

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA**

**UNAN-León**

**Escuela de Ciencias Agropecuarias y Veterinarias**



**Tesis para optar al título de Médico en Medicina Veterinaria**

**Tema:**

**“Identificación de leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015”.**

**Autor:**

Br. Nicolás Antonio López Ramírez

**Tutor:**

Lic. Byron Flores Somarriba, MSc, PhD.

**León, Marzo 2017**

**“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”**



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. ANTECEDENTE .....	10
3. JUSTIFICACIÓN .....	12
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
<b>5.1 Objetivo general.....</b>	<b>14</b>
<b>5.2 Objetivo específico .....</b>	<b>14</b>
6. MARCO TEÓRICO.....	15
<b>6.1 Leptospirosis.....</b>	<b>15</b>
<b>6.2 Etiología.....</b>	<b>15</b>
<b>6.3 Clasificación taxonómica .....</b>	<b>16</b>
<b>6.4 Resistencia del agente etiológico .....</b>	<b>17</b>
<b>6.5 Epidemiología.....</b>	<b>18</b>
<b>6.6 Fuente de infección y transmisión .....</b>	<b>19</b>
<b>6.7 Especies susceptibles .....</b>	<b>20</b>
<b>6.8 Patogenia.....</b>	<b>20</b>
<b>6.9 Respuesta inmunitaria.....</b>	<b>21</b>
<b>6.10 Manifestaciones clínicas .....</b>	<b>22</b>
<b>6.10.1- Leptospirosis asintomática .....</b>	<b>23</b>
<b>6.10.2- Leptospirosis sintomática.....</b>	<b>23</b>
<b>6.11 Diagnóstico .....</b>	<b>24</b>
<b>6.11.1- Diagnóstico diferencial .....</b>	<b>24</b>
<b>6.11.2- Pruebas de diagnóstico .....</b>	<b>24</b>
<b>6.11.3- Diagnóstico directo.....</b>	<b>24</b>
<b>6.11.4- Diagnóstico serológico.....</b>	<b>25</b>
<b>6.11.5- Prueba de microaglutinación .....</b>	<b>25</b>
<b>6.11.6- Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas.....</b>	<b>25</b>
<b>6.11.7- Fijación de complemento .....</b>	<b>26</b>
<b>6.11.8- Diagnóstico molecular .....</b>	<b>26</b>
<b>6.11.9- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....</b>	<b>26</b>



“Identificación de leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”



6.11.10-	Método isotérmico.....	27
6.11.11-	Diagnóstico epidemiológico.....	28
6.12	Tratamiento y profilaxis.....	28
7.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
7.1	Tipo de estudio.....	30
7.2	Población en estudio.....	30
7.3	Área de estudio.....	30
7.4	Período de estudio.....	30
7.5	Tamaño de muestras.....	30
7.6	Selección de muestra.....	31
7.7	Factores de inclusión.....	31
7.8	Factores de exclusión.....	31
7.9	Tipo de muestreo.....	31
7.10	Toma y envío de muestra.....	31
7.11	Análisis de las muestras.....	32
7.12	Análisis estadísticos.....	35
8.	RESULTADOS.....	36
8.1	Serológicos.....	36
8.2	Aislamientos.....	37
8.3	Moleculares.....	38
9.	DISCUSIÓN.....	39
10.	CONCLUSIONES.....	42
11.	RECOMENDACIONES.....	43
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	44
13.	ANEXOS.....	48



## I. DEDICATORIA

### A

#### Dios

Que me permite estar siempre en pie, brindándome sabiduría e inteligencia, y gracias a ello culminar mis estudios y así poder llevar a cabo esta investigación.

#### A mis Padres

Juan Carlos López y Paula Benita Ramírez, que se han mantenido firmes como guías en mí andar, y me han brindado el maravilloso regalo de la educación; que gracias a sus esfuerzos y sacrificios logre culminar con éxito mis estudios universitarios.

#### A mis Amigos

Dr. Pedro Solís, Dr. Álvaro Chávez y Edgar Blanco quienes confiaron en mí, me brindaron apoyo y estuvieron pendiente en la realización de este estudio.



## II. AGRADECIMIENTO

### Quiero agradecer a:

#### Dios:

Por estar siempre conmigo en cada paso que doy.

#### Mis padres:

Por brindarme el apoyo moral, económico y ser un pilar para seguir adelante.

#### Tutor:

PhD. Byron Flores por brindarme parte de su tiempo y apoyo incondicional en la elaboración de esta investigación, por ser tan paciente, amable y comprensivo... ¡Muchas Gracias!

#### Amigos:

A Dr. Álvaro Chávez quien fue el ánimo y apoyo en las fuentes que requería la elaboración de esta investigación, y quien por el transcurso de la vida universitaria obtuve su apoyo incondicional.

Al equipo de Trabajo de CEVEDI: MSc. Brenda Mora, Dra. Eveling Pérez y Dr. William Jirón, que aparte de enseñarme cada actividad del laboratorio, aprendí el trabajo en equipo, en especial a la Dra. Jessica Sheleby Elías por ser la motivación en el inicio de esta investigación y motivarme a emprender la aventura que requería la elaboración de este estudio.



### III. RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis importante en Nicaragua, debido a que el país presta las condiciones para la supervivencia de la espiroqueta. Por tal razón el objetivo en este estudio fue identificar *Leptospira* patógena en muestras de animales domésticos y ambiente (agua y suelo) asociados a los casos positivos a leptospirosis humana en el pacífico y norte de Nicaragua en el año 2015. Con esta finalidad se consideraron 132 muestras de suero en 5 especies de animales domésticos y 116 muestras ambientales en 8 departamentos, por lo que, se empleó dos técnicas diagnósticas para la detección de *Leptospira interrogans (sensu lato)*, en muestra de suero (MAT) y ambiente (PCR). Todas las muestras de agua y suelo se filtraron y se inocularon en McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH) suplementado con 5-fluorouracilo, Anfotericina b y Rifampicina. Los cultivos se incubaron a 30 °C y se observaron bajo un microscopio de campo oscuro con intervalos de 8 días. El resultado de la MAT reveló que, de 132 muestras de suero, el 17.4% reaccionaron a la prueba, a partir de una dilución de 1:400, siendo la especie canina la que presentó mayor porcentaje de reactores, el serogrupo Icterohaemorrhagiae mostró mayor frecuencia en el estudio. En cambio el análisis de la PCR en ambiente reflejó que, de 20 muestras positivas al aislamiento, el 3.8% (3/20) presentaron amplificación al segmento de 331 pb del gen *lfb1*. Con este trabajo se logró identificar la presencia de leptospiras patógenas en muestras de animales domésticos y ambiente, lo que remarca la necesidad de un abordaje multifactorial para el control de la leptospirosis en Nicaragua.



#### IV. ABREVIATURA Y ACRONIMOS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNr:** ADN ribosómico.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNr:** ARN ribosómico.

**CF:** Fijación de complemento.

**dATP:** Trifosfato de desoxiadenosina, del inglés deoxyadenosine triphosphate.

**dCTP:** Trifosfato de desoxicitidina, del inglés deoxycytidine triphosphate.

**dGTP:** Trifosfato de desoxiguanosina, del inglés deoxyguanosine triphosphate.

**dTTP:** Trifosfato de desoxitimidin, del inglés deoxythymidine triphosphate.

**ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas.

**EMJH:** Ellinghausen-McClough-modificado por Johnson y Harries.

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo.

**MAT:** Prueba de Aglutinación Microscópica (por sus siglas en inglés).

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio.

**NaCl:** Cloruro de sodio.

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud.

**Pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés).

**Spp.:** Especies.



## V. GLOSARIO

**Aglutinación:** agrupamiento en pequeños cúmulos de cuerpos formes (microbios, hematíes) portadores de un antígeno y en suspensión en un líquido originado cuando se introduce el anticuerpo correspondiente en el líquido.

**Amplicones:** conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esencialmente se trata de un clon molecular.

**Anticuerpo:** es una proteína producida por el sistema inmunitario del cuerpo cuando detecta sustancia dañina, llamada antígeno.

**Antígeno:** toda sustancia que, introducida en un organismo que no la poseía, provoca en él la formación de un anticuerpo específico con el cual puede combinarse de forma electiva.

**Cebadores:** oligonucleótido de 5-20 nucleótidos de longitud que sirve como punto de partida para la replicación de ADN.

**Desnaturalización:** cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.

**Electroforesis:** es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

**Endemicidad:** persistencia en una región de una enfermedad particular, bien porque está presente constantemente o bien porque reaparece en épocas determinadas.

**Endemoepidémico:** aumento de incidencia superior al esperado en el contexto de una epidemia.

**Endonucleasa:** es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a este. Los sitios de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos.





**Espiroqueta:** bacteria en forma espiral, de cuerpo delgado y flexible, que se desplaza por movimientos activos, por lo que las características morfológicas y unos órganos de locomoción que les diferencian del resto de las bacterias.

**Gen:** es una secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN, en el caso de algunos virus) que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas pero también ARNm, ARNr y ARNt.

**Genoma:** es todo el ADN de un organismo, incluidos sus genes, unos treinta mil en el caso de los humanos (hasta hace poco se pensaba que eran sobre ochenta mil).

**Glicoproteínas:** moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix).

**Leptospirosis:** enfermedad infecto-contagiosa que afecta a los seres humanos, los animales domésticos y silvestres.

**Lisis:** rompimiento de la membrana celular.

**Monoclonal:** es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.

**Nucleasa:** son enzimas que pueden ser tanto ribonucleasas (RNAsas) como desoxirribonucleasas (DNAsas), las primeras hidrolizan al ARN y las segundas al ADN.

**Nucleótidos:** son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

**Opsonización:** proceso por el que se marca a un patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito.

**Oligonucleótidos:** es una secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos.

**Patógena:** es todo agente que puede producir enfermedad.



**Polimerasa:** es una enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

**Polimorfismo:** hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

**Saprófito:** bacterias que no se desarrollan en el organismo vivo y que se alimentan de los desperdicios de alimentos generados por el propio organismo.

**Tamizaje:** exámenes aplicados con el fin de identificar una población, aparentemente sana, en mayor riesgo de tener una determinada enfermedad, que hasta ese momento no se les ha diagnosticado.



## 1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis con una amplia distribución mundial que se presenta principalmente en zonas tropicales, subtropicales y templadas. Es considerada un problema de salud pública mundial reemergente, debido a su incremento tanto en países en desarrollo como desarrollados (1).

Las *Leptospira* pertenecen al orden *Spirochaetales*, Familia *Leptospiraceae*, y género *Leptospira*, que comprende dos especies fenotípicas: *Leptospira biflexa*, no patógena, de vida libre, saprofitas y se encuentra en ambiente húmedos y aguas superficiales, y *L. interrogans*, a la que pertenece las leptospirosis patógenas causante de la leptospirosis y que, de acuerdo con sus características serológicas, se clasifican en serogrupos constituidos por serovares (1). La *Leptospira* es una bacteria helicoidal, con extremos libres que terminan en forma de ganchos; son móviles, aerobios, cultivables, y flexibles de 5-60  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.1-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se pueden visualizar por microscopía de campo oscuro; pueden atravesar filtros que retienen a otras bacterias (2).

La especie que interesa como agente zoonótico es *L. interrogans*, que contiene más de 200 variantes serológicas, denominadas serovares, y que constituyen el taxón básico (2).

Los reservorios de las *Leptospira* spp., son animales que mantienen una relación de comensales con las bacterias y sufren muy levemente la enfermedad; transfieren las leptospirosis a sus crías en útero o el periodo neonatal, favoreciendo la cadena de transmisión. Los portadores son aquellos animales que mantienen las leptospirosis viables y con capacidad de multiplicarse en sus riñones, excretándolas intermitentemente por la orina; muchos de estos pueden tener serología negativa.

Las leptospirosis en agua, a temperatura ambiente, permanecen viables durante varios meses con un pH de 7,2 a 8,0 bajo las condiciones del laboratorio; la supervivencia en agua de río es más corta pero es prolongada a bajas temperaturas. En aguas servidas domésticas disminuye el tiempo de supervivencia a pocas horas; en tierra ácida (pH 6,2) sobreviven por siete semanas, y en lodo de tierra por lo menos tres semanas. También se piensa que los rezagos de detergente han reducido la supervivencia de la *Leptospira* en los desagües, pues se inhiben a concentraciones bajas de detergente. Cuando la tierra



se contamina con la orina de las ratas infectadas las leptospiras sobrevive durante aproximadamente dos semanas (3).

El desarrollo de novedosas técnicas de biología molecular desempeña un papel importante en el diagnóstico temprano de la leptospirosis, el cual está enfocado en la detección directa de secuencias blanco de ADN en muestras clínicas. Los métodos basados en el ADN, tales como la hibridación, PCR y *Southern blot*, que emplean secuencias específicas, ha permitido la identificación de especies de leptospiras patógenas y no patógenas (4). La PCR (por sus siglas en inglés) aplicada a *Leptospira* se ha estudiado con el fin de diferenciar cepas saprófitas de patógenas. Además, se utiliza con éxito en estudios epidemiológicos, lo que aporta un mayor grado de información al determinar la identidad (serogrupo/serovar específico) de las cepas circulantes (5).

En el presente estudio se pretende identificar *Leptospira* patógenas en muestras ambientales y animales domésticos mediante análisis serológicos (MAT) y molecular (PCR) de 8 departamentos de Nicaragua, con el fin de promover medidas de control y prevención de leptospirosis.



## 2. ANTECEDENTE

Flores, evaluó el comportamiento epidemiológico de *Leptospira* spp., en animales domésticos, roedores y aguas, cercanos a los casos de leptospirosis humana en Nicaragua, durante los años 2007-2013. Revelando que, mediante la MAT, Chinandega, León, Managua y Masaya fueron los departamentos con mayor porcentajes de animales positivos (6)

García y Rivas, en el periodo del 2009 al 2010, determinaron la presencia de *Leptospira interrogans* en muestras de suero y orina de animales domésticos, mediante la implementación de las técnicas MAT y PCR. Se examinaron muestras de 62 animales domésticos (62 muestras de orina y 56 muestras de suero sanguíneo) de diferentes municipios de Nicaragua. De 56 muestras de suero recolectadas 42.85% demostraron ser reactivos a *Leptospira* por la MAT y entre las especies muestreadas, la bovina y porcina resultaron ser las de mayor frecuencia con un 35% y 55.50% respectivamente (7).

