

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA**

**UNAN-LEÓN**

**Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias**



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

**TEMA:**

Detección de leptospiras patógenas en muestras ambientales de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega, 2017-2018.

**AUTOR:**

- Br. Karla Massiel Escobar Zeledón

**TUTORES:**

- **PhD.** Jessica Sheleby Elías
- **PhD.** Byron Flores Somarriba

León, septiembre de 2018

## ÍNDICE

I. Dedicatoria .....	1
ii. Agradecimientos .....	2
iii. Resumen .....	3
iv. Abreviaturas.....	4
v. Glosario .....	5
1. Introducción .....	8
1.1 Antecedentes .....	10
1.2 Justificación.....	12
1.3 Planteamiento del problema.....	13
2. Objetivos.....	14
2.1 Objetivo general .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
3. Marco teórico .....	15
3.1 Leptospirosis .....	15
3.2 Etiología .....	15
3.3 Proteínas de membrana externa omps .....	16
3.3.1 Omp1 .....	17
3.3.2 Lig (proteínas leptospirales similar a las inmunoglobulinas).....	18
3.4 Epidemiología .....	18
3.4.1 Reservorios.....	19
3.4.2 Mecanismos de transmisión .....	20
3.5 Patogenia .....	20
3.6 Manifestaciones clínicas .....	21
3.6.1 Perros .....	21
3.6.2 Equinos.....	21
3.6.3 Ovinos y caprinos .....	21
3.6.4 Porcinos.....	22
3.6.5 Bovinos .....	22
3.7 Diagnóstico .....	22
3.7.1 Cultivo.....	22

3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	23
4. Material y método .....	25
4.1 Tipo de estudio.....	25
4.2 Área de estudio .....	25
4.3 Población de estudio.....	25
4.4 Tamaño de la muestra .....	25
4.5 Selección de muestras .....	26
4.5.1 Muestreo de ríos.....	26
4.6 Factores de inclusión .....	26
4.7 Toma y envío de muestras.....	26
4.7.1 Agua .....	26
4.7.2 Tierra .....	27
4.8 Proceso de muestras de tierra .....	27
4.9 Análisis de las muestras .....	27
4.9.1 Aislamientos .....	27
4.9.2 Extracción de adn .....	27
4.9.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	28
4.9.3.1 Cebadores .....	28
4.9.3.2 Componentes y mezcla .....	28
4.9.3.3 Protocolo de amplificación .....	29
4.9.3.4 Lectura.....	29
4.9.3.5 Análisis estadísticos.....	29
5. Resultados.....	30
5.1 Aislamientos.....	30
5.2 PCR .....	31
5.3 Ríos.....	31
6. Discusión .....	32
7. Conclusiones .....	36
8. Recomendaciones .....	37
9. Bibliografía.....	38
10. Anexos .....	49

## I.DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo a **Dios**, mi Padre y amigo, por su compañía y sus incontables bendiciones.

A mis padres **Mirtha Zeledón** y **Julio Escobar**, por ser mis guías y ejemplo de esfuerzo y a mi tía **Ivania Castillo**, por su apoyo incondicional durante el transcurso de mi formación académica.

Al Lic. **Fernando Monge**, por creer en mí, por su amistad incondicional y sus motivaciones en todo momento.

## **II. AGRADECIMIENTOS**

A **Dios**, por concederme sabiduría, perseverancia y las habilidades necesarias para la culminación de mis estudios universitarios.

A mis padres, **Mirtha Zeledón** y **Julio Escobar** por su apoyo que siempre estuvo presente.

A mis tutores, **PhD. Jessica Sheleby** y **PhD. Byron Flores Somarriba**, por su confianza, apoyo y por dedicar parte de su tiempo para orientarme en la realización de este trabajo.

A la **Lic. Eveling Pérez, MSc.**, por instruirme y ayudarme en cada actividad del laboratorio con paciencia y comprensión.

A la **Lic. Erika Hernández** por brindarme su cariño y amistad, por apoyarme siempre que lo necesite y por compartir cada momento.

¡Gracias!

### III.RESUMEN

En Nicaragua la leptospirosis se considera una enfermedad endemoepidémica, siendo los departamentos de León y Chinandega áreas críticas y Jinotega un área endémica a la presentación de brotes. El objetivo de esta investigación es detectar leptospiras patógenas en muestras ambientales de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega, 2017-2018. Para ello, se recolectaron 120 muestras ambientales (78 de agua y 42 de tierra) en viviendas con casos de leptospirosis humana reportados por el Ministerio de Salud (MINSAL) y en ríos cercanos a los focos que funcionan como recreativos; las cuales fueron aisladas en medio de cultivo líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) suplementado con 5-fluororacilo a una temperatura de 28-30°C y revisadas semanalmente en microscopio de campo oscuro. Las muestras positivas al aislamiento se sometieron a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa o PCR con los cebadores Lfb1, flaB, LipL32 y LipL41, específicos para leptospiras patógenas. Del total de muestras un 60.83% (73/120) resultó positivo al aislamiento, encontrando una mayor frecuencia en las de agua con un 67.9% (53/78) y en las originarias del departamento de León con un 70.3% (26/37). Los resultados de la PCR, revelaron la presencia de leptospiras patógenas en muestras de los departamentos de León y Chinandega, con un total de 6 (4 de agua y 2 de tierra), 2 de ellas pertenecen al río Telica, del departamento de León. Estas muestras amplificaron con los cebadores dirigidos al gen flaB (793 pb) y Lfb1 (331 pb) específicos para *Leptospira* patógena. Este estudio logró identificar leptospiras patógenas en muestras tanto de agua como de tierra, lo que confirma que el ambiente representa un riesgo potencial para la salud pública en lugares endémicos y la importancia de su estudio para comprender su comportamiento y aplicar medidas de prevención y control más efectivas.

## **IV. ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**CEVEDI:** Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación

**EMJH:** Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

**flaB:** Proteína flagelar B

**kDa:** kilodalton

**Lig:** del inglés leptospiral immunoglobulin-like proteins

**LipL:** del inglés leptospiral outer membrane lipoprotein

**MINSA:** Ministerio de salud

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**Omp11:** del inglés leptospiral outer membrane porin

**OMPs:** Proteínas de membrana externa, del inglés Outer Membrane Proteins

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**pH:** potencial de hidrogeniones

**spp:** Especie

## V. GLOSARIO

**Alcalino:** Sustancia base que se caracteriza por un pH igual o mayor a 7.

**Anticuerpo:** proteínas producidas por organismos animales que detectan y reaccionan ante la presencia de sustancias extrañas y perjudiciales.

**Antígeno:** Sustancia que el cuerpo considera extraña y que estimula una respuesta inmune ante ella. Puede ser ajena o propia del organismo.

**Catalasa:** Enzima que se encarga de proteger a las células del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno, catalizando su descomposición en oxígeno y agua.

**Cebadores:** Secuencia corta de ADN, conocidos como oligonucleótidos (5-20 nucleótidos), que se utilizan en la PCR para hibridar con el ADN de la muestra y definir la sección de este que será amplificada.

