en línea] en: <http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/39>
41. World Health Organization (WHO). Internacional Leptospirosis Society (ILS). Fecha desconocida. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. [web en línea] en: http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf
42. Wuthiekanun, V., et al. 2007. *Clinical diagnosis and geographic distribution of Leptospirosis, Thailand*. Emerging Infectious Diseases. 13(1):124-126. [web en línea] en: www.cdc.gov/eid

X. ANEXOS

Anexo I Ficha de vigilancia epidemiológica

PROTOCOLOS DE VIGILANCIA APIDEMIOLÓGICA



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

FICHA EPIDEMIOLOGICA 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: (SI)(NO)

Fecha de hospitalización: ___/___/___

Signos y/o síntomas	SI	NO	Signos y/o síntomas	SI	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 EPIDEMIOLOGICOS

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 EPIDEMIOLOGICA

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 +, ó 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 QUEDARA ARCHIVADA EN EL SERVICIO EN QUE SE ESTUDIO EL CASO, COPIAS DE ESTA FICHA
 ENVIARLAS A:

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

Anexo II

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



COMITÉ DE ETICA DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

SOLICITUD DE APROBACIÓN RÁPIDA DE PROTOCOLO

FORMULARIO CE-ARP1

Fecha de recibido (dd/mm/aaaa): 2007	
<p>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 Etica 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.</p>	
Fecha de entrega por el Investigador (dd/mm/aaaa): 24/03/2007	Protocolo No. [REDACTED] (para uso interno del CE)
Título del Protocolo:	Identificación de Leptospira spp. por detección de anticuerpos IgM, con la prueba de ELISA, de muestras de sueros de pacientes con síndrome icterico no viral del Centro de Salud de Escuintla, Guatemala
Investigador Principal (IP)	
Nombre: LUISA FERNANDA	Apellido: DUARTE FLORES
Grado Académico: [REDACTED]	
No. Verificación Curso de Etica: [REDACTED]	Fecha en que se obtuvo (dd/mm/aa): [REDACTED]
Teléfono: 53084676	Fax: [REDACTED] Pais: GUATEMALA
e-mail: luisaduarte3@yahoo.com	Página Web: [REDACTED]
No. Verificación Curso de Etica: [REDACTED]	Fecha en que se obtuvo (dd/mm/aa): [REDACTED]
Teléfono: 52055872	Fax: [REDACTED] Pais: GUATEMALA
e-mail: ccontreras@gt.cdc.gov	Página Web: [REDACTED]
Población:	
# Estimado de personas: 100	Distribución por género: 50.00 % femenino 50.00 % masculino
Distribución de raza / etnicidad de las personas incluidas en el estudio:	
1.00 % indígenas 99.00 % ladinos [REDACTED] % otros: especifique: [REDACTED]	
Poblaciones Vulnerables	
¿Alguna población vulnerable se incluirá en el estudio? <input checked="" type="checkbox"/> Sí (si la respuesta es Si, marcar todas las que se aplican):	
<input type="checkbox"/> Mujeres embarazadas (como un grupo clave)	<input checked="" type="checkbox"/> Niños de 17 años de edad o menores
<input type="checkbox"/> Fetos	<input type="checkbox"/> Personas con incapacidad mental
<input type="checkbox"/> Poblaciones cautivas	<input checked="" type="checkbox"/> Personas con desventajas educacionales o económicas
Preguntas sobre el diseño del estudio?	
1. ¿Tendrán los investigadores acceso a los identificadores personales?	<input checked="" type="checkbox"/> Sí
2. ¿Se ha requerido reemplazo, modificación o alguna renuncia de consentimiento informado (escrito u oral) en este proyecto?	<input type="checkbox"/> No
3. ¿Se solicita un desistimiento de la documentación del consentimiento para este proyecto?	<input type="checkbox"/> 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?	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): 15/01/2007 Fin (dd/mm/aa): 14/04/2008			
Fondos Indicar la fuente de financiamiento: PERSONAL			
Número de contrato proporcionado por la fuente de financiamiento: [REDACTED]			
Periodo de financiamiento: Del (dd/mm/aa): [REDACTED] al (dd/mm/aa): [REDACTED]			
Área geográfica donde se realizará la investigación: Departamento de Escuintla, Guatemala			
Instituciones que colaboran en el estudio			
Nombre	Localización	No. de CE	NA
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social	2a calle 1-70, zona 4, Col. Izcuintlan, Escuintla	[REDACTED]	<input type="checkbox"/>
Universidad del Valle de Guatemala	18 ave. 11-95 zona 15 V.H III	[REDACTED]	<input type="checkbox"/>
Guatemala	10 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: hoja anexa			
Objetivos de la investigación: hoja anexa			
Métodos para el reclutamiento de participantes: hoja anexa			
Resumen de los procedimientos a utilizar en los participantes de esta investigación y su grado de riesgo: no aplica			
Riesgo de la investigación: física, psicológica, social (si hubiere alguno): no aplica			
Beneficios para los participantes en el estudio (si hubiera alguno): hoja anexa			
Manejo de información (seguridad y confidencialidad de la información colectada) y manejo de muestras clínicas: hoja anexa			
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:			
Investigador Principal			
Nombre (s): Luisa Fernanda		Apellido (s): Duarte Flores	