En Taiwán, Chan *et al.*, (2010-2011) en su estudio por descubrir la presencia de leptospiras en la especie felina mediante el análisis de serológico (MAT) y molecular (PCR), reveló que de 233 felinos muestreados (159 callejeros y 74 domésticos) el 9.3% presentaron anticuerpos específicos para leptospiras patógenas (serogrupos), mientras que en muestras de orina mediante el análisis de la PCR, el 67.8% resultaron ser positivas para las secuencias de ADN leptospiras patógenas (8).

En el 2011 Pineda determinó la prevalencia de *Leptospira* y serogrupos circulantes en animales domésticos asociados a casos en leptospirosis humana en el pacífico y al norte de Nicaragua. Demostrando que, de 230 muestras de sangre de animales domésticos el 23.4% resultaron ser reactivos a la prueba de Microaglutinación, y la especie bovina resultó tener mayor porcentaje en el estudio (45.74%) (9).

En la península de Malasia, Benacer *et al.*, identificaron leptospiras saprófitas y patógenas en agua y suelo en los sitios urbanos. De 151 muestras ambientales (121 agua y 30 suelo), el 23.1% (28/121) de muestras de agua y 23.3% (7/30) de suelo resultaron



## “Identificación de leptospirosis patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”

---



ser positivas al aislamiento. sin embargo la PCR reveló que 2 de cada 8 aislamientos fueron confirmados como patógenos (10).

En una zona endémica al este de Polonia Wójcik-Fatla *et al.*, en el año 2014 evaluaron la ocurrencia de *Leptospira* ADN en agua y suelo, lo que, para comprobar un posible papel de los recursos naturales del agua y del suelo en la persistencia y la propagación de *Leptospira*, recolectó 80 muestras ambientales (40 agua y 40 suelo) en zonas expuestas a inundaciones, y 132 muestras ambientales (64 agua y 68 suelo), en una zona no expuesta a inundaciones. Se utilizó Nested-PCR para la identificación de leptospirosis patógenas, lo que únicamente mostraron amplificación el 0.5% de muestras de agua de la zona expuesta a inundaciones (11).

En el 2014 Saito *et al.*, realizaron un análisis comparativo de cepas de leptospirosis, aisladas de suelo y agua ambiental en Filipinas y Japón. En este estudio se recolectaron un total de 88 muestras de suelo y agua de tres sitios: Metro Manila y Nueva Ecija, Filipinas (área donde actualmente es endémica) y Fukuoka, Japón (área donde la *Leptospira* era endémica). Se logró aislar *Leptospira* de 37 muestras utilizando la combinación novedosa de cinco agentes antimicrobianos reportados en 2011, dirigido al gen 16S rRNA mediante el análisis filogenético, cuatro aislados en Fukuoka se identificaron como una especie patógena (12).



### 3. JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa aguda y febril, causada por una bacteria del género *Leptospira*, de la especie *interrogans* afectando a los animales salvajes y domésticos sirviendo como una fuente de infección para el hombre.

La leptospirosis es conocida alrededor del mundo como una zoonosis, en mayor grado en climas tropicales por contener el ambiente propicio para la espiroqueta siendo una enfermedad endémica en Nicaragua, en especial en algunos de sus departamentos, con alta frecuencia de presentación de casos positivos en humanos, así como pérdidas económicas, teniendo una estrecha relación con los eventos climatológicos extremos como las lluvias, tanto moderadas como intensas.

La orina es una de las fuentes principales de contaminación ya que los animales pueden eliminarlas en periodos prolongados, diseminándose en agua y suelo, teniendo su capacidad de sobrevivir en el ambiente tales como ríos, suelos húmedos y logrando así, su distribución en distintas áreas, atribuido a las diferentes zonas climática del país.

En la salud pública es de suma importancia este estudio debido que Nicaragua es un país endémico a leptospirosis sobre todo la zona del pacífico, donde a medida de los años se han venido presentando brotes significativos desde 1995, como se produjo con intensidad en el departamento de León (Achuapa), por lo tanto, es necesario mantener la vigilancia epidemiológica e identificar los factores de riesgo para evitar nuevos brotes a través de programas de prevención y control elaborados de manera conjunta con las instituciones responsables, (IPSA, MINSA).

Por tal razón se decide llevar a cabo esta investigación con el objetivo de lograr identificar leptospirosis patógenas de muestras ambientales (agua-suelo) y de animales doméstico, obtenidos de los 8 departamentos de Nicaragua, puesto que estos datos aportan bases epidemiológicas para generar medidas preventivas en generaciones futuras.



#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cuál es la frecuencia de leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua?





## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Identificar leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.

### 5.2 Objetivo específico

- Detectar anticuerpos frente a *Leptospira* spp., en animales domésticos mediante la técnica de referencia MAT.
- Conocer los serogrupos patógenos circulante en animales domésticos a través de la MAT-cuantitativa.
- Determinar la presencia de *Leptospira interrogans* por PCR en aislamientos positivos a muestras ambientales (agua-suelo) y orina de animales domésticos.



## 6. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas llamadas leptospiras, la cual se clasifican como miembros de la *Leptospira interrogans*; que son transmitidas, directa o indirectamente, desde los animales a los humanos siendo, por tanto, una zoonosis y la transmisión entre humanos ocurre muy raramente (13, 14).

### 6.2 Etiología

*Leptospira* es etiológicamente procedente del griego que significa Lepto: fino y espira: espiral (3). Las leptospiras son microorganismos helicoidales, enrolladas estrechamente, delgadas, flexibles de 5-60  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.1-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, constituidas por un cuerpo citoplasmático y un axostilo que se dispone en forma de espiral con una membrana envolvente que recubre ambas estructuras. Esta membrana externa multiestratificada es rica en lípidos (20%); la bacteria presenta además peptidoglicano y, en algunos casos, ácido  $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopilémico. La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) altamente inmunogénicos, responsables de la especificidad de los serovares, varias lipoproteínas (*LipL32*, *LipL41*) porinas (*OmpL1*, *OmpL85*) que son altamente conservadas, constituyen el sitio de interacción con el hospedero y al parecer participan en la patogénesis de la nefritis intersticial y en la respuesta inmune innata (15, 16). En la membrana interna, recubierta por el peptidoglicano, se encuentra lipoproteínas Sec, SPasa I y II, LoICDE y el cuerpo basal del endoflagelo, un sistema de secreción tipo II que enlaza ambas membrana (17).

El axostilo consiste en dos filamentos axiales que se insertan en extremos opuestos del cuerpo citoplasmático, por medio de botones terminales y extremos libres que se extienden hacia la mitad de la célula sin llegar a cruzarse. Este organelo es el encargado de la motilidad de la *Leptospira* y le confiere un movimiento activo de rotación. Dependiendo de la longitud, la bacteria tiene un promedio de 18 a 20 hélices por célula y la conformación es dextrógira (en dirección de las manecillas de un reloj). Las leptospiras se observan fácilmente con apoyo de microscopía de campo oscuro (18).



### 6.3 Clasificación taxonómica

Phylum: Protofita

Clase: *Schizomycetes*.

Orden: *Spirochaetales*.

Familia: *Treponemataceas*.

Género: *Leptospira*.

Especies: *L. interrogans*, *L. biflexa* (19)

Este género comprende dos especies fenotípicas: *L. interrogans*, que agrupa a leptospiras patógenas y *L. biflexa*, microorganismos de vida libre que se encuentran fundamentalmente en las aguas superficiales (20).

A diferencia de *L. interrogans*, las cepas de *L. biflexa* no se asocian con infecciones en los humanos o animales y son avirulentas en los animales de laboratorio (21).

Por debajo del nivel de especie, tanto *L. interrogans* como *L. biflexa*, se clasifican en serogrupos y serovares, atendiendo a sus características serológicas (15). Los serogrupos contienen los serovares antigénicamente relacionados y se conocen 24 serogrupos para las cepas patógenas. La lista de los serovares se actualiza periódicamente, y recientemente se han descrito dos nuevos serovares patógenos (22). La identificación de los serovares es esencial para el entendimiento de la epidemiología de esta enfermedad pero depende de la disponibilidad de anticuerpos monoclonales (AcM). El uso de estos posibilita hacer de forma rápida, mediante microaglutinación, la identificación de las cepas hasta el nivel de serovar (23). Además de la clasificación fenotípica, existe la tipificación genética, sin existir relación directa o correspondencia entre ambas (23). La caracterización genética mediante la hibridización ADN-ADN permite la división del género en 20 especies genómicas diferentes o genomoespecies (24). Debido a la falta de correspondencia entre ambas clasificaciones (fenotípica y genética), existen especies genómicas que incluyen serovares patógenos y no patógenos, así como serovares incluidos en más de una especie genómica. De esta forma, la especie genómica es típica de la cepa y ningún serogrupo o serovar predice la especie genómica a la cual pertenecerá una cepa en cuestión (15).



#### 6.4 Resistencia del agente etiológico

Las leptospiras son sensible a la desecación, al calor, al frio excesivo y a las en agua estancadas y hasta cerca de un año en soluciones viscosas, como lodos con bajo contenido de materia orgánica. En suelo húmedo sobreviven por largo tiempo mientras que en suelo seco la supervivencia es corta. En la leche no sobreviven, salvo si esta diluida en agua a razón de 1:20 o más. Mueren a los 10 segundos cuando son calentadas a 100 °C y a los 10 minutos a una temperatura de 56 ° C. En el frio puede sobrevivir hasta 100 días a -20°C.

La orina acida es letal para las leptospiras, por eso, es necesario alcalinizarla si se pretende aislarla de la orina de un enfermo. Conservan su viabilidad varios días en vísceras y carnes refrigeradas, siendo sensible a los antisépticos (1).

Las leptospiras posee dos cromosomas circulantes de aproximadamente cuatro megapares de bases (Mpb) y 300 kilopares de bases (kpb) con un contenido de guanina/citosina (G/C) de 35-41%. Un replicón adicional de 74 kpb se ha localizado en *L. biflexa*, la cual puede tener un cuarto replicón de 74 kpb (bacteriófago LE1) (17).

Son microorganismos aerobios estrictos y fácilmente cultivables en medios artificiales, enriquecidos y adicionados con ácidos grasos de cadena larga. Los medios de Fletcher, Kortoff, Schüffner y EMJH son los más empleados. La base de esos medios está constituida por suero de conejo diluido o seroalbúmina, agar, peptona, caldos simples y sales. Utilizan ácidos grasos o alcoholes como fuente de carbono y energía y no utilizan aminoácidos o carbohidratos como fuente de energía. El recurso principal para la obtención de nitrógeno son las sales de amonio.

Las cepas patógenas tienen un tiempo de generación de cerca de 20 horas, mientras que en las saprofitas es de alrededor de cinco horas. Las leptospiras poseen oxidasa, catalasa y peroxidasa; entre especies no pueden distinguirse por sus características bioquímicas (25). Sin embargo, *L. interrogans* no crece en presencia de 225 µg/ml de azoguanina, propiedad que permite diferenciarla de *L. biflexa*. Son susceptibles a la acción de la mayoría de antibióticos, incluyendo penicilina, así como a la de los antisépticos y desinfectantes de uso común (1).



Además, existen distintas sustancias químicas de carácter leptospiricidas: fenol al 5 %, alcohol al 70 %, formol al 2%, ácido clorhídrico 2%, emulsión de creolina al 5%, soda cáustica al 2%, durante 5 minutos, solución al 0,05 % de ácido sulfúrico, en 5 minutos. Son muy sensibles a la solución hipertónica de sal común (2,8%), bilis, putrefacción y a la mayoría de los antibióticos in vitro o in vivo como la penicilina, estreptomycin, aureomicina y los grupos macrólidos. Sensible también a una temperatura de menos -70°C en nitrógeno líquido (18).

## 6.5 Epidemiología

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, con mayor incidencia en las zonas tropicales que en las regiones con climas cálidos como la costa; actualmente su transmisión ocurre con mayor frecuencia en zonas donde hay expansión poblacional, especialmente en países en vías de desarrollo (3).

El suelo no ácido, la humedad, las altas temperaturas, aguas contaminadas de ríos y diques, favorecen su transmisión, siendo la población rural más sensible a ser infectada debido a que en ella abundan los animales salvajes como ovejas, vacas, cerdos, ratas o perros, que son el reservorio predominante y la principal fuente de contaminación en el hombre (26). Por lo que está estrechamente vinculada con factores ambientales, que dan lugar a un foco de infección amplio. Las infecciones leves y subclínicas son más importantes desde el punto de vista de transmisión y control, que las afecciones graves. Los casos leves y subclínicos generan un portador urinario que contamina el medio ambiente.

Las leptospiras causan infecciones en muchas especies animales. Animales salvajes y domésticos con infección subclínica sirven como reservorios y son una fuente potencial de infección para los huéspedes accidentales, incluidos los humanos. En los huéspedes accidentales, signos clínicos graves pueden desarrollar. Huéspedes accidentales también arrojan el organismo, aunque por lo general por un período más corto (27).



La infección humana se relaciona, principalmente con riesgo laboral y recreacional, pudiendo infectarse el hombre por contacto directo con el reservorio animal o, más frecuentemente, a través de agua o terrenos húmedos contaminados (28).

La prevalencia y tasas de incidencia varían en todo el mundo y pueden llegar a elevarse en tiempos de inundaciones.

La distribución de la leptospirosis se ha clasificado en dos grandes grupos:

a) Leptospirosis rural: Asociada a actividades agro ganaderas y recreativas que impliquen el contacto con medios acuáticos (ganaderos, agricultores, etc.).

b) Leptospirosis urbana: La población expuesta corresponde a grupos profesionales u ocupacionales (veterinarios y zootecnistas, recolectores de basura, obreros de saneamiento, personal de zoológicos y zoo criaderos, jardineros, etc.) (27).

Para la República de Nicaragua la leptospirosis es una enfermedad endémica, en especial en algunos de sus departamentos, con alta frecuencia de presentación de casos clínicos asociados a eventos climatológicos extremos, como las lluvias intensas y medianas (29).

## **6.6 Fuente de infección y transmisión**

Después de la primera semana de leptospiremia, el animal elimina leptospiras por vía urinaria contaminando el ambiente. Los reservorios animales más importantes son aquellos que tienen una leptospiruria prolongada y generalmente no sufren ellos mismos la enfermedad. Es el caso de las ratas, la que rara vez tienen lesiones. La infección del hombre y animales se produce por vía directa o indirecta, a través de la piel y de las mucosas bucal, nasal y conjuntival. La vía indirecta a través de aguas, suelo y alimentos contaminados por orina de animales infectados es muy importante.