**Desnaturalización:** Separación de la doble hélice del ADN que ocurre por la exposición a temperaturas altas provocando que los puentes de hidrogeno que las unen se rompan.

**Electroforesis:** Técnica de laboratorio que consiste en la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico, a través de una superficie hidratada con una base sólida. La separación se efectuará de acuerdo al peso y carga eléctrica de cada molécula.

**Elongación:** Fase de la replicación de ADN en la que ocurre la adición de los nucleótidos a través de la ADN polimerasa para la formación de una nueva cadena.

**Epidemia:** Enfermedad que afecta de manera simultánea a un gran número de personas y animales de una región durante el mismo período de tiempo.

**Espiroquetas:** Bacterias móviles, de cuerpo fino y alargado en forma helicoidal, poseen flagelos que les permiten realizar movimientos giratorios y son causantes de enfermedades como leptospirosis, sífilis y la enfermedad de Lyme.

**Fletcher:** Medio semisólido utilizado para el cultivo de leptospiras, enriquecido con extracto de carne de vaca y suero de conejo que proporciona aminoácidos esenciales, carbono y compuestos nitrogenados que favorecen el crecimiento bacteriano.

**Hialuronidasa:** Enzima que se encuentra en algunas bacterias patógenas, encargadas de degradar el ácido hialurónico de la matriz extracelular lesionando así la estructura de los tejidos del hospedero.

**Huésped:** Organismo que porta en su interior a otro, el cual establece una relación de parasitismo.

**Incidencia:** Cantidad de casos nuevos de una enfermedad en un lugar determinado.

**Inmunógeno:** Sustancia con la capacidad de inducir una respuesta inmune específica en un organismo, los inmunógenos más potentes son proteínas y polisacáridos.

**Korthof:** Medio de cultivo líquido enriquecido con suero de conejo para el crecimiento y mantenimiento específico de leptospiras.

**Leptospirosis:** Enfermedad infecciosa producida por la bacteria *Leptospira*, es transmitida de los animales al ser humano o por el contacto con agua y tierra contaminadas con orina de animales infectados.

**Necrosis:** Muerte de un grupo de células o de un tejido a causa de una lesión provocada por un agente nocivo.

**Patógeno:** Agente biológico externo que produce enfermedad o daño en su huésped, que puede ser animal, humano o vegetal.

**Peptona:** Polipéptidos resultantes de la degradación enzimática de proteínas en sustancias que las contienen en abundancia como la carne y la sangre. En cultivos de bacterias, son la principal fuente de nitrógeno además de contener aminoácidos libres y cadenas cortas de péptidos.

**Porina:** Proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que regulan la entrada y salida de sustancias y las resguardan en ambientes hostiles.

**Reservorios:** Organismo en el que se mantiene una bacteria o virus patógeno donde se multiplica y se preserva por largos períodos de tiempo, sin causar algún tipo de patología mientras encuentra su huésped.

**Saprófito:** Organismo que se alimenta de residuos de vegetales o animales en estado de descomposición.

**Serodiagnóstico:** Diagnóstico de enfermedades infecciosas a través de la formación de reacciones inmunológicas provocadas en el suero sanguíneo frente a la presencia del agente infectante.

**Serovar:** Clasificación de los microorganismos de acuerdo al patrón antigénico que presentan en su superficie celular.

**Tropismo:** Tropismo tisular se le conoce a la afinidad que tienen las bacterias y virus por ciertos tipos de tejidos del huésped.

**Zoonosis:** Enfermedad propia de los animales que puede ser transmitida a los humanos por contacto directo o indirecto con un animal enfermo.

## 1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis que afecta de manera significativa la salud pública a nivel mundial, el número de casos en los últimos años ha incrementado, contabilizándose alrededor de más de 500, 000 cada año (1). Suele ser endémica en regiones con climas tropicales y subtropicales debido a su alta humedad (2). La variación climática, el medio rural y la ocupación laboral se consideran factores de riesgos importantes (3,4).

Esta enfermedad está catalogada como un riesgo ocupacional para veterinarios, limpiadores de alcantarillados, mineros, faenadores de animales y soldados sin embargo se ha identificado que las actividades acuáticas recreacionales también representan un factor de riesgo por inmersión en aguas contaminadas (5).

La *Leptospira interrogans* utiliza como reservorio especies de mamíferos salvajes y domésticos como cánidos, suidos, bovinos y murciélagos, pero el más común es la rata (*Rattus*) (6,7). La presencia de portadores asintomáticos o con enfermedad renal crónica conservan el mantenimiento de la bacteria en el ambiente, al eliminarla por la orina debido a esto la infección puede adquirirse a través del contacto directo o indirecto con orina infectada de animales, suelos, agua o alimentos contaminados (8–10).

Nicaragua ha presentado brotes de leptospirosis desde 1995; del 2007 al 2011 se registraron 568 alertas de leptospirosis en el mundo de las cuales 53 estaban ubicadas en Nicaragua (11,12). La incidencia anual de esta enfermedad en el país es de 23.3 por millón, aunque solo se confirman algunos casos debido a la vigilancia limitada y el mal diagnóstico (13).

Los eventos climatológicos severos como inundaciones y huracanes que han ocurrido en Nicaragua en las últimas décadas están significativamente relacionadas con la presentación de casos clínicos en humanos, especialmente en los departamentos de León y Chinandega (14), siendo una causa común pero no reconocida como enfermedad febril aguda en el país (12).

La identificación de fuentes de infección en el ambiente es importante para la toma de medidas de prevención y control que ayudaría a evitar la aparición de nuevos casos en animales y humanos por dicha razón, el objetivo de este estudio es detectar leptospirosis patógenas en muestras ambientales de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega, que puedan contribuir a que la población de esta región se encuentre en una constante exposición al patógeno.

## 1.1 ANTECEDENTES

En Brasil en el año 2010 se detectó la presencia de *Leptospira*, mediante la aplicación de la PCR múltiple amplificando los genes LipL32 y 16SrRNA en muestras de aguas ambientales de una zona periurbana en Petrópolis, Río de Janeiro. De las 100 muestras analizadas resultaron positivas 3, considerándose 2 saprófitas y 1 patógena (15).

En 2013, Francois *et al.*, identificaron la presencia de leptospiras patógenas en fuentes de agua de la ciudad de Casilda, Santa Fe en Argentina. Se aislaron 6 muestras tomadas de fuentes que vierten al canal de la ciudad (todas con un pH mayor a 7,5), resultando 5 positivas y 2 de ellas a través de la PCR se identificaron como patógenas (16).

Romero-Vivas *et al.*, realizaron la caracterización de serovariedades de *Leptospira* aisladas en muestras de animales y agua en Colombia en el año 2013. Encontrando que los aislamientos caracterizados genéticamente de cerdos se relacionaron con *Leptospira Interrogans* de serovariedad Pomona (coeficiente de 84% y 95%), el aislamiento de rata con la serovariedad Icterohaemorrhagiae o Copenhageni (coeficiente de Dice de: 100%); en cambio, los aislamientos de perro y agua no tuvieron relación con ninguna de las 200 cepas de referencia con las que se comparó, siendo las más cercanas *Leptospira noguchii* de serovariedades Nicaragua (coeficiente de Dice: 63 %) y Orleans (coeficiente de Dice: 60%) (17).