Anexo III

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

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:

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

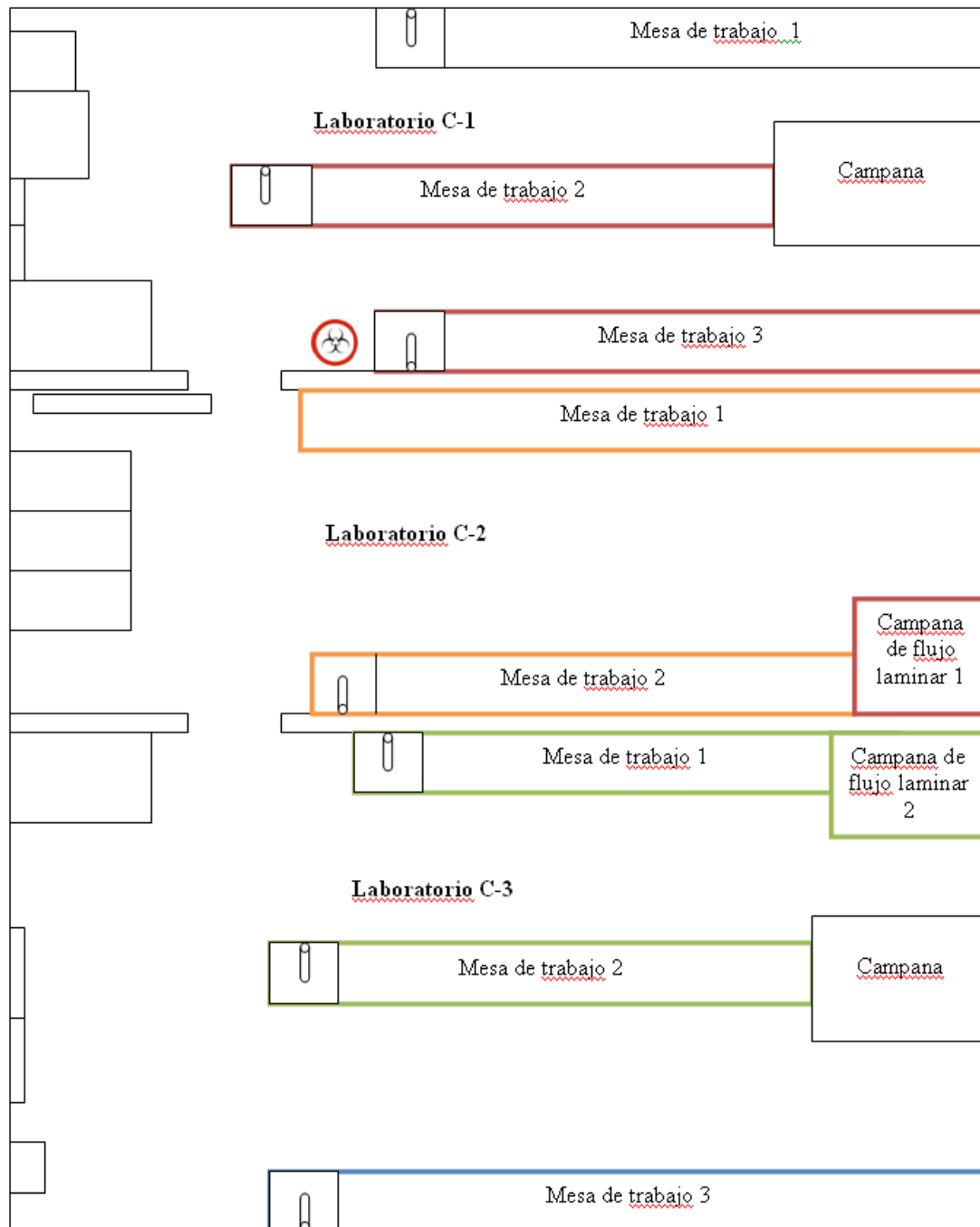
****NOTA:** se aclara que la metodología de detección de *Leptospira spp* ha sido detallada previamente en la sección de metodología y que es complemento al diagnostico de rutina del Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social, por lo que se solicitó al comité de ética de la Universidad del Valle 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