En establecimientos ganaderos la infección suele ingresar por medio de animales portadores (silvestres o domésticos) con leptospiruria o por anegamiento de los campos con aguas contaminadas de establecimientos vecinos. Para que se constituya un foco de



la enfermedad es necesario que, además de animales portadores existan condiciones favorables para la supervivencia de la *Leptospira* en el medio ambiente (30).

### **6.7 Especies susceptibles**

Las especies de mayor importancia económica son: bovinos, equinos, cerdos, ovejas y cabras; también afecta en mayor o menor grado a otros animales domésticos y salvajes como: perros, gatos, venados, mapaches, musarañas, murciélagos, peces, reptiles, ranas, conejos,, zorros, erizos, chacales , nonatos, ratas y ratones, etc. (15, 18).

### **6.8 Patogenia**

La infección de los animales se produce por contacto directo con un portador o su orina, o directamente a través de tierra o agua contaminada. Después de la penetración de las membranas mucosas o piel erosionada y rayado, las leptospirosis se multiplican rápidamente al entrar en el espacio vascular de sangre tan pronto como un día después de la infección. Mediante la invasión de la espiroqueta, el organismo reacciona primariamente con una respuesta sérica caracterizada por la producción de inmunoglobulinas (Ig) del isotopo IgM, que pueden detectarse por el método de microaglutinación (MAT), la cual no es fagocitada ni destruida por los polimorfonucleares o macrófagos. Las IgM elevan su nivel tras la infección siendo detectable a los pocos días en la fase de bacteriemia, dificultando la multiplicación de las leptospirosis, pero no la destruye, poco después, disminuye, y comienza a detectarse la IgG específicos, que produce la lisis de las leptospirosis. La extensión del daño a los órganos internos es variable dependiendo de la virulencia del organismo y la susceptibilidad del huésped.

En la leptospirosis se da una fase de bacteriemia que inicialmente alcanza todas las partes del cuerpo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo (LCR) y los ojos, y genera la producción de anticuerpos aglutinantes y el fenómeno de opsonización entre los días 5 y 7. Si esta respuesta no es suficiente para detener su progreso, la *Leptospira* avanza en los tejidos y principalmente en riñones donde colonizan los túbulos renales proximales de animales reservorios, en el que son capaces de replicarse y persistir. Allí se multiplica en



forma acelerada, deja de ser encontrada en la sangre y se elimina por la orina durante semanas o meses (fase inmune o de leptospiuria) (31, 32).

La respuesta inmune está implicada en la patogénesis de la leptospirosis a través de la formación de inmunocomplejos, la liberación de citoquinas y la generación de una vasculitis autoinmune (33). Así, los signos y síntomas del compromiso pulmonar, renal y hepático, aparecen en la fase inmune cuando las aglutininas específicas comienzan a detectarse. En consonancia, los resultados de investigaciones clínicas realizadas en Brasil sugieren que la gravedad de la leptospirosis podría relacionarse con la intensidad de la respuesta inmune (34).

Los estudios comparativos de biología molecular, entre cepas patógenas y saprófitas, han develado un alto número de factores de virulencia implicados activamente en la patogenia generada por este microorganismo (35). Entre ellos se destacan enzimas con actividad como hemolisinas, fosfolipasas, catalasas, hialuronidasas y colagenasas (36). El primer factor de virulencia genéticamente definido en las leptospiras fue la lipoproteína de superficie Loa22 con dominio OmpA (37); cuya función aún se desconoce. Recientemente también se identificó el gen hemO, que codifica una hemo-oxigenasas, involucrada en la virulencia en hámsteres, aunque no es esencial para el microorganismo (38).

## **6.9 Respuesta inmunitaria.**

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del huésped, que juega un papel crucial en el reconocimiento temprano y la eliminación de leptospiras. La activación de la vía alternativa del sistema del complemento es uno de los mecanismos efectores más importantes durante las primeras horas de la infección. Un claro ejemplo de este hecho es la observación de que *L. biflexa* se lisa a los pocos minutos, en presencia de suero humano normal *in vitro*. Por el contrario, las leptospiras patógenas son capaces de sobrevivir, y son más resistentes a la acción del sistema del complemento, sobre todo si son virulentas (32).





Diferentes estudios se basan, únicamente, en la importancia de la respuesta inmune humoral (18). Tras la infección, inicialmente se produce una elevación de las IgM, que alcanzan niveles detectables a los pocos días de la desaparición del periodo febril que acontecen durante la fase de bacteriemia, es decir a los 2-5 días de la aparición de los signos de la enfermedad aguda. Los anticuerpos IgM dificultan la multiplicación de las leptospiras, pero no las destruyen, disminuyen poco después de la aparición de las IgM, comienzan a detectarse las IgG específicos, que producen la lisis de las leptospiras, esta última inmunoglobulina persiste durante años en el animal (18).

Las IgM alcanzan su pico máximo a las 3-4 semanas y las IgG a las 4-12 semanas tras la infección. Durante toda la fase de leptospiruria, los niveles de IgM pueden no detectarse en sangre. En cambio, se puede detectar las IgG en orina, aproximadamente a las 6 semanas después de la infección. Además, los animales suelen presentar una respuesta inmune local, lo que provoca la aparición de IgA en la orina, hacia las 12 semanas de la infección. Esta presencia de IgA y la aparición de IgG en la orina, parece tener un efecto negativo sobre la variabilidad de las leptospiras en ésta, tal y como lo demostraron.

En la mayoría de los casos, en el momento del aborto los niveles de anticuerpos son bajos, incluso negativos. Esto redundará en una dificultad a la hora de realizar el diagnóstico de los abortos por leptospiras (18).

### **6.10 Manifestaciones clínicas**

El periodo de incubación generalmente es de 2-30 días, y a veces es de 5-14, los síntomas son muy variables, dependiendo de la especie del animal, el serovar infectante, la virulencia del germen y la inmunidad del hospedero (18).

La expresión clínica de la infección por *Leptospira* varía ampliamente en el ser humano, con oscilaciones que van desde procesos totalmente asintomáticos, que son los más frecuentes, pasando por las formas de evolución generalmente benignas, hasta el desarrollo de cuadros graves icterohemorrágicos con colapso vascular y serio compromiso de funcionamiento hepático-renal, que puede ser de evolución fatal



(enfermedad de Weil). De las formas clínicas sintomáticas de la enfermedad, el 80-90% evoluciona en una forma anictérica benigna y 10-20% como leptospirosis grave con ictericia e insuficiencia renal.

#### **6.10.1- Leptospirosis asintomática**

La existencia de formas subclínicas se hace evidente cuando se realizan encuestas seroepidemiológicas, donde el 16-40% de personas expuestas a la fuente de infección presentan títulos serológicos de anticuerpos específicos detectables; sin embargo, no recuerdan haber tenido manifestaciones clínicas sugestivas de la enfermedad (3).

#### **6.10.2- Leptospirosis sintomática**

La leptospirosis es típicamente una enfermedad bifásica, presentándose una fase inicial o de leptospiremia con una duración de cuatro a siete días, caracterizada por la presencia de las leptospiras en sangre y una segunda fase inmune o leptospiruria con una duración de 8 a 30 días donde se puede detectar anticuerpos específicos en circulación. Ambas fases son comunes a las dos formas clínicas de presentación: anictérica e ictérica (3).

**Forma anictérica:** Esta fase siempre presenta de forma brusca que suele sólo durar una semana (7días) con los signos siguientes: fiebre que puede ser (bifásica) cefalea, escalofríos, postración, mialgias (principalmente de pantorrillas y región lumbar, náuseas o vómitos, dolor abdominal, diarrea y artralgia y a veces meningitis aséptica en menos de 25 % dolor ocular, proceso respiratorio, hepatomegalia y esplenomegalia.

**Forma ictérica:** Es la forma más severa de la enfermedad dependiendo del serogrupo de la bacteria infectante. Entre sus síntomas, se pueden mencionar: irritación conjuntival, irritación meníngea y rigidez de la nuca, insuficiencia renal, ictericia, manifestación hemorrágica intestinal o pulmonar, arritmia o insuficiencia cardíaca o disnea y a veces hemorragia generalizada (18).



## 6.11 Diagnóstico

### 6.11.1- Diagnóstico diferencial

Esta debe realizarse de acuerdo con la presentación clínica de la enfermedad. En las formas anictéricas el diagnóstico diferencial debe establecerse con enfermedades febriles tales como: influenza, dengue, hepatitis virales, neumonía, meningitis virales, mononucleosis, brucelosis, borreliosis, toxoplasmosis. En la forma ictérica (síndrome de Weil), el diagnóstico diferencial debe hacerse con: hepatitis virales, dengue hemorrágico, malaria, fiebre tifoidea, fiebre amarilla, rickettsiosis, fiebre hemorrágica venezolana e infecciones debidas a hantavirus, pielonefritis e intoxicaciones(3).

### 6.11.2- Pruebas de diagnóstico

Para un correcto diagnóstico de la enfermedad deben utilizarse la combinación de parámetros:

- Epidemiológicos
- Clínicos
- Paraclínicos

El diagnóstico del laboratorio debe siempre tomarse como un elemento de apoyo, confirmatorio de la sospecha clínica o epidemiológica. Se emplean en forma rutinaria las técnicas serológicas y como procedimientos confirmatorios se puede emplear las técnicas para aislamiento del germen y a su vez determinar el tipo de *Leptospira* por medio de diagnóstico molecular de acuerdo a las características de su virulencia.

### 6.11.3- Diagnóstico directo

Las leptospiras son de 5-60  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.1-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se requiere microscopía de campo oscuro para la observación debido a su tamaño  $10^2 - 10^6$  leptospiras / ml de sangre se pueden observar durante la fase aguda de la leptospirosis. El umbral de detección es de cerca de  $10^4$  leptospiras/ml de sangre en el examen directo. En teoría, la leptospirosis puede ser diagnosticada mediante examen directo de sangre durante la primera semana después de la aparición de los síntomas. Este método es



barato (pero se requiere un microscopio de campo oscuro), el riesgo de falsos positivos debido a los desechos celulares y otros artefactos es importante (39).

#### **6.11.4- Diagnóstico serológico**

Se ha descrito una amplia variedad de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serotipo. La prueba de la aglutinación microscópica (MAT) sigue siendo la técnica de preferencia y el enzimoimmunoensayo (ELISA) contribuyen al diagnóstico veterinario por su especificidad y sensibilidad (13).

#### **6.11.5- Prueba de microaglutinación**

La prueba MAT en la que se emplean antígenos vivos es la prueba serológica más ampliamente utilizada (13).

Constituye la prueba de referencia frente a la que se evalúan todas las otras pruebas serológicas y se utiliza en las comprobaciones para la importación/exportación (13).

Se puede definir a la MAT como, la técnica que en diluciones seriadas de suero en contacto con una suspensión de leptospiras vivas, incubadas a una determinada temperatura y en un período de tiempo, se lee al microscopio de campo oscuro considerando, 50% de aglutinación de las leptospiras vivas, como el título de corte para la positividad de la reacción (30).

#### **6.11.6- Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas**

Los ELISA para la detección de anticuerpos antileptospira se han elaborado empleando una serie de preparaciones antigénicas diferentes, protocolos de ensayo que incluyen pruebas en placa y pruebas con tiras reactivas.

En este ensayo se detecta IgM antileptospira tan solo 1 semana después de la infección, antes de que estén presentes los anticuerpos aglutinantes. Los anticuerpos IgG se detectan en los perros infectados, comenzando 2 semanas después de la infección, y persisten durante largos periodos de tiempo. Por tanto, los animales con leptospirosis aguda tienen títulos de IgM altos y títulos de IgG relativamente bajos (13).



### **6.11.7- Fijación de complemento**

Es una prueba género-específica, se considera tan fiable como el MAT para la detección de animales con leptospirosis, pero, detecta infección reciente; es útil en la detección de grandes cantidades de sueros ya que puede semi-autotamizarse. Es una herramienta epidemiológica para diagnóstico rápido, menos laboriosa que el MAT. Las desventajas son las sustancias anti complementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovares y no detecta niveles bajos de anticuerpos (18).

### **6.11.8- Diagnóstico molecular**

En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido mejorar el diagnóstico de leptospirosis.

Hasta la fecha se han publicados numerosos protocolos de PCR punto final y en tiempo real para detección y cuantificación de *Leptospira* spp. en diversas muestras tanto clínicas como ambientales (40).

### **6.11.9- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Cuando el PCR se introdujo para el diagnóstico de patógenos, se comenzaron a desarrollar varios *primer* para amplificar el ADN de la *Leptospira*, los primeros fueron dirigidos a genes específicos, pero con más frecuencia al 16S o 23S rRNA cuyos genes son más conservados en general en todas las bacterias(3).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) implica una reacción de amplificación durante el ensayo.

El término “reacción en cadena” se refiere a los varios ciclos de copiado de un fragmento específico de ADN a partir de un ácido nucleico diana, en este caso, del genoma del agente infeccioso. La región amplificada se caracteriza por dos (o más) oligonucleótidos cortos y dos Primers que son complementarios con las regiones de ADN que flanquean la secuencia diana. Utilizando una ADN polimerasa termoestable, que no resulte desnaturada durante el ciclo de calentamiento, es posible copiar la secuencia de ADN entre los dos primers. Repitiendo de 20 a 40 veces el régimen de ciclos de calentamiento,



se obtendrá una cantidad de ADN diana copiado que será suficiente para operaciones ulteriores, tales como la detección, el clonado y la secuenciación dado que una vez que la reacción a finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico. La sensibilidad de diagnóstico de la PCR es muy alta, ya que se producen varios millones de copias de la diana seleccionada. También puede ser muy alta la especificidad de la reacción, debida a las secuencias nucleotídicas específicas formadas por los oligonucleótidos (primers). Los primers están diseñados para detectar secuencias nucleotídicas específicas en los genomas de los agentes infecciosos diana seleccionados (41).

Las pruebas moleculares para *Leptospira* presentan alto poder discriminatorio, ofrecen resultados reproducibles, de fácil y exacta interpretación que permite disminuir los problemas asociados con la transferencia de tecnología y la reproducibilidad de pruebas entre laboratorios de zonas endémicas (42).