En Malasia, Benacer *et al.*, lograron identificar leptospiras saprófitas y patógenas en aguas y suelos de sitios urbanos. Se recolectaron 151 muestras ambientales procedentes de 12 lagos recreacionales y fango de los mercados. El 23.1% de las muestras de agua y el 23.3% de las muestras de suelo resultaron positivas al aislamiento; en cambio la PCR indicó que de los 8 aislamientos considerados puros solamente 2 se confirmaron como patógenos, 5 saprófitos y 1 intermedio (18).

Un estudio en Córdoba, Colombia, Calderón y colaboradores aislaron *Leptospira interrogans* en animales domésticos, roedores y fuentes de agua y determinaron la

seroprevalencia en humanos y animales en 2014. El cultivo se realizó en EMJH, confirmándose la presencia del patógeno a través de la amplificación de PCR del gen lipL32; y se utilizó la prueba de microaglutinación para detectar anticuerpos de 13 serogrupos. La seroprevalencia encontrada fue del 55.9% en cerdos, del 35.2% en perros y del 75.8% en humanos. Además se aislaron 7 cepas de *Leptospira interrogans*, 3 de cerdos, 2 de perros y 2 de agua (19).

Mason *et al.*, estudiaron la diversidad y distribución de especies de leptospirosis en aguas peridomésticas en la región de Los Ríos, Chile, durante octubre del 2010 y abril del 2012. Se recolectaron muestras de agua del entorno peridoméstico de 422 hogares en doce comunidades de tres tipos: granjas, pueblos rurales y barrios marginales urbanos, luego de la identificación de muestras positivas a leptospirosis patógenas a través de la PCR, se amplificó y secuenció su región *secY*. Se encontraron 153 (18.8%) muestras positivas a la PCR, de las cuales a 104 se les realizó el análisis filogenético, encontrando *L. interrogans*, *L. kirschneri*, y *L. weilii*, todas estas especies fueron encontradas en cada tipo de comunidad (20).

En Nicaragua, Flores y colaboradores evaluaron el comportamiento de *Leptospira* spp., en animales domésticos, roedores y aguas cercanos a los casos de leptospirosis humana durante 2007-2015. Mediante la MAT, se identificaron los departamentos de Chinandega, León, Managua y Masaya con los porcentajes más altos de animales positivos; y se determinó la presencia de *Leptospira* en un 10.9% de las muestras de agua (21).

Chávez *et al.*, detectaron *Leptospira* spp. en animales y muestras ambientales de áreas peridomésticas en Nicaragua entre 2014 y 2016. Lograron aislar espiroquetas en un 32.6% (101/310), encontrando diferencias significativas entre los departamentos para los diferentes tipos de muestras y en las muestras ambientales una frecuencia más alta en agua que en tierra. Un 10.2% (9/88) de los aislamientos positivos fueron identificados como leptospirosis patógenas a través de la PCR (22).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis es una enfermedad endémica de Nicaragua desde 1995 (23) y hasta la actualidad han ocurrido grandes brotes que han afectado de manera importante la salud pública de la población y han provocado grandes pérdidas económicas a nivel pecuario.

La variación climática constante unido a las condiciones medioambientales que caracteriza el país han favorecido la frecuencia de casos de esta enfermedad tanto en animales como en humanos. Además, la variabilidad de su sintomatología y las escasas condiciones para realizar las pruebas de referencia dificultan un buen diagnóstico.

Las investigaciones sobre el comportamiento de la *Leptospira* spp. en Nicaragua son esenciales para realizar programas de prevención y vigilancia que puedan contribuir a la disminución de número de casos y al resguardo de la salud pública y sanidad animal.

En ambientes con mucha humedad y un pH ligeramente alcalino las leptospiras pueden sobrevivir durante un tiempo considerable al ser eliminadas por la orina de un animal infectado convirtiendo los suelos y las aguas en fuentes de infección, por ello la leptospirosis se encuentra muy asociada a actividades acuáticas recreativas.

La identificación de fuentes de infección ambientales es esencial para evitar la exposición de animales y humanos susceptibles a la *Leptospira*, con la implementación de medidas sanitarias adecuadas.

Por lo tanto este estudio se realizó con el objetivo de detectar leptospiras patógenas en muestras ambientales de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega; ya que estos dos últimos departamentos han presentado el mayor número de casos y Jinotega se considera un área endémica (23).

### **1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Se encuentran leptospiras patógenas en muestras ambientales de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega, 2017-2018?

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Detectar leptospiras patógenas en muestras ambientales de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega, 2017-2018.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislar *Leptospira* spp. en muestras de agua y tierra de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega.
2. Identificar *Leptospira interrogans* a través de pruebas moleculares en aislamientos positivos de las muestras tomadas de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Leptospirosis**

La leptospirosis es una zoonosis con potencial epidémico y distribución mundial, suele ser endémica en países de climas tropicales y húmedos subtropicales. Se asocia con las condiciones ambientales, actividades agrícolas, ganaderas, mineras y de trabajo en cañerías (1,2).

Afecta a humanos y animales, siendo el hombre un hospedero accidental que adquiere la infección mediante contacto directo de la piel y membranas mucosas con orina, sangre o tejidos de animales contaminados. Indirectamente, puede ser, a través del contacto con agua o suelo húmedo, contaminado por orina de animales infectados (24).

#### **3.2 Etiología**

El género *Leptospira* (del griego lepto = fino y del latín espira = espiral) pertenece a la familia Leptospiraceae y al orden Spirochaetales, que se han diversificado tempranamente en la evolución de las bacterias (25). Posee una variedad genética y serológica considerable ya que consta de 21 especies genómicas, que se han dividido en el grupo infeccioso, el que comprende 9 especies patógenas y 5 patógenas intermedias y el grupo no infeccioso que incluye 6 especies saprófitas y una adicional que la componen serovares patógenos y saprófitos (26,27).

El serovar es la unidad taxonómica básica de las leptospiras que se basa en las diferencias antigénicas, aquellos relacionados antigénicamente se clasifican en un mismo serogrupo. Se han identificado más de 260 serovares patógenos agrupados en 24 serogrupos y 60 serovares saprófitos (5,28).

Las leptospiras tienen forma helicoidal y una apariencia de gancho en uno o en ambos extremos; su longitud aproximada es de 6 a 20  $\mu\text{m}$  con un diámetro de 100 milimicras. Sus dos filamentos axiales que se encuentran en el espacio periplásmico, están constituidos por dos proteínas conocidas como flaA y flaB , y le

confieren un movimiento giratorio que juega un papel importante en su patogenicidad (29,30).

Para la obtención de energía las leptospiras utilizan ácidos grasos de cadena larga, que son metabolizados por  $\beta$ -oxidación y sales de amonio como principal fuente de nitrógeno; a esto se debe su crecimiento tardío que puede alargarse hasta un período de cuatro semanas en medios artificiales enriquecidos (31).