Mapa 1: en la figura anterior se observa el mapa de los laboratorios de planta baja del edificio C. estos laboratorios corresponden al laboratorio 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 biopeligrosos. Lavado de material contaminado.
	Preparación de material y reactivos. Lavado de cristalería y otros materiales.		

Anexo IV**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

Cuadro 1	
Área evaluada	Dirección del flujo
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

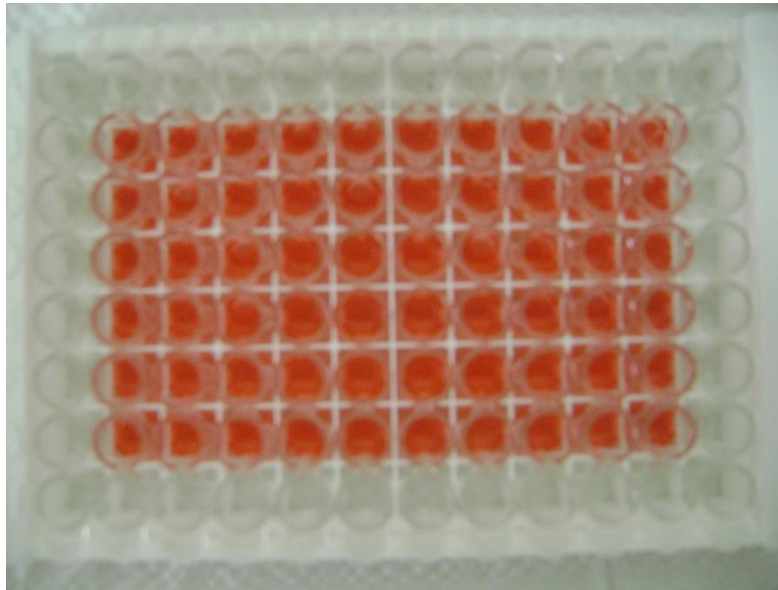
Cuadro no.2: Resultados de las mediciones de velocidad del aire dentro de la campana

Cuadro 2							
Celdas (1 ft c/u)	Distancia desde el borde derecho	Flujo 1 (ft/min)	Flujo 2 (ft/min)	Flujo 3 (ft/min)	Flujo 4 (ft/min)	Flujo 5 (ft/min)	Promedio (ft/min)
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

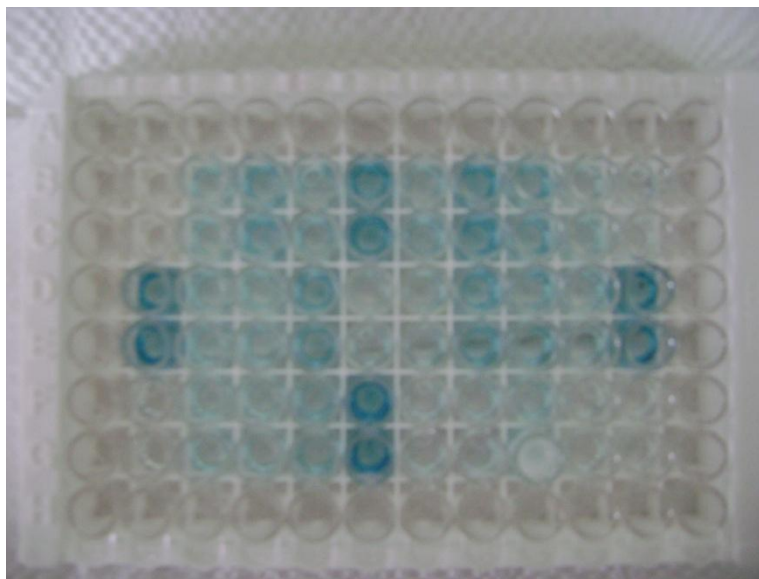
Conclusiones: según los valores del cuadro no.2, la campana laminar presenta velocidades de aire entre 50.6-60.8 ft/min, y siendo el valor promedio esperado de 55 ± 5 ft/min, los resultados obtenidos se pueden considerar aceptables.