#### **6.11.10- Método isotérmico.**

Este método requiere solo una unidad de calefacción y ningún termociclador, para mantener una temperatura constante de 60 a 65°C, por lo que es el mejor método para los países en desarrollo. Una amplificación eficaz y específica se puede realizar en 1 hora con la ADN polimerasa y seis cebadores en condiciones isotérmicas. El ADN amplificado puede detectarse entonces por simple observación de la fluorescencia o de turbidez, sin el uso de geles de electroforesis. Métodos isotérmicos bucle mediada tipo de amplificación (LAMP) dirigidas a los genes *Lip 41* o *RR* recientemente se han desarrollado para la detección de leptospirosis patógenas. La especificidad de estos métodos es relativamente débil y el umbral de detección oscila entre dos y 100 leptospirosis por mezcla reactiva. La utilidad de la lámpara para el diagnóstico de la leptospirosis debe evaluarse en zonas endémicas.



### 6.11.11- Diagnóstico epidemiológico

En cuadros sintomatológicos compatibles con un caso de leptospirosis, se debe enfatizar en la anamnesis, los aspectos siguientes:

- Época del año en la que ha aparecido el brote, con especial atención al clima, precipitación pluvial, temperatura ambiental, humedad relativa.
- Estado sanitario de vacunas contra *Leptospira*.
- Aptitud del rebaño, manejo y estado sanitario de la explotación incluyendo, entrada de animales nuevos, manejo de la cría, alimentación, si hay monta natural o inseminación artificial etc.
- Presencia de otras especies domésticas ejemplo: ovejas, cerdos etc.,
- Control de animales silvestres portadores.
- Edad y sexo de los animales afectados.
- Sintomatologías predominantes y características de los signos clínicos.
- Antecedentes de leptospirosis en el área (18).

### 6.12 Tratamiento y profilaxis

Para el control de la enfermedad, es sumamente imprescindible la identificación lo antes posible de los animales afectados, así como el serogrupo o serovar actuante, puesto que la presencia de un serovar u otro depende principalmente de la existencia de su hospedero de mantenimiento específico y según sea el hospedador, las medidas de control serán diferentes (18).

Las leptospirosis son prácticamente sensibles a todos los antimicrobianos, a excepción de las sulfonamidas y el cloranfenicol, pudiendo utilizarse una amplia gama de ellos para el tratamiento de la infección. Sin embargo, la mayor limitación de los antimicrobianos es que no eliminan el estado de portador renal. Los antimicrobianos de mayor utilidad son la dihidroestreptomicina y la oxitetraciclina. Aunque el tratamiento con dihidroestreptomicina reduce en gran medida el número de organismos en el animal infectado eliminado en la orina, éste puede infectarse de nuevo (43).



Dentro del tratamiento para animales de mayor importancia en Nicaragua por su impacto económico y epidemiológico se encuentra:

### **Bovinos:**

- Dihidriestreptomina: 25mg/kg./5 días /IM.
- Estreptomina: 12-25mg/kg./ dos veces al día por 3 días / IM.
- Estreptomina: 25mg/Kg. una sola vez durante la fase de leptospirosis.
- Clorhidrato de tetraciclina: 11mg/kg./5 días
- Tetraciclina: 15-25 ml/kg./4 días / IM.
- Oximicina: 100g/5 días / IM.
- Transfusión sanguínea 5-10 L/450kg en caso de anemia hemolítica.

### **Cerdos:**

- Tetraciclina: 6,6 mg/kg./día/5días/IM
- Oxytetraciclina: 800g/ tonelada de pienso de 8-11 días
- Estreptomina: 40-50mg/kg./dic/4-6 días/IM
- Oximicina: 20-30mg/kg./4-6días/IM

### **Equinos y Caninos:**

- Dihidriestreptomina: 20-25mg/kg./24h durante 4-6 días / IM.
- Tetraciclina: 15-25mg/kg./12h durante 4-6 días /IM.
- Penicilina en caso agudo: 10000-20000UI/kg./12h durante 5-7 días /IM.

### **Ovino y Caprino:**

- Dihidroestreptomina: 20-25/kg./4-6días/IM
- Oxytetraciclina: 20-30mg/kg./4-6días/IM
- Estreptomina: 40-50mg/kg./día/4-6 días/IM

Además de los antibióticos, en dependencia de la gravedad y sintomatología se admite la aplicación de: transfusión sanguínea, analgésicos, sueros hiperinmunes y gammaglobulinas (18).





## **7. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **7.1 Tipo de estudio**

Descriptivo de corte Transversal.

### **7.2 Población en estudio**

Animales domésticos (sangre-orina) y muestras ambientales (agua-suelo).

### **7.3 Área de estudio**

Las muestras fueron recolectadas en 8 departamentos de Nicaragua, seguidos a casos positivos de leptospirosis humana, reportados por el Ministerio de Salud (MINSA), de los cuales estaban distribuidos en 4 departamentos de la Región del Pacífico (Chinandega, León, Managua y Masaya) y 4 en la Región Central (Boaco Madriz, Matagalpa y Nueva Segovia).

La región del Pacífico está compuesta por siete departamentos y componen el terreno más fértil del país, la cantidad anual de precipitación oscila entre 1000 mm y 2000 mm, en esta región predominan los días muy cálidos, caracterizados por temperaturas medias superiores a 34.0 °C al igual es donde se presentan los valores mínimos anuales de humedad relativa que oscilan entre 64 % y 70 %.

La región Central comprende ocho departamentos, ubicado en territorio montañoso, en los cuales nacen los ríos más largos del país. La precipitación anual oscila de 800 mm en los valles intramontañosos a 2500 mm, en las pendientes orientales de las cordilleras.

### **7.4 Período de estudio**

La recolecta de muestras en animales domésticos (sangre y orina) fue iniciada en el periodo de mayo al mes de diciembre, mientras que las muestras ambientales (agua y suelo), fueron obtenidas en los dos últimos meses del año 2015.

### **7.5 Tamaño de muestras**

Se recolectó 132 muestras de animales doméstico (132 muestras de sangre y 49 de orina), y 116 muestras ambientales (64 muestras de agua y 52 de suelo).



## **7.6 Selección de muestra**

Las muestras recolectadas tanto de ambiente como de animales domésticos, fueron tomadas por conveniencias, de tal manera el total de muestras se tomaron en casas o fincas donde se reportaron casos positivos a leptospirosis humana confirmados por el sistema de vigilancia del Ministerio de Salud (MINSa).

## **7.7 Factores de inclusión**

Todos los animales que mantiene relación con los casos positivos a leptospirosis humana, así como también muestras de agua y suelo del lugar de habitación de los mismos.

## **7.8 Factores de exclusión**

Animales domésticos con dueños no interesados en participar en el estudio, y los que mostraron agresividad a su manipulación para toma de muestra.

## **7.9 Tipo de muestreo**

Se realizó un muestreo no probabilístico, por conveniencia, habiéndose seleccionado las viviendas con casos confirmados a leptospirosis humana por el MINSa y ubicados en coordinación con el sistema local de atención integral en salud (SILAIS) departamental y los centros de salud de las comunidades.

## **7.10 Toma y envío de muestra**

### **Sangre**

Se tomaron muestras directamente de la vena yugular en las especies, equina, bovina mientras que, la porcina se extrajo de la vena cava o aorta, por otro lado la canina y felina se tomó de la vena cefálica (derecha o izquierda) a razón de 3 a 5 ml de sangre, depositándose en tubo de ensayo de 16x100mm sellados con tapón de hule y su identificación correspondiente (especie, nombre, departamento y municipio), transportándose en gradillas al Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigaciones (CEVEDI). Una vez en el laboratorio se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos, logrando así la separación del suero para luego ser depositado en viales de 1.5 ml, estos identificados según el código correspondiente del registro del laboratorio.



## Orina

Para la recolección de orina, las especies equina, canina y porcina se administró diurético con anticipación (Furosemina 2 mg/Kg) por vía endovenosa, para lograr la diuresis y favorecer la cistocentesis, bajo la espera promedio de 5 minutos (exceptuando la equina, ya que se tomó la muestra tras la micción), mientras que la especie bovina se tomó mediante estimulación directa. Recolectando las muestras en tubos de ensayo para posteriormente depositar 3 gotas de muestras en 3ml de medio líquido de EMJH+ 5- Fluorouracilo con el objetivo de inhibir el crecimiento de otras bacterias y la espiroqueta pueda reproducirse.

## Muestra ambientales (agua y suelo)

En la toma de muestra de agua, se recolectó a 2-3 cm de profundidad sobre la superficie de ríos, pilas y pozos, depositándose a razón de 3 gotas en medios de EMJH+5FU, Anfotericina b y Rifampicina.

Mientras que las muestras de suelo se tomaron en lugares húmedos protegidos de los rayos solares. Estas fueron transportadas a CEVEDI en tubos de ensayo de 16x100mm, para luego ser pesadas a través de una balanza electrónica, obteniendo 5 gramos de tierra por muestras. Cada muestra fue depositada en tubos cónicos estériles de 15 ml diluido en 10 ml de agua destilada estéril (hasta disolver completamente), posteriormente se dejó reposar 1 hora en posición vertical, y así poder extraer 1 ml del sobrenadante. El resultado se depositó en 3ml de medio EMJH+5FU, Anfotericina b y Rifampicina.

### 7.11 Análisis de las muestras

#### Prueba de microaglutinación

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 10 minutos. Se extrajo el suero en viales de 1.5 ml, posteriormente congelados para su análisis. (Ver anexo). La prueba consistió en dos procedimientos; el análisis cualitativo basado en la identificación de los posibles serogrupos y el análisis cuantitativo cuyo objetivo es determinar los títulos de anticuerpos mediante diluciones seriadas de los sueros problema, así como identificar las posibles reacciones cruzadas en los mismos. En ambos procedimientos se utilizaron 30 cepas de referencias como antígenos (**Tabla 3**).



## Aislamientos

Las muestras depositadas en medio EMJH+5FU, Anfotericina b y Rifampicina fueron incubadas a una temperatura de 28-30°C y monitoreadas semanalmente mediante la observación en un microscopio de campo oscuro aproximadamente cada 8 días, considerándose positiva al observar crecimiento en las muestras por medio del microscopio de campo oscuro, ubicando una gota de la muestra en un portaobjeto agregando un cubre objeto en la gota para ser visualizado.

## Diagnóstico molecular (PCR)

- **Extracción de ADN por calentamiento**

Las muestras fueron tomadas de aislamientos con mayores presencias de espiroquetas, para lograr extraer el ADN por calentamiento.

Se tomó 500µl de muestra, depositándose en viales de 1.5 ml, estas fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado de las muestras, y al sedimento se agregó 200µl de agua libre de nucleasas. Nuevamente el resultado fue centrifugado a la misma velocidad, y posteriormente sometido a una temperatura de 90-100°C por 20 minutos. Finalmente el producto fue almacenado a -20°C para su posterior análisis

- **Componentes para la amplificación**

Para el procedimiento de amplificación se realizó la mezcla de diferentes elementos que lograran el éxito de la reacción de la enzima dentro de los cuales:

- ❖ ® PCR Master Mix 2x (Promega, USA)

- **Enzima Taq Polimerasa:** es una enzima termoestable que acelera el proceso de formación de la copia de ADN, dependiente del patrón original.
- **Desoxirribonucleicos Trifosfatados** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP): necesarios para proporcionar las bases nitrogenadas en la construcción del ADN.
- **MgCl<sup>2</sup>** : cofactor importante para generar la reacción enzimática en el proceso de formación del ADN.



- ❖ H<sub>2</sub>O libre de nucleasas
- ❖ Primer u oligonucleótidos: que permitan crear el fragmento de ADN en estudio.
  - Forward o sentido
  - Reverse o anti sentido
- ❖ Muestra de ADN
  - **Primers**

**Tabla 1**

Nombre	Secuencia	gen diana (tamaño de amplificación)
<i>lfb1-F</i>	CATTCATGTTTCGAATCATTTCAAA	secuencia específica de Leptospiras patógenas. <i>lfb1</i> (331pb)
<i>lfb1-R</i>	GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG	

- **Mezcla de componentes.**

La amplificación se logró utilizando un volumen final de 20µl de mezcla por muestra, colocando 10µl ® PCR Master Mix 2x (Promega, USA), 2µl de cada primers (Forward/Reward), 1µl de agua libre de nucleasas y 5µl de ADN. Con una amplificación de 40 ciclos.

**Tabla 2**

Componente	Mezcla	Muestras	Resultado
Master Mix	10 µl	x 24 µl	240 µl
Lfb1 F	2 µl	x 24 µl	48 µl
Lfb1 R	2 µl	x 24 µl	48 µl
H2O LN	1 µl	x 24 µl	24 µl
Cantidad de Muestra	5 µl	<b>Preparado:</b>	<b>360 µl</b>
<b>Volumen Final:</b>	<b>20µl</b>		



- **Protocolo de amplificación y lectura**

El programa se configuró en un termociclador (2720 Thermal Cycler). El protocolo de amplificado fue de una desnaturalización inicial 94<sup>0</sup>C por 5 minutos seguido de los 40 ciclos (en 94<sup>0</sup>C por 1 minuto, 55<sup>0</sup>C por 30 segundos, 72<sup>0</sup>C por 1 minutos), para tener un producto de 331 pb, posteriormente almacenado a 4,0<sup>0</sup>C por ∞ para su lectura (**Figura 1**). El amplicon fue corrido en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (8 µl) a través de la cámara de electroforesis. El resultado se observó en un transiluminador UV, tomando en cuenta que, una muestra se consideró positiva al revelarse la banda de 331 pb esperada con el primers *lfb1*. así como también el control positivo mostrara el producto amplificado y que el control negativo no revelara ninguna banda (**Figura 2**).

**Tabla 3.**

<b>Control</b>	<b>Cepa</b>	<b>Serogrupo</b>
Positivo	8H	Cynopteri
Negativo	28H	Semaranga

### 7.12 Análisis estadísticos

Se utilizó estadísticos descriptivos como frecuencias en números absolutos y porcentajes, así como, tablas de contingencia. En la estadística inferencial se aplicó la prueba de Chi cuadrado para el cálculo de diferencias entre las frecuencias en los diferentes grupos (tipos de muestras, departamentos). Los resultados son presentados en gráficas de barras, de sectores, además de tablas. Los datos fueron registrados y analizados en el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS, por sus siglas en inglés), versión 21, y el software Excel se utilizó para la construcción de las gráficas.



## 8. RESULTADOS

### 8.1 Serológicos

Al realizar el análisis de 132 muestras de sangre recolectadas en animales domésticos se obtuvo un 17.4% de reactores a leptospiras en la MAT y un 82.6 % de animales no reactores a leptospiras (**Gráfica 1**).