Los medios de cultivo artificiales para leptospiras, están constituidos a base de suero de conejo diluido, agar, peptona, caldos simples y sales; su pH debe oscilar entre 7.2-7.6; para el aislamiento deben mantenerse a una temperatura entre 28-30°C, óptima para el crecimiento y la multiplicación de la bacteria. Para evitar contaminación y hacer el medio más selectivo suelen agregarse antibióticos o intercalantes como el 5-fluorouracil y sulfato de neomicina. Entre los más empleados se encuentran: el medio líquido de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), Fletcher y Korthoff (25,31).

Son bacterias aerobias obligadas, catalasa y oxidasa positivas. Los colorantes a base de anilina no las tiñen sin embargo, técnicas de coloración como giemsa y tinción de plata suelen funcionar (25,32).

Ya que son pequeñas y delgadas, no son visibles al microscopio de luz convencional, por ello requieren microscopía de campo oscuro para su observación. Son muy sensibles a condiciones adversas como la desecación, cambios bruscos de pH y temperatura, debido a esto, su aislamiento requiere condiciones especiales para garantizar un crecimiento satisfactorio (31).

### **3.3 Proteínas de Membrana Externa OMPs**

La estructura de doble membrana de la *Leptospira* spp. al igual que otras espiroquetas, está compuesta por la membrana citoplasmática y la pared celular del peptidoglicano, ambas asociadas y recubiertas por una membrana externa, la cual sirve como barrera de permeabilidad, protegiéndola de condiciones ambientales adversas (29,33).

En la membrana externa se encuentran tres tipos de proteínas (por sus siglas en inglés Outer Membrane Proteins, OMPs): transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas de la membrana (34). Su importancia en el desarrollo de la enfermedad es debido a que funcionan como adhesinas, porinas, receptores para proteínas solubles y proteínas del complemento (35–38).

Las OMPs son altamente inmunógenas debido a que están localizadas en la superficie celular donde interactúan los patógenos bacterianos con el huésped. Además, son objetivos de anticuerpos bactericidas y pueden provocar anticuerpos protectores contra la enfermedad. Por esta razón, el estudio de estas proteínas es de suma importancia para el desarrollo de nuevas técnicas de serodiagnóstico y para la producción de vacunas (39).

Proteínas como OmpL1 (leptospiral outer membrane porin), LipL (leptospiral outer membrane lipoprotein) como LipL21, LipL36, LipL34, LipL41, LipL32 y proteínas Lig (leptospiral immunoglobulin-like proteins) poseen diferentes grados de expresión en la superficie de la bacteria y se encuentran relacionadas con especies patógenas incluyendo la proteína flagelar B (flaB) ubicada en el espacio periplásmico (40,41).

### **3.3.1 OmpL1**

Fue la primera proteína transmembrana descrita en especies patógenas de *Leptospira*. OmpL1 es una porina de superficie, de 31 kDa que se encuentra en pequeñas cantidades, su estructura contiene diez segmentos transmembranales  $\beta$  y canales de porina en la bicapa lipídica, que permiten la difusión de solutos hidrofílicos a través de la membrana externa hacia el periplasma (34,42).

Los diferentes genes que controlan la expresión de esta proteína son ompL1/1, ompL1/2, ompL1/3, cuyas diferencias no afectan su capacidad inmunógena. El gen ompL1 consta de 960 bases que codifican la proteína compuesta por 320 aminoácidos (43,44).

La OmpL1 se encuentra en todas las cepas patógenas de *Leptospira* y está ausente en las cepas saprófitas lo que la convierte en una candidata para la producción de inmunógenos (43).

### **3.3.2 LipL32**

Es una lipoproteína con gran capacidad inmunogénica ya que se encuentra de forma abundante en la superficie de la membrana externa, posee una masa molecular de 26,7 kDa y una movilidad electroforética de 32 kDa (45,46).

Se ha logrado demostrar que la LipL32 es el antígeno dominante durante la respuesta inmune humoral a leptospirosis en humanos, mostrando la mayor sensibilidad y especificidad en pacientes con la enfermedad en fase aguda o convaleciente (47,48).

El gen que codifica esta proteína fue detectada en seis cepas de *Leptospira*, incluyendo cinco de *Leptospira Interrogans* y una de *Leptospira borgpetersenii*, lo cual indica que la LipL32 recombinante es un candidato óptimo como antígeno molecular para el diagnóstico sérico (47,49).

### **3.3.2 Lig (Proteínas leptospirales similar a las inmunoglobulinas)**

Las proteínas similares a las inmunoglobulinas o Lig (LigA, LigB y LigC), actúan como moléculas de adhesión y solo se expresan in vivo. LigA es una proteína altamente inmunogénica y se expresa en la infección por *Leptospira* en equinos. Se considera como blanco para la producción de vacunas y como base para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico para identificar animales vacunados y animales infectados (50).

## **3.4 Epidemiología**

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial, considerada una enfermedad emergente y de carácter estacional. Es endémica en poblaciones urbanas y rurales con climas tropicales y subtropicales, donde la cantidad de brotes epidémicos aumenta durante las temporadas de lluvias fuertes e inundaciones; por lo que está asociada con eventos climáticos extremos (51).

Las condiciones laborales y de vida deficientes además de una escasa higiene en poblaciones que habitan en zonas donde existe una presencia significativa de

reservorios y una variación climática constante están relacionadas con el aumento de la prevalencia e incidencia de la leptospirosis (52).

### **3.4.1 Reservorios**

La *Leptospira* patógena se aloja en los túbulos renales de una gran variedad de mamíferos salvajes y domésticos que constituyen a los portadores, quienes excretan la bacteria a través de su orina contaminando el ambiente; manteniendo así un ciclo zoonótico, debido a que la exposición de la piel o mucosas a orina infectada o aguas y suelos contaminados es una de las vías de transmisión más frecuentes (29,53).

Los huéspedes o reservorios de las leptospiras contribuyen en gran medida al mantenimiento de esta y los conforman aquellas especies animales infectadas crónicamente en los túbulos renales proximales, a las cuales les causan poco o ningún daño (5,54).

Esta bacteria contiene un amplio rango de huéspedes animales manteniéndose especialmente en mamíferos domésticos y silvestres (más de 160 especies diferentes) (29,54). También se ha encontrado en reptiles, aves y anfibios (55).

Los roedores son los reservorios naturales de mayor importancia en el ciclo de transmisión de la *Leptospira*, los géneros sinantrópicos *Rattus* y *Mus* son los principales diseminadores (56,57). Las espiroquetas y esta especie de animales poseen una relación comensal ya que los roedores transfieren la bacteria a sus crías en el útero, asegurando así la diseminación de serovares patógenos en áreas geográficas determinadas sin la presencia de un hospedero accidental involucrado (54,55).

Las ratas son los huéspedes de mantenimiento de las serovariedades Icterohaeomorrhagiae y Copenhageni; ratones de Arborea, Ballum y Bin; ganado vacuno de Pomona, Hardjo y Grippytyphosa; cerdos de Pomona, Tarassovi y Bratislava; perros de Canicola y marsupiales de Grippythyphosa (5,54).