Anexo V**Placas de ELISA**

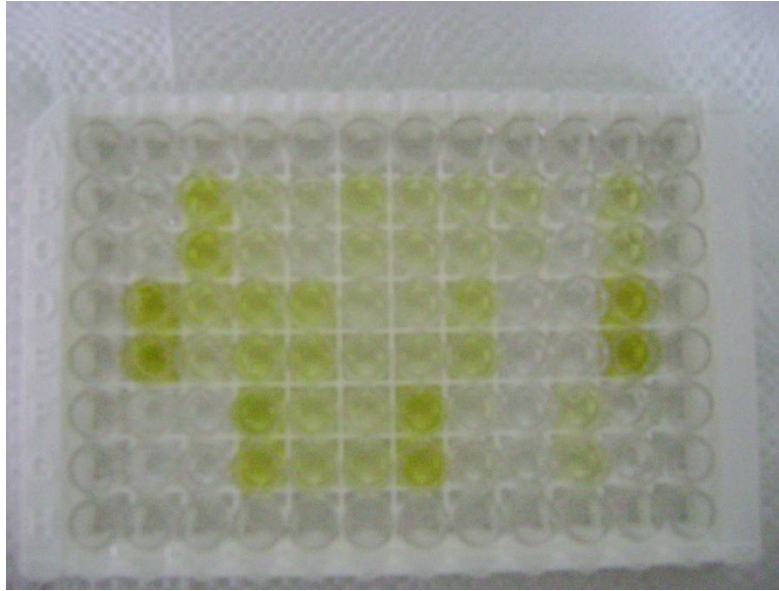
1. Placa de ELISA al agregar la enzima conjugada



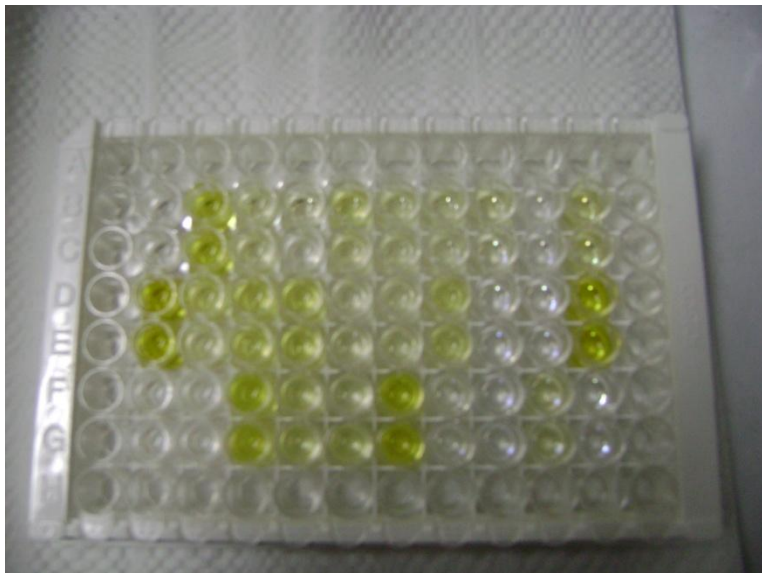
2. Placa de ELISA al agregar el cromógeno



3. Placa de ELISA al agregar la solución de stop



4. Placa de ELISA al momento de la lectura



Anexo VI

Códigos utilizados para tabulación y análisis de datos

A las variables analizadas se les asignó un código al momento de su tabulación.