Los resultados de la MAT-cualitativa no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las 5 especies de animales muestreados. En la especie porcina se encontró un 26.1% (6/23) de reactividad, la felina un 100% (1/1), la canina un 15.3% (13/85), la bovina 16.7% (3/18), mientras que en la especie equina no se encontraron reactores a la prueba (**Gráfica 2**).

Los resultados de la MAT- cualitativa en animales domésticos mostraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los 8 departamentos, con una variación en la frecuencia de reactores desde 0% en León y Matagalpa, hasta 37.5% y 33.3% en Nueva Segovia y Boaco (**Gráfica 3**).

Entre los animales que resultaron reactores en el análisis cuantitativo de la MAT, se encontró que el título más frecuente fue 1:400 con un 82.60%, seguido de 1:800 con un 17.40% (**Gráfica 4**).

En las especies canina y felina se encontraron títulos elevados de anticuerpos (1:800), mientras que en los bovinos y porcinos solo se encontraron títulos bajos de anticuerpos (1:400) (**Gráfica 5**).

Los animales reactores en los departamentos Madriz, Managua y Masaya presentaron exclusivamente títulos 1:400; mientras que, aquellos muestreados en Boaco, Chinandega y Nueva Segovia mostraron títulos 1:400 y 1:800. En este último departamento se detectó la mayor frecuencia de títulos de 1:800 (**Gráfica 6**).

Los serogrupos Hebdomadis, Pyrogenes, Sejroe y Lousiana solo se encontraron en el título 1:400, mientras que, Canicola en el título 1:800, y el serogrupo Icterohaemorrhagiae mostró reactividad a ambos títulos, siendo al título 1:400 el predominante (**Gráfica 7**).



Los resultados de la MAT cuantitativa por serovares, Icterohaemorrhagiae (M20) presentó un porcentaje mayor (30.4%), seguido de Hebdomadis (Hebdomadis), Icterohaemorrhagiae (Kantarowics), Icterohaemorrhagiae (RGA) y Lousiana (LSU 1945) (13%), mientras que Canicola (Hond Utrecht IV), Pyrogenes (Salien) y Sejroe (Harjoprajitno) fueron los menos frecuentes (4.3%) por otro lado Pomona (Pomona) presentó reacción cruzada con 2 de los 8 serovares restantes (**Gráfica 8**).

En la clasificación de los serogrupos en función de las especies de animales domésticos (**Tabla 4**), se observó que en la especie bovina se identificaron los serogrupos Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae y Lousiana con un 33.3% de reactividad, mientras que en la especie canina, el serogrupo Icterohaemorrhagiae presentó una frecuencia de 84.6%, seguida de los serogrupos Hebdomadis y Canicola con 7.7% de reactividad, en la única muestra positiva de la especie felina, se encontró reactividad al serogrupo Icterohaemorrhagiae, mientras que en la especie porcina se observó una alta frecuencia en los serogrupos Lousiana y Hebdomadis con 33.3%, y una baja frecuencia en los serogrupos Sejroe y Pyrogenes con 16.7%.

El análisis de los serogrupos presentes en animales domésticos reactivos por departamento, reveló que Icterohaemorrhagiae fue de mayor frecuencia en los departamentos de Chinandega, Managua, Masaya y Nueva Segovia. Mientras que en Madriz el serogrupo con alto porcentaje fue Hebdomadis. En el caso de Boaco se identificó la presencia de Hebdomadis, Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae, Sejroe y Lousiana en un 20% (**Tabla 5**).

## 8.2 Aislamientos

Los resultados del aislamiento en muestras de orina en animales domésticos no mostraron crecimiento de la espiroqueta.

Al realizar el análisis de 116 muestras ambientales (agua y suelo), el 17.20% resultó positivo al aislamiento (**Gráfica 9**).

La comparación de los aislamientos por muestras ambiental, reveló diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). Las muestras de agua presentaron una mayor frecuencia de 28.1% positivos que las muestras de suelo (**Gráfica 10**).





Las muestras recolectadas en agua de ríos presentaron un 33.3% de aislamientos positivos, seguido por aguas de pilas con 32.4% y un 28.6% en agua de pozo, mientras que solo el 9.1% de las muestras de grifo mostraron crecimiento de espiroquetas **(Gráfica 11)**.

La frecuencia de aislamientos positivos entre departamentos presentó diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). En Chinandega fue donde se encontró una alta positividad (47.1%), mientras que las frecuencias más bajas se encontraron en los departamentos de Matagalpa (13.6 %), seguido de León (5.3%) **(Gráfica 12)**.

En la comparación entre los resultados de diferentes departamentos, dividido por tipo de muestra, se encontró mayor porcentaje de positivos en muestras de agua y suelo en el departamentos de Chinandega, mientras que en Matagalpa y León se observó una frecuencia de aislamientos en muestras de agua del 26.8% y 7.70% respectivamente, en estos últimos dos departamentos no se aislaron espiroquetas en muestras de suelo **(Gráfica 13)**.

### 8.3 Moleculares

En el análisis molecular mediante la PCR, se encontró que el 15% de los aislamientos, resultaron positivos para leptospiras de las especies patógenas **(Gráfica 14)**.

El análisis de PCR distribuido por tipo de muestra mostró que un 17.67% de los aislamientos a partir de agua y un 50% de los aislamientos a partir de suelo, fueron positivos a leptospiras patógenas **(Gráfica 15)**.

En el departamento de Chinandega se encontró un 25% de aislamientos positivos a leptospiras patógenas, en Matagalpa un 9.09%, mientras que en León no se encontraron aislamientos patógenos a partir de muestras ambientales **(Gráfica 16)**.



## 9. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue la identificación de leptospiras patógenas en muestras de animales domésticos, y muestras ambientales de diferentes departamentos de la región Central y Pacífico de Nicaragua mediante la técnica de diagnóstico de microaglutinación como prueba serológica de referencia, así como la prueba confirmatoria de reacción en cadena de la polimerasa.

La prueba de microaglutinación reveló una respuesta inmunitaria ante *Leptospira* en un 17.4%, otros estudios similares mostraron porcentajes mayores. García y Rivas encontraron un porcentaje superior (42.85%) de reactores (7), mientras tanto Pineda en su estudio reflejó un 23.4% (9), lo que demuestra que los animales domésticos se encuentran en un estado de portadores o enfermos, sin embargo el 82.6% restante no mostró ser reactor, no obstante los resultados negativos podrían no revelar su infección, la que podría estar relacionada con un estado de inmunosupresión o recientemente infectados, por lo que una segunda prueba debería ser realizada para su confirmación.

En el análisis serológico las especies porcina y bovina mostraron frecuencias elevadas de reactividad (26.1% y 16.7% respectivamente). García y Rivas coinciden con este estudio al mencionar a las especies bovina y porcina como las más afectadas (7). Pineda reportó resultados similares en cuanto a las especies más afectadas (9), sin embargo, la frecuencia de reactores en esos estudios fueron superiores a los encontrados en este trabajo, esta variación puede ser relacionada con las inundaciones que ocurrieron en los años 2009 al 2011 (44), que potenciaron la propagación de la espiroqueta.

Los resultados serológicos obtenidos en este estudio, identifican la presencia de anticuerpos antileptospira en la única muestra de la especie felina, reaccionando al serogrupo Icterohaemorrhagiae. El trabajo de Chan *et al.*, llevado a cabo en Taiwán coincide con estos hallazgos, encontrando reactividad en un 9.3% de los felinos muestreados (8), otros estudios identifican leptospiras patógenas en orina por el método de la PCR (45). Este dato confirma que el gato no está exento a la probabilidad de contraer la infección, siendo portador y posible diseminador de la espiroqueta, razón por cual desempeña un papel importante para la contaminación ambiental continua, principalmente si se toma en consideración la cercanía de los gatos con los humanos.



El análisis de aislamiento en orina de animales domésticos no mostraron la presencia de la espiroquetas en el medio enriquecido (EMJH+FU). Este resultado no podría afirmar completamente la ausencia de leptospirosis en el organismo, puesto que diversos factores podrían evitar la presencia en orina (pH ácido, antibióticos).

La distribución de reactividad en la MAT por departamentos, mostró a Nueva Segovia con un 37.5%, Boaco 33.3% y Managua 30%. Estudios previos reportan frecuencias mayores a las encontradas; sin embargo confirma que, el departamento de León es una zona de alta endemicidad para la leptospirosis tras haber encontrado valores superiores en la MAT (6), mientras que, en este estudio no se observó una elevada frecuencia de reactores en el departamento de León. Estos resultados pueden explicarse al comportamiento del régimen de pluviosidad durante los últimos 10 años. Schneider *et al.*, en su estudio comprendido en el periodo 2004-2010, confirma que, la leptospirosis está asociada a las fuertes lluvias e inundaciones acompañados de varios desastres naturales, teniendo evidencia que los meses de septiembre y octubre tuvieron mayor precipitación, que a la vez son los meses en que se presentan altos porcentajes de casos positivos a leptospirosis humana (44), mientras que, en el año 2015 la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) reportó que, Nicaragua mostró escasas precipitaciones, atribuido a la presencia del fenómeno meteorológico conocido como “El Niño” (46).

El porcentaje de aislamiento encontrados en este estudio fue de 17.20% de positividad a *Leptospira* spp., presente un 28.1% en muestras de agua, mientras que la frecuencia en suelo fue de 3.8%. Existen pocos informes sobre el análisis epidemiológico de leptospirosis ambientales. Esto es probablemente por el crecimiento excesivo de contaminantes y al lento crecimiento de la espiroqueta en el aislamiento. Por lo que conlleva al uso de agentes antimicrobianos con el medio enriquecido para su crecimiento selectivo. Azali *et al.*, en su trabajo llevado a cabo en Malasia nororiental, encontró un 5% positivos al aislamiento en muestras de agua y 18% en muestras de suelo (47). Mientras que en la península de Malasia, Benacer *et al.*, obtuvo en muestras en agua y suelo un resultado de 23.1% y 23.3% respectivamente (10). Ambos resultados mostraron similitud con los obtenidos. Por lo que, es necesario el crecimiento selectivo de *Leptospira* spp., para



garantizar su rápido diagnóstico y así contribuir a una prevención temprana para reducir los riesgos de infección entre la población.

El resultado por origen de agua, reflejó que las muestras de ríos mostraron mayor frecuencia de positivos (33.3%) al aislamiento, estos datos evidencian que los ríos contienen las condiciones idóneas para la supervivencia de la espiroqueta, por lo que sería necesaria su vigilancia ante cualquier brote, ya que Nicaragua han presentado antecedentes epidémicos lo que lo convierte en un país endémico.

Chinandega fue el departamento con mayor porcentaje al aislamiento y la frecuencia de muestras ambientales positivas a leptospirosis, en agua y suelo fueron de 60% y 28.65% respectivamente. Los resultados de Schneider *et al.*, coinciden con los encontrados en este estudio (44), aunque su objetivo fue la identificación de áreas críticas, sus análisis en muestras humanas, reflejaron que fue ésta la zona con mayores porcentajes de casos positivos a leptospirosis. Puesto que, los seres humanos y otros animales se infectan cuando entran en contacto con la orina de animales infectados, ya sea directamente o a través de agua superficiales o suelos húmedos contaminados por la orina de los mismos.

El presente estudio indica que del total de aislamientos positivos a *Leptospiras* spp., el 15% (3/20) mostraron amplificación mediante la PCR convencional dirigida al gen *lfb1*. En las frecuencias por departamento; Chinandega obtuvo un 25% (2/8) de positivos a leptospirosis patógenas, presentes en muestras de agua y suelo, mientras que en Matagalpa se logró identificar 9.09% (1/11) en muestras de suelo, lo que evidencia la presencia de cepas patógenas en el ambiente. Otros estudios similares lograron identificar *Leptospira interrogans*. Saito *et al.*, reporta 11 aislamientos positivos de 23 muestras ambientales PCR anidada (48), Wójcik-Fatla *et al.*, identificó 5% (2/40) de positividad dirigido al gen *LipL32* en muestras de agua (11). En base a estos datos, se puede afirmar que el medio ambiente es un factor de suma importancia en la epidemiología de la leptospirosis, puesto que la bacteria es excretada en la orina de animales domésticos portadores, contaminando suelos y aguas superficiales, lo que aportaría datos relevantes para estudios epidemiológicos, así como para la prevención y el control de la enfermedad.



## 10. CONCLUSIONES

- Con este trabajo se logró identificar la presencia de leptospiras patógenas en muestras ambientales, lo que remarca la necesidad de un abordaje multifactorial para el control de la leptospirosis en Nicaragua.
- La PCR convencional resulta ser una técnica útil para identificar leptospiras patógenas, mediante el uso del *lfb1* como primers específico, lo que brindó un resultado de alto valor epidemiológico.
- La presencia de especies patógenas en animales domésticos y ambiente puede indicar y poner de relieve la importancia de la detección en agua y suelo, especialmente en ríos, con el fin de reducir al mínimo cualquier posibilidad de infección por *leptospira*.



## 11. RECOMENDACIONES

### Al ministerio de salud

- Seguir el estudio epidemiológico anual tanto en animales domésticos, como en muestras ambientales, y así conocer el comportamiento de la leptospirosis a nivel nacional.
- Educar y difundir información a la población nicaragüense sobre la enfermedad, el vínculo con el ambiente y los animales domésticos (bovinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos y porcinos), y así poder tomar medidas necesarias de prevención.
- Establecer programas de control de roedores en zonas rurales y urbanas.
- Continuar el diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR, puesto que es una técnica con alta sensibilidad para su detección.

### A los médicos veterinarios

- Implementar medidas profilácticas durante la práctica de sus labores (toma y análisis de la muestra).
- Informar a los propietarios sobre la enfermedad y como evitar la propagación en sus animales.