Animales que actúan como huéspedes de mantenimiento de unas serovariedades también pueden ser anfitriones incidentales para otros serogrupos y sufrir la enfermedad, presentando síntomas clínicos que dependen de la cepa infectante, la ubicación geográfica y la respuesta inmune del huésped. El humano es un huésped accidental que puede excretar la bacteria hasta seis semanas después de recuperado de la infección, sin embargo, aún no se han reportado casos de infección de persona a persona (58,59).

### **3.4.2 Mecanismos de transmisión**

Las vías de transmisión de las leptospiras ocurren por contacto directo con orina y tejidos de animales infectados y de forma indirecta a través de la exposición de heridas o piel intacta a ambientes contaminados (agua y suelo). Pueden pasar de un animal portador a otro, dependiendo la cercanía inmediata del portador que elimina la espiroqueta por la orina (10,25).

Condiciones ecológicas como la humedad, un pH cercano a la neutralidad y una temperatura entre 28 y 30°C son idóneas para la sobrevivencia de leptospiras patógenas; sin embargo, su multiplicación es favorecida por altas temperaturas; pudiendo así sobrevivir en el agua durante 22 días y en el barro de 5-6 días. En áreas húmedas, grandes fuentes de agua como ríos y agua estancada constituyen fuentes de infección importantes para humanos y animales (25,60).

### **3.5 Patogenia**

La *Leptospira* ingresa al organismo a través de las mucosas (en especial la conjuntival y vaginal) o por pequeñas heridas y laceraciones de la piel, invadiendo así el torrente sanguíneo y diseminándose a todos los órganos incluyendo al sistema nervioso central y el humor acuoso; con un período de incubación de 7 a 26 días (61,62).

La producción de hialuronidasa y la capacidad de movimiento le permite penetrar los tejidos; mostrando tropismo por las células de los epitelios de los túbulos renales y de ciertos tramos de tracto genital. En estas zonas se multiplican de forma

acelerada y se eliminan por la orina y las descargas vaginales tras el parto o el aborto (63).

Estos mecanismos patológicos suelen ser comunes en la mayoría de las infecciones por *Leptospira*, sin embargo, al igual que las manifestaciones clínicas pueden variar según la serovariedad infectante y la relación de esta con el hospedador. Por lo cual, la leptospirosis puede presentarse desde un cuadro febril inespecífico hasta una enfermedad grave de compromiso multiorgánico (63,64).

Después de una semana en la que prevalece la etapa septicémica, empieza la producción de anticuerpos y la eliminación de la bacteria por la orina, constituyéndose así una fase inmune provocando complicaciones patológicas debido a la localización de la *Leptospira* en los tejidos (54).

### **3.6 Manifestaciones Clínicas**

#### **3.6.1 Perros**

La infección puede presentarse de manera asintomática o con un cuadro clínico grave, caracterizado por síntomas como fiebre (3-4 días), rigidez y hemorragia en la cavidad bucal con tendencia a la necrosis y faringitis, que puede evolucionar a gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda.

#### **3.6.2 Equinos**

En la mayoría de los casos presentan una fase aguda febril, sin embargo se pueden observar síndromes hepatonefriticos y cardiovasculares. Consecuente a la fase aguda se instala un período de latencia que dura varios meses y que provoca una oftalmía periódica como única secuela.

#### **3.6.3 Ovinos y Caprinos**

La enfermedad suele ser febril y en algunos casos presentan ictericia, hemoglobinuria, anemia, abortos, neonatos muertos o infertilidad. La gravedad del cuadro clínico dependerá de la virulencia del serovar infectante.

### **3.6.4 Porcinos**

Pueden presentar ictericia, hemoglobinuria, convulsiones, y trastornos gastrointestinales, signos neurológicos y meningitis. Además de problemas reproductivos, como presencia de lechones débiles o con retardo del crecimiento y abortos que aparecen entre los 15-30 días post infección principalmente si esta se produjo en el último tercio de gestación. En general, el cuadro clínico puede variar presentándose de manera subclínica o febril.

### **3.6.5 Bovinos**

La infección puede presentarse de manera aguda, subaguda o clínicamente inaparente. Los síntomas clínicos más frecuentes son fiebre (4-5 días), anorexia conjuntivitis, diarrea, abortos y hemoglobinuria. En vacas provoca disminución de la producción láctea, mastitis atípica (ubre flácida, leche amarillenta, viscosa y a veces teñida con sangre), infertilidad y en casos graves ictericia. La susceptibilidad suele ser mayor en terneros (65).

## **3.7 Diagnóstico**

La epidemiología, la amplia gama de huéspedes susceptibles y reservorios y las diversas manifestaciones clínicas hacen que el diagnóstico de esta enfermedad tenga ciertas dificultades. Por lo cual un diagnóstico basado en la clínica debe ser confirmado mediante pruebas de laboratorio (66).

El diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis se realiza por dos métodos, el directo a través de la identificación de la *Leptospira*, de sus antígenos o ácidos nucleicos a partir de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, orina y tejidos de animales y el indirecto que revela el aumento del título de anticuerpos antileptospiras (29,67).

### **3.7.1 Cultivo**

Las muestras para aislar *Leptospira* pueden ser sangre y líquido cefalorraquídeo de los primeros 7-10 días de la enfermedad y orina desde la segunda y tercera semana. También se aíslan de suelos húmedos y aguas con abundante sombra. Tomada la

muestra debe ser inoculada en 10 ml de medio semisólido que contenga 5- fluoracilo (5,54).

El medio de cultivo líquido es positivo cuando presenta turbidez homogénea y si es un medio semisólido las leptospiras crecerán formando un anillo debajo de la superficie aproximadamente 0,5 a 1 cm de largo (23).

Los cultivos se incuban a una temperatura de 28-30 °C y deben ser examinados cada 7 días por 16 semanas a través de microscopia de campo oscuro que es la técnica de observación directa de leptospiras más efectiva. Aquellos cultivos que se encuentren contaminados pueden ser filtrados antes de recultivarlos a un medio nuevo.

Los medios de cultivos utilizados para el aislamiento de leptospiras son Stuart, Vervoort, Tween 80-albúmina, Fletcher, Korthof y EMJH (Ellinghausen y McIlough, modificado por Johnson y Harriesf), siendo los últimos tres los más comunes (68).

El cultivo de *Leptospira* es un proceso de larga duración y requiere de personal capacitado y de laboratorios de referencia especializados; sin embargo es uno de los métodos más específicos de demostración de su presencia (69).

### **3.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Es un método in vitro de síntesis de ADN, en el que se amplifica un segmento específico de este al ser delimitado por un par de cebadores. Las copias se logran obtener a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima, ADN polimerasa termoestable que incorpora nucleótidos complementarios dando origen a una nueva hebra de ADN del segmento en específico. De esta manera se puede obtener millones de copias de la secuencia deseada del ADN en algunas horas (70).