Variable	División	Código
Género	Femenino	1
	Masculino	0
Edad en años	2 a 4	1
	5 a 9	2
	10 a 65	3
Época	Seca Fría	1
	Lluviosa	2
Región	Escuintla	1
	Santa LucíaCotzumalguapa	2
	Otros municipios	3
Síntomas	Presente	1
	Ausente	0
Resultado de la prueba de Elisa	Positivo	1
	Negativo	0

Anexo VII

Datos epidemiológicos tabulados para cada caso sospechoso de Leptospirosis

Mes	género	etareo	fiebre	cefalea	Dolor abdominal	Hepatomegalia	Inapetencia	Malestar general	diarrea	Lugar	Resultado
1	0	3	1	1	1	0	1	0	1	1	0
1	1	3	1	0	1	1	1	1	0	3	0
1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1	0	2	1	1	1	0	1	1	0	3	1
1	0	3	1	1	1	1	1	1	0	2	0
1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	3	0
1	1	2	1	0	1	0	1	1	0	2	0
1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
1	1	3	1	1	1	0	1	1	0	3	0
1	0	3	1	1	1	1	0	1	0	3	0
1	1	3	0	1	1	1	1	1	0	3	0
1	1	3	1	1	0	1	1	1	0	3	1
1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1	1	2	1	0	1	1	1	1	0	2	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	3	1
1	0	3	1	1	1	1	1	1	0	3	1
1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	2	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	3	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
1	0	3	1	1	0	0	1	0	1	1	1
1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1

Mes	género	etareo	fiebre	cefalea	Dolor abdominal	Hepatomegalia	Inapetencia	Malestar general	diarrea	Lugar	Resultado
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1	1	3	1	1	1	1	1	1	0	3	0
1	0	2	1	1	1	1	1	1	0	3	1
1	1	3	0	1	0	0	0	1	0	3	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	3	0
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0
1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	3	0
1	0	3	1	0	1	0	0	1	0	2	0
1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	0
1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	2	0
1	1	2	1	1	1	0	1	0	1	3	0
1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1	0	3	1	1	1	1	1	1	0	3	0
2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	3	0
2	1	2	1	1	1	0	1	1	0	1	1
2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	3	1
2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
2	0	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1
2	0	3	0	1	0	1	0	1	0	1	1
2	1	3	1	1	1	1	1	1	0	3	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	3	0
2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1
2	0	3	1	1	1	1	1	1	0	2	0
2	0	2	1	1	1	1	1	0	1	3	0
2	0	3	1	1	1	0	1	1	0	2	0
2	1	2	1	1	1	1	1	0	0	1	0
2	1	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	0	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	1	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0
2	0	2	1	1	1	0	1	0	0	2	0
2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0
2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
2	0	3	1	1	1	0	1	1	1	1	0
2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
2	0	2	1	1	0	1	1	1	0	2	0
2	1	2	1	1	0	1	1	1	0	2	0
2	0	2	1	1	1	1	1	0	0	1	0
2	0	2	1	0	1	1	0	1	0	2	0
2	1	2	1	1	1	0	1	1	0	2	0
2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	2	0
2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	1	3	0	0	0	1	0	0	1	3	0
2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	3	1	1	1	1	0	1	1	1	0
2	0	3	0	0	0	1	1	1	0	1	0
2	1	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2	0	3	1	1	0	0	1	1	1	1	0
2	0	3	1	1	1	1	1	1	1	2	0
2	1	2	1	1	1	1	1	0	1	2	0
2	0	1	1	1	1	1	0	1	1	2	0
2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	2	0
2	0	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0
2	1	2	1	1	1	0	1	0	0	2	0
2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	2	1
2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	2	0

Mes	género	etareo	fiebre	cefalea	Dolor abdominal	Hepatomegalia	Inapetencia	Malestar general	diarrea	Lugar	Resultado
2	0	3	1	1	1	1	1	1	1	2	0
2	0	2	1	0	1	0	1	1	0	3	0
2	0	3	1	1	1	1	1	1	0	3	1
2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
2	1	2	1	1	1	1	0	0	1	2	0
2	1	3	1	1	1	0	1	1	1	2	0
2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
2	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
1	0	3	1	1	1	1	1	1	0	2	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	3	1	0	1	1	1	0	0	2	0
1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	2	0
1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	2	0
1	0	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1