### A la población

- Mantener la higiene en el hogar (control de roedores, alimento tapado, etc.)
- Evitar que los animales domésticos salgan de la casas de habitación sin el cuidado del propietario.
- Llevar un control veterinario de sus animales.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Rafael García Gonzáles, Angélica Reyes Torres, David Basilio Hernández, Maritoña Ramírez Pérez, Beatriz Rivas Sánchez. Leptospirosis; Un Problema de Salud Pública. 2013.:57-70.
2. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. 2001; tercero. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=19161&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19161&Itemid=)
3. Manuel Céspedes Z. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Rev Peru Med Exp Salud Pública. Octubre de 2005; 22(4):290-307.
4. Marta Noelia Cardona E., Rosalba María Moros V., Eneida Aurora López L, José Luis Pérez C., Roberto Carlos Hernández. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. 2008.:7.
5. Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. J Microbiol Methods. Enero de 2011;84(1):1-7.
6. Byron Flores Somarriba. Comportamiento epidemiológico de *Leptospira* spp., en animales domésticos, roedores y aguas, cercanos a los casos de leptospirosis humana en Nicaragua, durante los años 2007-2013. Universidad de Zaragoza; 2013.
7. Adriana Isabel García Bárcenas, Vanessa de los Ángeles Rivas Lara. Determinación de *Leptospira Interrogans* en animales domésticos de diferentes municipios de Nicaragua en el período comprendido 2009-2010. [León, Nicaragua]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2010.
8. Chan K-W, Hsu Y-H, Hu W-L, Pan M-J, Lai J-M, Huang K-C, et al. Serological and PCR Detection of Feline *Leptospira* in Southern Taiwan. Vector-Borne Zoonotic Dis. 20 de diciembre de 2013;14(2):118-23.
9. Isaac David Pineda Sirias. Prevalencia de *Leptospira* e identificación de serogrupos circulantes en animales domésticos asociados a casos de Leptospirosis en humanos en el pacífico y norte de Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2011.
10. Benacer D, Woh PY, Zain SNM, Amran F, Thong KL. Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. Microbes Environ. 2013; 28(1):135-40.
11. Wójcik-Fatla A, Zajac V, Wasiński B, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A, et al. Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. Ann Agric Environ Med AAEM. 2014; 21(4):730-2.
12. Saito M, Miyahara S, Villanueva SYAM, Aramaki N, Ikejiri M, Kobayashi Y, et al. PCR and Culture Identification of Pathogenic *Leptospira* spp. from Coastal Soil in Leyte, Philippines, after a Storm Surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). Appl Environ Microbiol. Noviembre de 2014; 80(22):6926-32.



## “Identificación de leptospirosis patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”



13. Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008; Disponible en: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf)
14. Organización Mundial de la Salud. Leptospirosis Humana: Guía para el Diagnóstico, Vigilancia y Control. Disponible en: <http://www.anlis.gov.ar/iner/wp-content/uploads/2013/11/Manual-final2.pdf>
15. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. abril de 2001;14(2):296-326.
16. Dong H, Hu Y, Xue F, Sun D, Ojcius DM, Mao Y, et al. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic Leptospira species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. BMC Microbiol. 2008; 8(1):1-12.
17. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol. Octubre de 2009; 7(10):736-47.
18. K. Sandow y W. Ramírez. Leptospirosis (Leptospirosis). 2005. junio de 2005 [citado 9 de agosto de 2016]; VI. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060605/060501.pdf>
19. Eliana Sánchez Arturo. DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA EN ORINA DE PACIENTES CRÓNICOS Y PERROS MEDIANTE PCR EN EL VALLE DEL CAUCA. [Santiagode Cali]: Universidad del Valle; 2011. Disponible en: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/3912/4/CB-0441166.pdf>
20. Cachay E, Vinetz J. A Global Research Agenda for Leptospirosis. J Postgrad Med. 2005; 51(3):174-8.
21. Schneider MC, Jancloes M, Buss DF, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, et al. Leptospirosis: A Silent Epidemic Disease. Int J Environ Res Public Health. Diciembre de 2013; 10(12):7229-34.
22. Valverde M de los A, Ramírez JM, Montes de Oca LG, Goris MGA, Ahmed N, Hartskeerl RA. Arenal, a new Leptospira serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. Septiembre de 2008; 8(5):529-33.
23. Silva ÉF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig DD, Athanzio DA, et al. Leptospira noguchii and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. Emerg Infect Dis. Abril de 2009; 15(4):621-3.
24. Silva EF, Santos CS, Athanzio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulence of Leptospira isolates in a hamster model. Vaccine. 23 de julio de 2008; 26(31):3892-6.
25. Arturo Erosa Barbachano. Leptospirosis: Historia Médica. 2001.:6.
26. Oriol López, F. B. Tratamiento de la leptospirosis humana. Alternativa antibiótica. 2015. 22 de mayo de 2015; 2(2):7.
27. Pedro N. Acha, Boris Szyfres. ZOONOSIS Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES COMUNES AL HOMBRE Y A LOS ANIMALES. 2001. 3:418.
28. Zunino M E, Pizarro P R. Leptospirosis: Puesta al día. Rev Chil Infectol. Junio de 2007; 24(3):220-6.





## “Identificación de leptospirosis patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”



29. Rosario LA, Arencibia DF, Batista N, Jirón W, Suárez YE, Infante JF. Caracterización de aislamientos clínicos de *Leptospira* por métodos fenotípicos y moleculares en la República de Nicaragua. *Vaccimonitor*. Diciembre de 2012; 21(3):6-12.
30. Ofelia López, Julio Vignolo, Silvia Hernández, Cristina Lindner, Nelly Murillo, Raquel Rosa. GUIA DE CONTROL Y MANEJO DE LEPTOSPIROSIS. : 43.
31. Nicole Dammert. LEPTOSPIROSIS: UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. Disponible en: [http://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/Monografia\\_leptospira.pdf](http://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/Monografia_leptospira.pdf)
32. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. *Scand J Immunol*. 1 de mayo de 2011; 73(5):408-19.
33. Cinco M, Domenis R, Perticarari S, Presani G, Marangoni A, Blasi E. Interaction of leptospires with murine microglial cells. *New Microbiol*. Julio de 2006; 29(3):193-9.
34. Rosario Fernández L, A., Arencibia Arrebola D, F, Batista Santiesteban, N., Jirón Toruño, W., Valdes Abreú B, Y., Infante Bourzac, J. F. LEPTOSPIROSIS, UNA REVISIÓN ACTUALIZADA. 2012.:12.
35. Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*. Mayo de 2008; 76(5):2063-9.
36. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect Inst Pasteur*. Marzo de 2009; 11(3):328-33.
37. Ristow P, Bourhy P, McBride FW da C, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. *PLOS Pathog*. 13 de julio de 2007; 3(7):e97.
38. Gerald L. Murray, Amporn Srikram, Rebekah Henry, Anucha Puapairoj, Rasana W. Sermswan, Ben Adler. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. 2009; Disponible en: [http://158.108.110.14/~office/staff\\_research/abs317\\_a5223.pdf](http://158.108.110.14/~office/staff_research/abs317_a5223.pdf)
39. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine Mal Infect*. Enero de 2013; 43(1):1-9.
40. Martin PL, Arauz MS, Stanchi NO. Diagnóstico de Leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria. 2015.:13.
41. Office International des Epizooties. Validación y control de calidad de los Métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizados para el Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas. 2002. 2.
42. Moreno N, Agudelo-Flórez P. Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. Octubre de 2010; 27(4):548-56.
43. C. Alonso-Andicoberry, F.J. García-Peña, L.M. Ortega Mora. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. 2001. 16:20.



## “Identificación de leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”

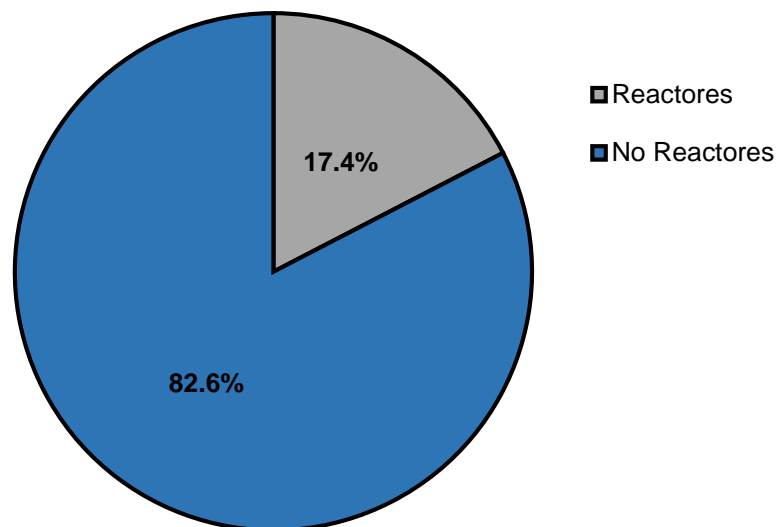
---



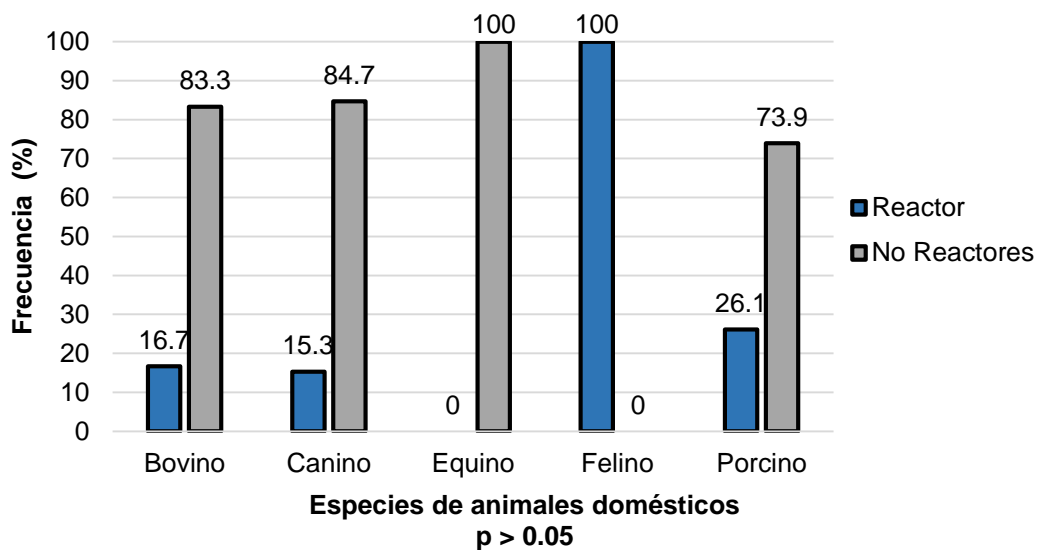
44. Schneider MC, Nájera P, Aldighieri S, Bacallao J, Soto A, Marquiño W, et al. Leptospirosis Outbreaks in Nicaragua: Identifying Critical Areas and Exploring Drivers for Evidence-Based Planning. *Int J Environ Res Public Health*. 26 de octubre de 2012; 9(11):3883-910.
45. Weis S, Rettinger A, Bergmann M, Llewellyn JR, Pantchev N, Straubinger RK, et al. La detección de *Leptospira* ADN en la orina y la presencia de anticuerpos específicos en los gatos al aire libre en Alemania. *J Feline Med Surg*. 29 de febrero de 2016; 1098612X16634389.
46. Fenómeno El Niño 2015-2016 el más fuerte hasta ahora: NOAA [Internet]. El 19 Digital. Disponible en: <https://www.el19digital.com/articulos/ver/titulo:36396-fenomeno-el-nino-2015-2016-el-mas-fuerte-hasta-ahora-noaa>
47. Azali MA, Yean Yean C, Harun A, Aminuddin Baki NN, Ismail N. Molecular Characterization of *Leptospira* spp. in Environmental Samples from North-Eastern Malaysia Revealed a Pathogenic Strain, *Leptospira alstonii*. *J Trop Med*. 3 de abril de 2016; 2016: e2060241.
48. Saito M, Villanueva SYAM, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, et al. Comparative Analysis of *Leptospira* Strains Isolated from Environmental Soil and Water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol*. 15 de enero de 2013; 79(2):601-9.



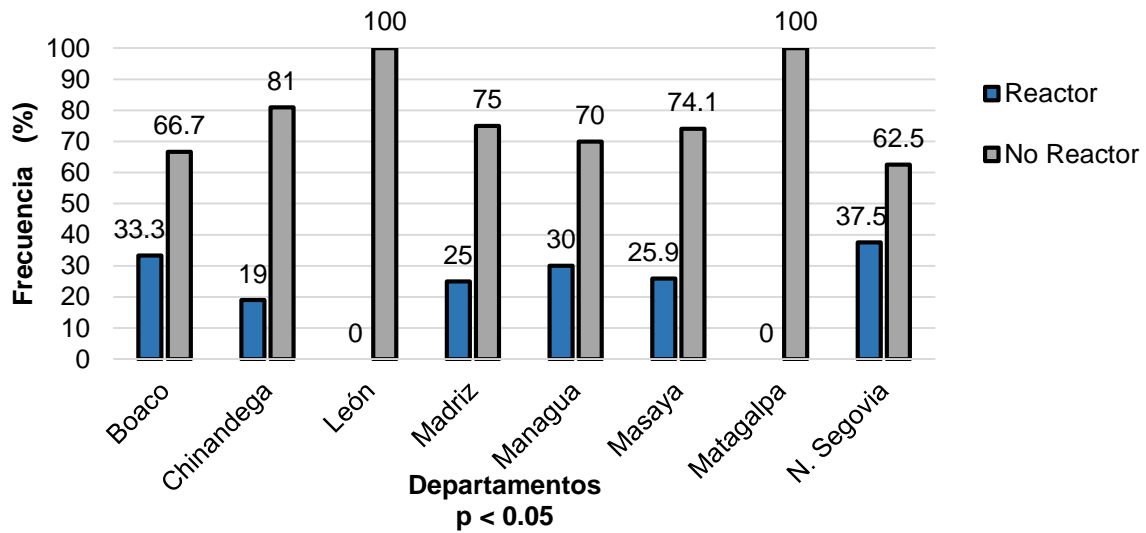
### 13. ANEXOS



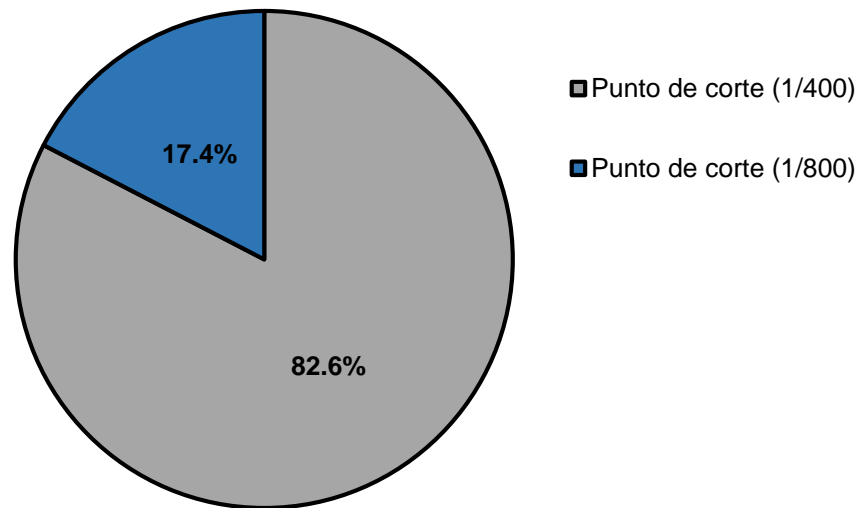
Gráfica 1. Resultado de la MAT-qualitativa