El fundamento de esta técnica se basa en la realización de tres reacciones sucesivas realizadas en distintas temperaturas por un tiempo determinado, repitiéndose cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. En la primera reacción se extrae el ADN aumentando la temperatura hasta lograr la separación de las dos

cadena que constituyen el ADN, a esto se le conoce como desnaturalización. Posteriormente, ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores, a una temperatura que facilita la unión de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs. Por último, ocurre la extensión, que se lleva a cabo a una temperatura media, en este proceso la ADN polimerasa copia el ADN entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos cebadores. La lectura de resultados se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La PCR es una prueba molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil, que detecta cantidades ínfimas de ADN específico, posibilitando su fácil identificación. En la detección e identificación de *Leptospira* spp. se ha convertido en una herramienta de diagnóstico sensible y específica, ya que se han desarrollado PCR en muestras biológicas como orina, suero, líquido cefalorraquídeo y tejido renal. Una limitación del diagnóstico de leptospirosis basado en la PCR es incapacidad de la mayoría de los ensayos de PCR para identificar el serovar infectante lo cual es de importancia a nivel epidemiológico y en salud pública (70,71).

## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

### **4.1 Tipo de estudio**

Descriptivo de corte Transversal.

### **4.2 Área de estudio**

El origen de las muestras corresponde a viviendas de casos de leptospirosis humana reportados por el Ministerio de Salud (MINSA) pertenecientes a los departamentos de Jinotega (Región Norte), León y Chinandega (Región Pacífico) durante enero del año 2017 y enero del 2018.

El departamento de Jinotega pertenece a la región norte del país caracterizada por ser la más alta y por su clima templado lluvioso, presentando precipitaciones anuales de 800 a 2500 mm. La temperatura media de este departamento es de 20.7°C y posee una humedad relativa de 80%.

León y Chinandega en cambio, ubicados en la región del Pacífico presentan un clima tropical de sabana, predominando los días cálidos con temperaturas medias superiores a 34°C y con una humedad relativa que oscila entre los 64 y 70 %. Posee una estación seca muy marcada que comprende los meses entre diciembre y abril y la lluviosa de mayo a noviembre, la cual causa una precipitación media anual de 1000 a 2000 mm. Debido a la presencia de cuencas subterráneas y a su composición volcánica los suelos de esta región se consideran los más fértiles de todo el país (72).

### **4.3 Población de estudio**

Muestras ambientales (agua y tierra) recolectadas de viviendas con casos confirmados de leptospirosis humana por el ministerio de salud (MINSA) y de ríos que funcionan como recreativos cercanos a los focos.

### **4.4 Tamaño de la muestra**

Se recolectaron en total 120 muestras ambientales de las cuales 78 son de fuentes de agua y 42 de tierra.

#### **4.5 Selección de muestras**

La selección de las muestras se realizó por conveniencia (muestreo no probabilístico por conveniencia), en 67 casos de leptospirosis humana reportados por el Ministerio de Salud (MINSA) durante enero 2017 y enero 2018.

##### **4.5.1 Muestreo de ríos**

La elección de los ríos y sus zonas específicas se realizaron de acuerdo a su ubicación en áreas donde se presentaron focos de leptospirosis humana y según su utilidad para actividades recreativas en meses de época seca.

Se recolectaron al menos dos muestras por río (1 de agua y 1 de tierra), de las riberas en lugares sombreados. Sin embargo, en el caso del río Telica en el municipio de Quezalguaque, departamento de León; como parte de las acciones que realiza el MINSA para la prevención y control de leptospirosis humana, se muestrearon cuatro áreas distintas en la trayectoria del río, que suelen ser concurridas en los meses de época seca por los pobladores para su recreación.

En cada área se recolectaron cuatro muestras de agua y tierra de diferentes lugares en la ribera con abundante sombra y donde se evidenció la presencia de animales; además se procedió a tomar niveles de temperatura y pH del agua.

#### **4.6 Factores de inclusión**

Fuentes de agua y muestras de tierra ubicadas dentro y en los alrededores de viviendas con casos confirmados de leptospirosis y que estuvieran vinculadas con la presencia de animales y humanos.

Ríos que funcionen como recreativos en época seca y que se encuentren ubicados en zonas donde se hayan reportado focos de leptospirosis humana.

#### **4.7 Toma y envío de muestras**

##### **4.7.1 Agua**

Las muestras de agua se recolectaron de ríos, charcos, pozos, pilas y recipientes de almacenamiento para consumo de las viviendas con una profundidad mínima; en el caso de los ríos se seleccionaron lugares sombreado en los que no incidieran

directamente los rayos solares. Luego fueron inoculadas de 2-3 gotas de la muestra en tubos de ensayo con medio de cultivo líquido EMJH+5 Fluorouracilo para su aislamiento.

#### **4.7.2 Tierra**

Los lugares para la recolección de las muestras de tierra fueron suelos húmedos donde se evidenciara la presencia de animales como corrales, chiqueros, en el caso de los ríos en partes de las riberas con abundante sombra. Estas muestras fueron transportadas a temperatura ambiente en tubos cónicos de 50 ml al Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI) de la escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria UNAN-León.

#### **4.8 Proceso de muestras de tierra**

En el laboratorio se pesaron 3 gramos de cada muestra de tierra debidamente identificada y se colocaron en tubos cónicos estériles de 15 ml a los cuales se le agregó 10ml de agua destilada estéril, se mezcló hasta disolver completamente y se mantuvo en posición vertical durante una hora. Posteriormente se agregó 1ml del sobrenadante de la muestra a 3ml de EMJH+5 Fluorouracilo para su aislamiento y se incubó a una temperatura de 28-30 °C

#### **4.9 Análisis de las muestras**

##### **4.9.1 Aislamientos**

Los aislamientos fueron incubados a una temperatura de 28-30°C y se revisaron semanalmente en microscopia de campo oscuro debido a que las leptospiras son demasiado delgadas y pequeñas para observarse en microscopio de luz convencional. Aquellas muestras en las que se observó un crecimiento considerable se consideraron positivas.

##### **4.9.2 Extracción de ADN**

Para realizar la extracción de ADN se utilizaron las muestras que resultaron positivas al aislamiento y que contenían abundante cantidad de espiroquetas. Se utilizó el método de calentamiento; que consistió en la realización de dos lavados y en la aplicación de calor.

Se depositó 1ml del cultivo en un microtubo de 1.5 ml, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 500µm de agua libre de nucleasa, se mezcló en vortex durante 10 segundos y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad por 10 minutos. Luego de descartar el sobrenadante se agregó 200 µm de agua libre de nucleasa, para luego mezclarse en vortex por 10 segundos y ser sometido por 20 minutos a una temperatura de 90 a 100 °C. El resultado fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

### **4.9.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **4.9.3.1 Cebadores**

Se utilizaron 4 tipos de cebadores, 3 de ellos dirigidos a genes que codifican lipoproteínas (Lfb1, LipL32 y LipL41) y el cuarto dirigido a una proteína flagelar (flaB).

#### **4.9.3.2 Componentes y Mezcla**

Para la amplificación se utilizaron los siguientes componentes:

- ✓ PCR-Master Mix 2x: que contiene la enzima Taq Polimerasa, los desoxirribonucleicos trifosfatados y Cloruro de Magnesio ( $MgCl^2$ ) como cofactor.
- ✓ Cebadores: Forward o sentido y Reward o anti sentido.
- ✓ Agua ( $H_2O$ ) libre de nucleasas.
- ✓ ADN de las muestras.