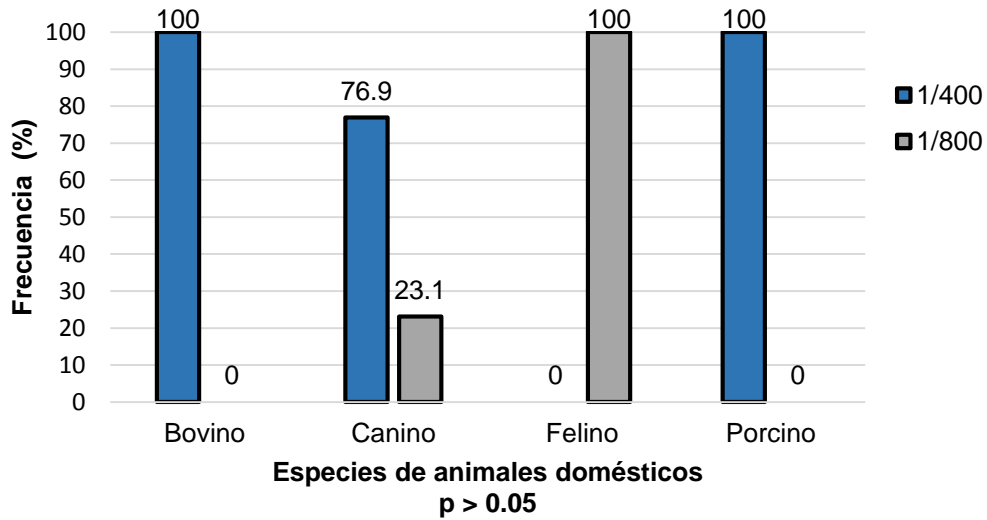
Gráfica 2. Resultado de la MAT-qualitativa por especie



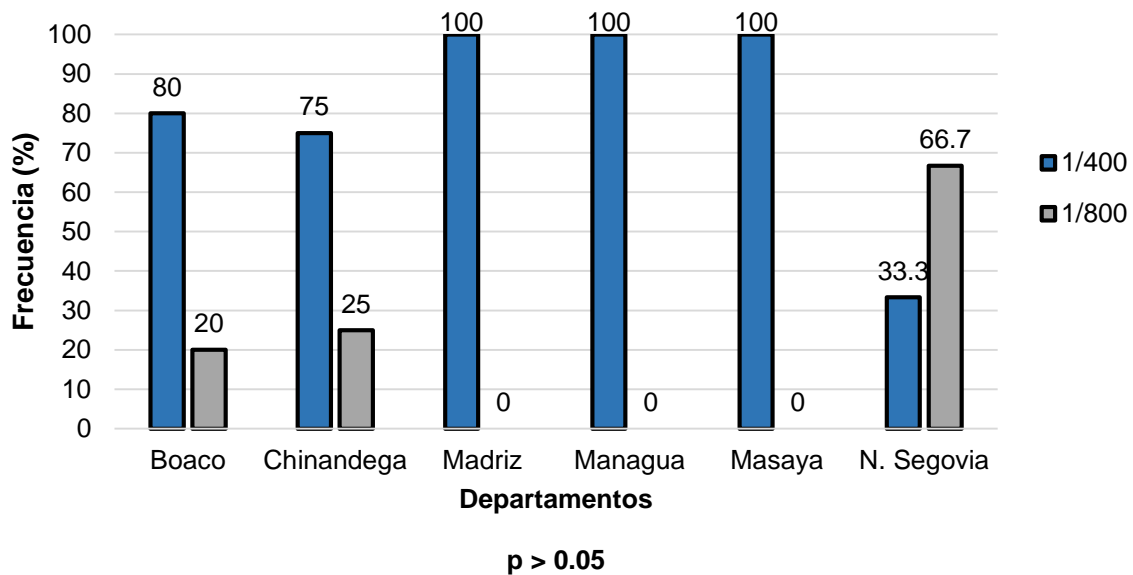
**Gráfica 3.** Resultado de la MAT-cualitativa por departamentos



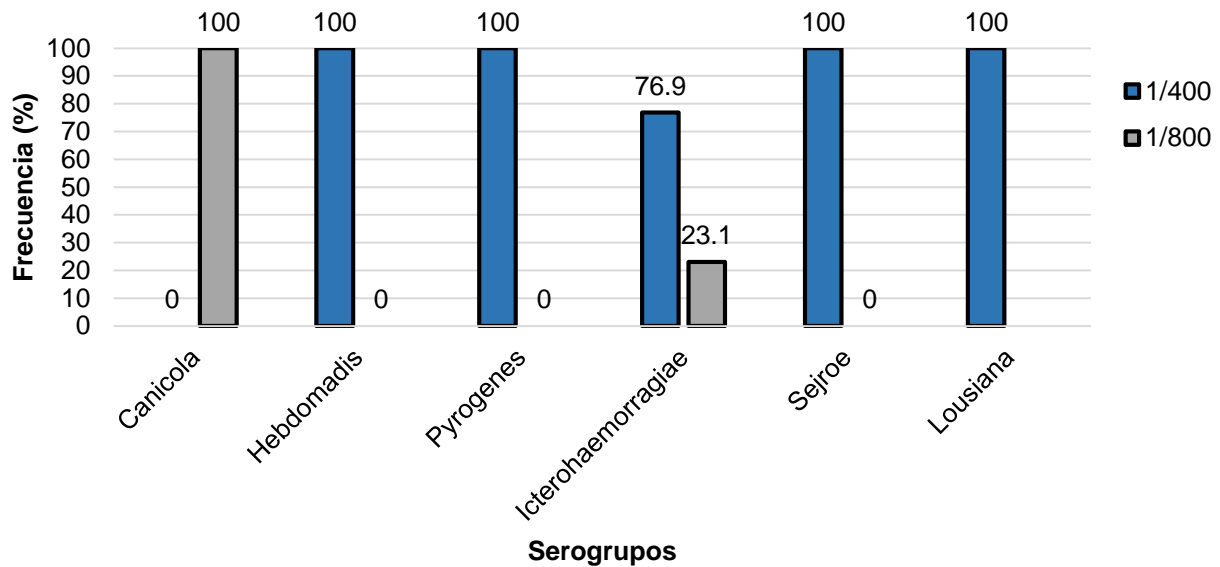
**Gráfica 4.** Resultado de la MAT-cuantitativa



**Gráfica 5.** Resultado de la MAT-cuantitativa por especie



**Gráfica 6.** Resultado de la MAT-cuantitativa por departamento



$p > 0.05$

**Gráfica 7.** Resultado de la MAT-cuantitativa por serogrupo

**Tabla 4**

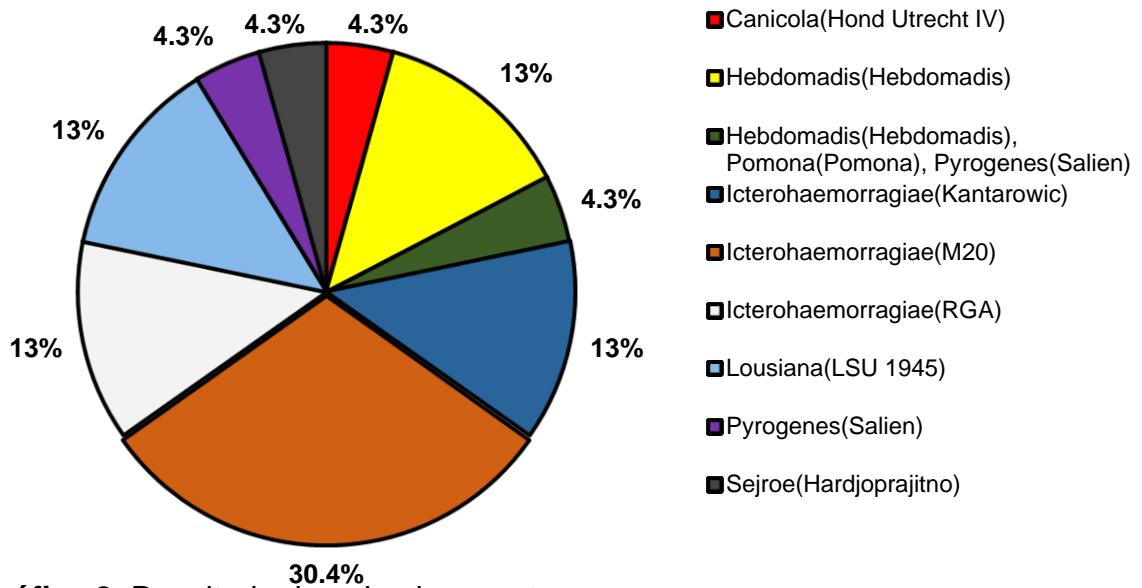
		Serogrupos					
		Canicola	Hebdomadis	Pyrogenes	Icterohaemorrhagiae	Sejroee	Lousiana
Especie	Bovino	0	33.3%	0	33.3%	0	33.3%
	Canino	7.7%	7.7%	0	84.6%	0	0
	Felino	0	0	0	100%	0	0
	Porcino	0	33.3%	16.7%	0	16.7%	33.3%

**Tabla 5**

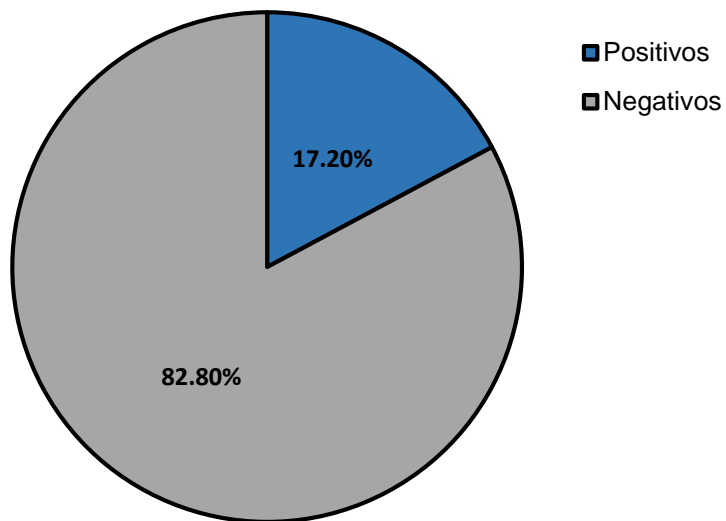
		SEROGRUPOS					
		Canicola	Hedomadis	Pyrogenes	Icterohaemorrhagiae	Sejroee	Lousiana
DEPARTAMENTO	Boaco	0	20%	20%	20%	20%	20%
	Chinandega	0	0	0	100%	0	0
	Madriz	0	100%	0	0	0	0
	Managua	0	33.3%	0	66.7%	0	0
	Masaya	0	14.3%	0	57.1%	0	28.6%
	N. Segovia	33.3%	0	0	66.7%	0	0



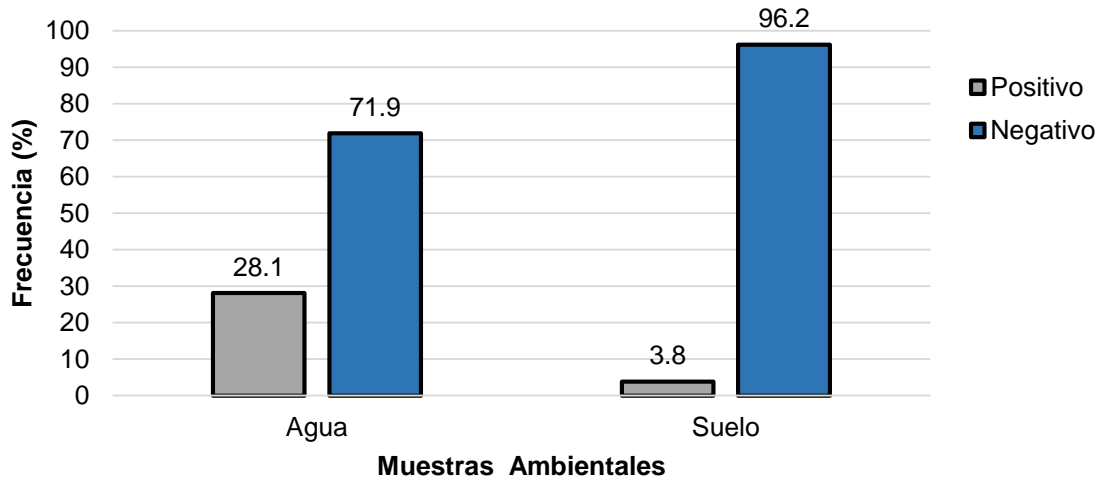
“Identificación de leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”



Gráfica 8. Resultado de animales reactivos por serovares

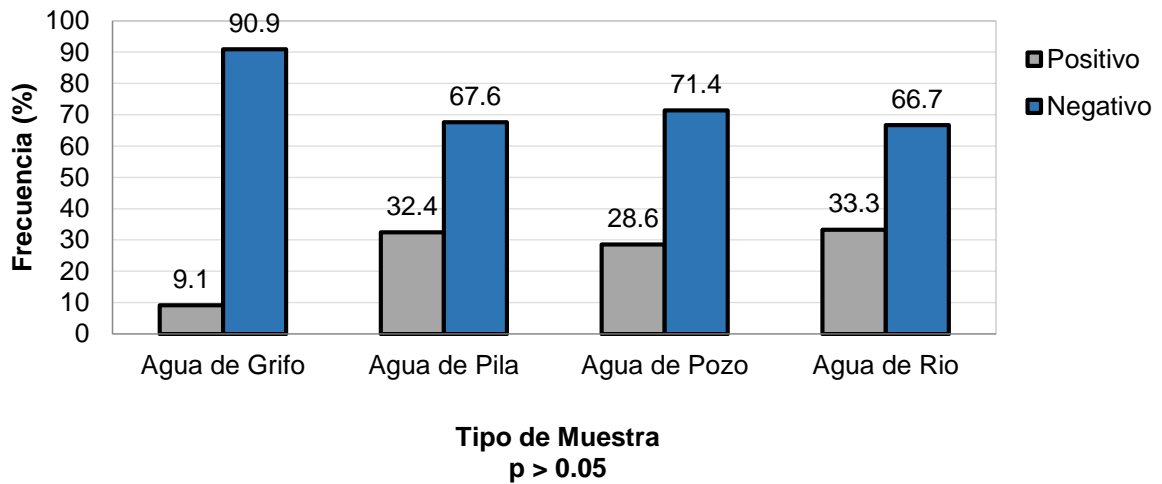


Grafica 9. Resultado de aislamiento de *Leptospira* spp. en muestras ambientales.



$p < 0.01$

**Gráfica 10.** Resultado del aislamiento en muestras ambientales



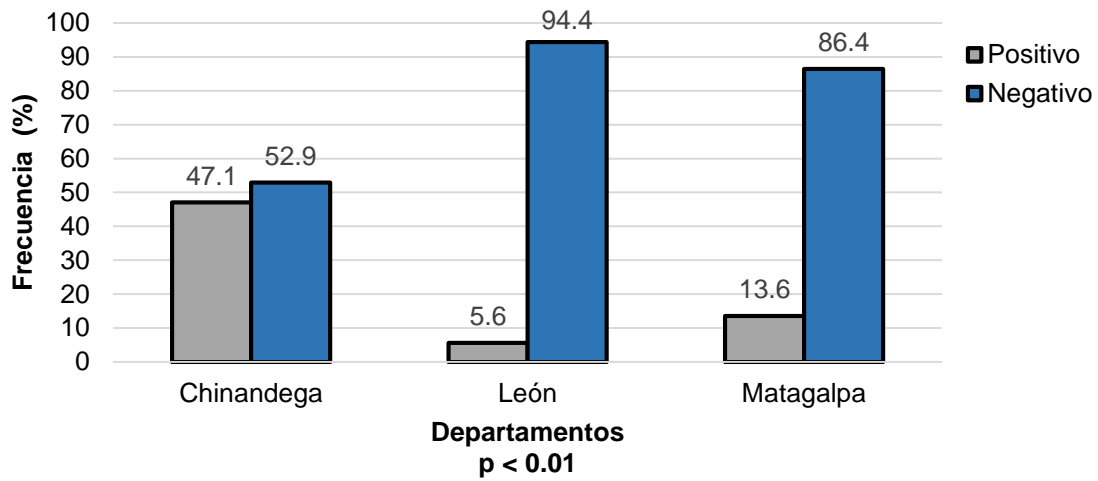
Tipo de Muestra  
 $p > 0.05$

**Gráfica 11.** Resultado de aislamiento por tipo de muestra

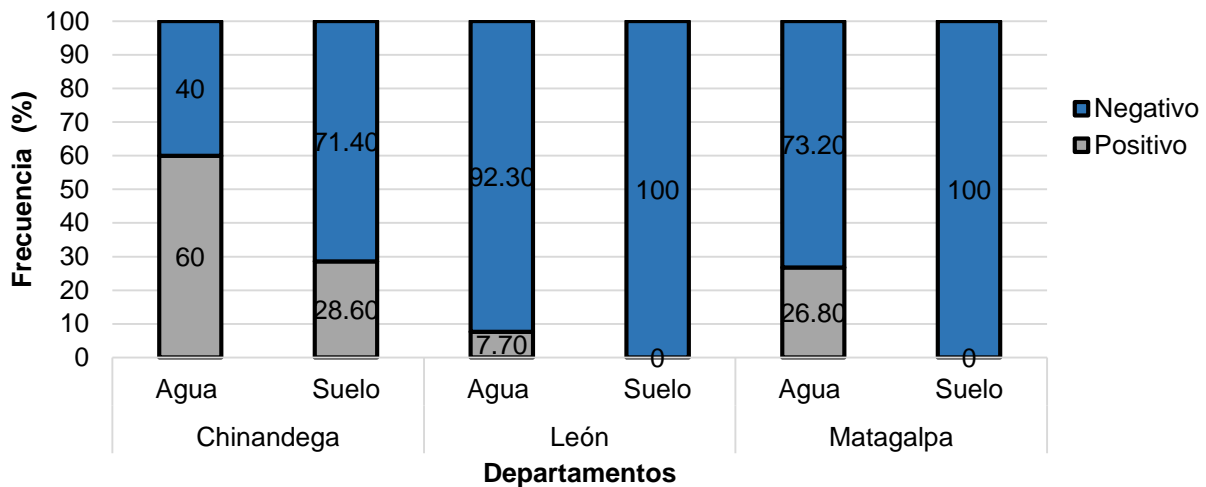




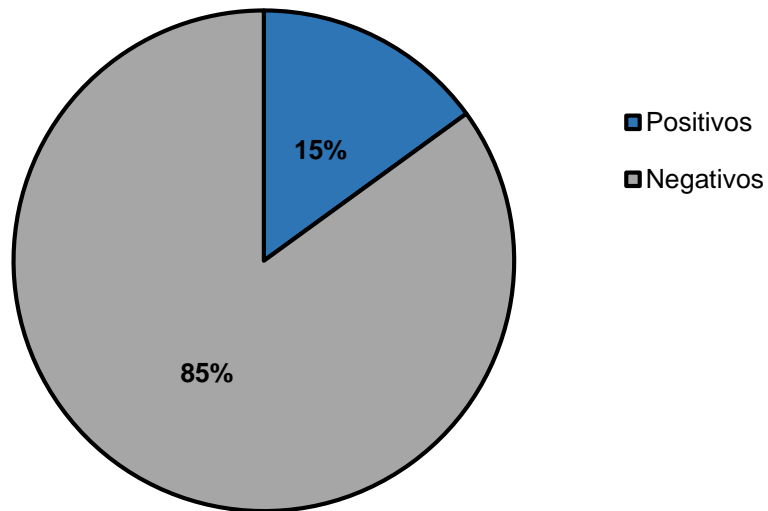
“Identificación de leptospirosis patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”



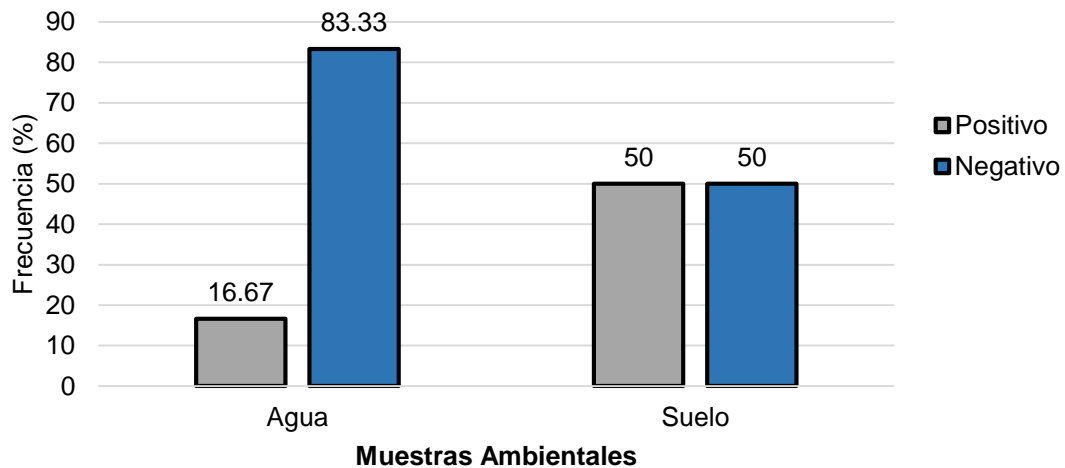
**Gráfica 12.** Resultado del aislamiento por departamento



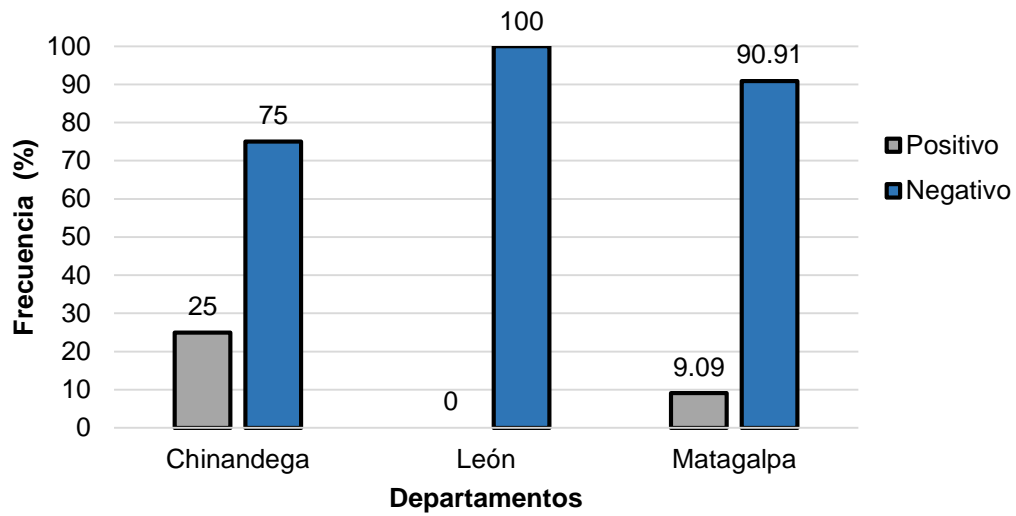
**Gráfica 13.** Resultado del aislamiento de muestras ambientales por departamento.



**Gráfica 14.** Resultado de PCR a muestras positivas al aislamiento



**Gráfica 15.** Resultado de la PCR en muestras ambientales



**Gráfica 16.** Resultado de PCR por departamento



## PROCEDIMIENTO DEL TEST DE MICROAGLUTINACIÓN

### MAT CUALITATIVO

- Rotular los tubos de ensayo en que se diluirán los antígenos.
- Diluir 1.5 ml de los antígenos del tubo en crecimiento en 3 ml de PBS, de forma que al microscopio se observen mínimo 100 leptospiras por campo.
- Marcar las placas flexibles de 96 pocillos, fondo en U sin tapa no estéril, con la numeración de la muestra y de los antígenos correspondiente.
- Agregar 49  $\mu$ l de PBS y 1  $\mu$ l de suero en los pozos correspondiente.
- Agregar 50  $\mu$ l de antígeno según el serovar en la primera línea de pozos se depositan en 50  $\mu$ l y 50  $\mu$ l de antígeno correspondiente al pozo sin suero, es el control de antígenos que también puede ser ubicado al final de la placa.
- Incubar por dos horas en una temperatura de 37°C.
- Tomar 10  $\mu$ l de las muestras preparadas en los pozos de las placas y montarlas en un porta objeto.
- Observar en el microscopio de campo oscuro a 20X, si hay aglutinaciones (reacción antígeno-anticuerpo) o no.

### MAT CUANTITATIVO

- Rotular los tubos de ensayo en que se diluirán los antígenos.
- Diluir 1.5 ml de los antígenos a estudiar en 3ml de PBS
- Rotular las placas con el número de muestra en ambos lados con el número de antígeno al cual reacciona en el cualitativo.
- Agregar 50  $\mu$ l de PBS, en el primer pocillo (control) yendo de izquierda a derecha y 50  $\mu$ l de antígeno.
- En el segundo pocillo de izquierda a derecha (1/50). Agregar 49  $\mu$ l de PBS, 1  $\mu$ l de suero y 50  $\mu$ l de antígeno.
- En el tercer pocillo (1/100) agregar 99  $\mu$ l de PBS y 1  $\mu$ l de suero. En los pocillos restantes agregar 99  $\mu$ l de PBS.



“Identificación de leptospiras patógenas en muestras ambientales y animales domésticos en 8 departamentos de Nicaragua en el año 2015.”



- Realizar las diluciones a partir del tercer pocillo, mezclando con las puntas de pipetas, obteniendo: tercer pocillo: 1/100, cuarto pocillo: 1/200, quinto pocillo 1/400, sexto pocillo 1/800.
- Agregar 50  $\mu$ l del antígeno correspondiente en los pocillos.
- Se incuban por dos horas a 37°C, protegidas de la luz directa, (cubrimos las placas con papel de aluminio y las incubamos).
- Tomar 10  $\mu$ l de las muestras preparadas en los pozos de las placas y montarlas en un porta objetos.
- Observar en el microscopio de campo oscuro a 20X, si hay aglutinaciones (reacción antígeno-anticuerpo) o no.



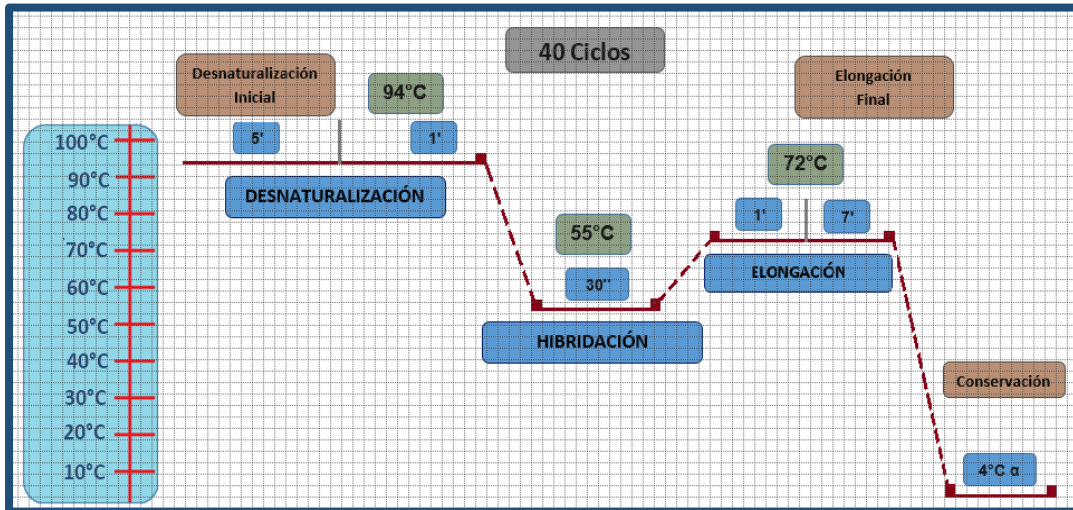


Figura 1. Protocolo de Amplificación



Mezcla de componentes



Preparación para la electroforesis

Figura 2. Procedimiento de la PCR

**Figura 3. ELECTROFORESIS**