**Tabla 1. Cálculo del volumen de cada componente para la realización de la mezcla.**

<b>Elemento</b>	<b>Cantidad por muestra (µl)</b>	<b>Cantidad para 10 muestras(µl)</b>
Master Mix	6	60
H2O libre de nucleasas	3	30
Cebador Forward	0.5	5
Cebador Reward	0.5	5
ADN	2.5	-
Vol. Final	12.5	125

#### **4.9.3.3 Protocolo de Amplificación**

Las condiciones de temperatura que se utilizó en el termociclador para realizar la amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C en 1 minuto; culminando con una elongación de 72°C en 7 minutos.

#### **4.9.3.4 Lectura**

Para la lectura del producto obtenido se realizó electroforesis en gel agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, que al observarse en el transluminador de UV evidenció las muestras amplificadas según la cantidad de pares de base que contenía. Se consideró un resultado positivo aquellas muestras que amplificaron la cantidad de pares de bases correspondiente al cualquiera de los cebadores utilizados.

#### **4.9.3.5 Análisis estadísticos**

Se calcularon las frecuencias relativas con sus respectivos IC95% y se utilizaron tablas de contingencias para el cruce de variables categóricas, además se calculó la significancia mediante la prueba exacta de Fisher. Los datos fueron almacenados y analizados en SPSS versión 21.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Aislamientos**

En el aislamiento se obtuvieron 73 muestras positivas de 120 analizadas, proporcionando una frecuencia de positivos del 60.83% (IC95%= 51.68-69.98).

Al analizar las muestras por separado, se encontró que las de agua presentaron una mayor frecuencia con un 67.9% (53/78) en comparación con las de tierra con 47.6% (20/42) mostrando una diferencia significativa de acuerdo a un valor de  $p=0.03$  (Gráfica 1).

La variación encontrada de los aislamientos positivos en los departamentos presentó una diferencia significativa ( $p=0.03$ ), revelando que la frecuencia más alta se encontró en el departamento de León con 70.3% (26/37), seguido de Chinandega con 67.4% (31/46), Jinotega en cambio obtuvo el menor porcentaje de muestras positivas 43.2% (16/37) (Gráfica 2).

Las muestras de agua que fueron recolectadas de charcos mostraron una frecuencia de positivos al aislamiento del 100% (3/3), las de pozos de 81.8% (9/11), la almacenada en hogares de 71.4% (10/14) y las de ríos un 61.5% (16/26). Del total de 78 muestras, 24 no fueron incluidas en este análisis debido a la falta de información sobre el lugar específico donde fue tomada la muestra (Gráfica 3).

Por otro lado, las muestras de tierra que fueron recolectadas de ríos y charcos presentaron la misma frecuencia de positivos con un 66.7% (4/6 y 10/15 respectivamente), las de corrales mostraron un 50% (1/2) y las de patio un 33.3% (1/3). En 16 muestras de tierra no se realizó este análisis por falta de información sobre su procedencia (Gráfica 4).

En el mes de octubre se obtuvo una mayor frecuencia de muestras positivas en el aislamiento con un 74.4% (32/43), mientras que en noviembre se obtuvo un 30.6% (6/20) de positividad ( $p=0.030$ ). En muestras de agua, se observó una alta frecuencia de positivos en el mes de octubre (23/27), mientras que, en muestras de tierra, la frecuencia más alta se observó en abril (7/10).

En el año 2017 se obtuvo una frecuencia de aislamientos totales de 60% (63/105) y en el 2018 la positividad fue de un 66.7% (10/15), no observándose diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ).

## **5.2 PCR**

En la PCR se obtuvieron 6 resultados positivos, 4 en muestras de agua (2 de agua almacenada y 2 de ríos) y 2 en muestras de tierra (1 de charco y 1 de corral), las cuales amplificaron con los cebadores flaB (793 pb) y Lfb1 (331 pb) específicos para *Leptospira* patógena, encontrando una prevalencia de 8.21 (IC95%= 1.23-15.20).

Los departamentos que presentaron muestras identificadas con *Leptospira* patógena fueron León y Chinandega con una frecuencia de 15.4% (4/6) y 6.5% (2/31) respectivamente.

## **5.3 Ríos**

En las muestras de agua tomadas de ríos se encontró una frecuencia de positivos al aislamiento de 61.5% (16/26) y en tierra de ríos el 66.7% (4/6) de las muestras se obtuvo crecimiento. En cambio, los resultados en la PCR revelaron que las muestras de agua tenían una frecuencia de positivos de 12.5% (2/16) y en las de tierra no se obtuvieron muestras positivas.

Las muestras de agua que fueron identificadas con leptospiras patógenas pertenecen a dos de las cuatro áreas (Punto B-Poza de la Estación y Punto C-Florencia) muestreadas del río Telica, ubicado en el municipio de Quezalguaque, departamento de León (Figura 4).

La variación encontrada en los niveles de temperatura y pH del agua, no mostraron una asociación con los resultados obtenidos en aislamientos y en la PCR, revelando que  $p \geq 0.05$ .

## 6. DISCUSIÓN

La presencia de leptospiras patógenas se ha evidenciado en diferentes fuentes de agua y tipos de suelos, identificándose como factores de riesgo potenciales en áreas rurales y urbanas en varias partes del mundo. En este estudio se analizaron muestras ambientales de ríos y zonas periurbanas de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega, para determinar la presencia de leptospiras patógenas. De acuerdo al aislamiento un 60.8% (73/120) de las muestras en general resultaron positivas, de las muestras de agua se obtuvo el 67.9% (53/78) y de las de tierra el 47.6% (20/42) de positivos; a diferencia con el estudio realizado por Benacer *et al.*, en el 2013 quienes encontraron frecuencias más bajas en aguas y suelos de sitios urbanos en Malasia, con el 23.1% (28/121) y el 23.3% (7/30) respectivamente (18). Esta discrepancia se debe a que las muestras analizadas en este estudio proceden de zonas consideradas críticas y endémicas, donde se han reportado un gran número de casos de leptospirosis humana durante los brotes que ha presentado Nicaragua desde 1995.

En la actualidad las zonas urbanas se consideran de mayor riesgo al presentar concentraciones más altas de leptospiras patógenas en aguas superficiales en comparación con las áreas rurales (73). Por ello los resultados del aislamiento en este estudio son más elevados que los de Ridzlan *et al.*, quienes lograron aislar leptospiras patógenas en áreas rurales de Malasia, en un 10.26% (12/117) de las muestras de agua y 10.71% (3/28) de muestras de tierra (74).

En los resultados del aislamiento por departamento, se encontró que León obtuvo la frecuencia más alta de muestras positivas con 70.3% (26/37), seguido de Chinandega con 67.4% (31/46). Flores *et al.*, encontraron resultados similares, al revelar que los departamentos de León y Chinandega obtuvieron altos porcentajes de positividad al aislamiento en muestras de animales domésticos y roedores durante el período 2007-2013 (21), otros estudios también muestran similitud al identificar que estos departamentos presentan el mayor número de casos de

leptospirosis humana en el país (23). Estos datos sugieren que en esta región existen los factores idóneos para que el ciclo de la *Leptospira* se realice con efectividad, al tener la presencia de reservorios que aseguren su mantenimiento en el medio ambiente, por tal razón es importante implementar medidas que identifiquen animales infectados y fuentes de agua y suelo contaminados, que representen zonas de riesgo y exposición de la bacteria a la población en general.

En los aislamientos de muestras de agua, se obtuvo porcentajes altos en aquellos provenientes de pozos con un 81.8% (9/11) y del interior de hogares con 71.4% (10/14). Estos resultados están relacionados con la presencia de animales domésticos y roedores en la zona indicando una contaminación intradomiciliar. Estudios como el de García *et al.*, realizado en uno de los asentamientos de la ciudad de Guatemala en 2013, encontraron que las amas de casa obtuvieron el mayor porcentaje de anticuerpos anti-*Leptospira* (69.4%) (75). Zelaya *et al.*, también encontraron que el grupo de amas de casa presentó el mayor número de casos de Leptospirosis en la aldea El Milagro, Escuintla, Guatemala en 2008; además de hallar una alta reactividad en caninos (58%) y en suinos (30%) de la misma localidad (76). Estos hallazgos demuestran que la presencia de animales o roedores en entornos domésticos representan un factor de riesgo al contaminar las fuentes de agua o suelos con orina infectada, exponiendo así a la población de manera directa con la bacteria.

En el análisis de las muestras de tierra, se encontró que las muestras obtenidas de los ríos y de los charcos fueron los de mayor positividad con 4/6 y 10/15 respectivamente, esto está relacionado con la existencia de animales de producción como bovinos, con infección crónica, en zonas cercanas a las riberas de ríos que expulsan la bacteria en el medio ambiente. Además, el tipo de suelo de origen ígneo geológico de las zonas estudiadas y los niveles de humedad generados por las precipitaciones en los meses de época lluviosa propician condiciones altamente favorables para la conservación de la *Leptospira*. Estudios como el de Benecer *et al.*, lograron aislar leptospiras en suelos con un 23,3%, un porcentaje bajo en comparación con este estudio, esto se debe a que los suelos estudiados por

Benacer *et al.*, eran tipo arenoso y marga los cuales poseen poca capacidad de retención de agua (18).

Los resultados de los aislamientos presentes en este estudio nos indican que ríos, la tierra y las fuentes de agua de consumo que utiliza la población podrían ser factores de riesgo y exposición a la bacteria, sin embargo el cultivo de ésta, además de requerir mucho tiempo y ser laborioso, es poco específico ya que las especies saprofitas que predominan en el ambiente son morfológicamente similares a las patógenas (73). Por tal razón, se realizó la PCR convencional para confirmar la patogenicidad de los aislados obtenidos, encontrando un porcentaje de positivos del 8.2% (6/73) que amplificaron los cebadores dirigidos al gen *flaB* y al *Lfb1* específicos para *Leptospira* patógena.

Estudios similares también han logrado identificar este patógeno a través de la PCR, como el de Saito *et al.*, en Filipinas 2013, quienes detectaron leptospiras patógenas dirigidas al gen *flaB* en 11 muestras de suelos de zonas costeras realizando la PCR anidada (77) y el de Latifah *et al.*, en 2017 que identificaron el patógeno con una PCR convencional con el gen *LipI32* en aislamientos de orina de ratas silvestres (78). Esta técnica resulta ser muy efectiva para la confirmación de la enfermedad en animales y humanos como en la identificación del agente en muestras ambientales, por lo cual se debe promover su uso en futuros estudios y como diagnóstico rápido de leptospirosis.

En este estudio, se analizaron muestras que proceden de ríos cercanos a focos de leptospirosis humana y que funcionan para actividades recreativas, en muestras de agua de estos ríos se encontró un porcentaje de positivos al aislamiento de 61.5% (16/26) mientras que las muestras de tierra la positividad fue de 66.7% (4/6). Además, se lograron identificar 2 muestras de agua positivas a *Leptospira* patógena a través de la PCR, pertenecientes al río Telica en el departamento de León. En este mismo departamento en el año 2008, se identificó la presencia de leptospiras patógenas en el río La leona, lugar que en época seca también es utilizado por la población aledaña para actividades de recreación (79). Estos hallazgos confirman que las actividades recreacionales acuáticas en esta región representan un factor

de riesgo importante para la población, por lo cual el monitoreo de estos ríos debe realizarse de manera constante y exhaustiva para la prevención y control de nuevos brotes de leptospirosis.

En 2016 se realizó un estudio que aisló leptospiras patógenas de una quebrada en Tailandia llevando a cabo un muestreo dividido en varios puntos, cada uno en 1.5 km a lo largo de la ruta de la quebrada, monitoreando niveles de temperatura y pH del agua (80), similar al que se realizó en este estudio en el río Telica, en el cual se seleccionaron cuatro puntos a lo largo de su trayecto para la recolección de muestras y monitoreo de pH y temperatura del agua. En ambos estudios se logró aislar leptospiras patógenas, por lo cual este sistema de muestreo para el análisis de muestras ambientales de ríos es efectivo y más sensible porque permite tener diversas perspectivas de la zona.

## **7. CONCLUSIONES**

1. Se obtuvo una frecuencia alta de aislamientos de *Leptospira* spp. en muestras de agua y tierra de los departamentos de Jinotega, León y Chinandega.
2. Se identificó *Leptospira interrogans* en muestras de agua y tierra de los alrededores de las viviendas donde se habían reportados casos de leptospirosis humana.
3. Se identificó *Leptospira interrogans* en muestras de agua del río Telica del departamento de León, que es utilizado por la población para la recreación; lo cual indica que las actividades recreativas acuáticas en este río representan un factor de riesgo y exposición a la bacteria.

## **8. RECOMENDACIONES**

- Educar a la población en riesgo, sobre el comportamiento de la leptospiras en el medio ambiente y el papel que juegan los animales domésticos en su transmisión.
- Elaborar estudios en ríos utilizados para actividades recreativas que se ubican en zonas con prevalencias altas de leptospirosis, aplicando un muestreo en diferentes puntos de su trayectoria.
- Realizar la caracterización molecular de aislamientos positivos a *Leptospira* patógena en muestras ambientales y relacionarlas con aislados de animales y humanos, para comprender el comportamiento epidemiológico de la bacteria.
- Reforzar las actividades de prevención y control de la leptospirosis a nivel nacional; promoviendo actividades de higienización y desratización en las áreas más críticas.
- Realizar un monitoreo en animales domésticos que frecuenten las zonas del río Telica que fueron identificadas con *Leptospira* patógena.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Organization WH. Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. 2010 [citado 20 de agosto de 2017]; Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44382>
2. Gil A, Samartino L. Zoonoses en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. 1 de enero de 2001;
3. Vanasco NB, Sequeira G, Fontana D, L M, Fusco S, Sequeira MD, et al. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. Rev Panam Salud Pública. enero de 2000;7:35-40.
4. Álvarez L, Ángel M, Cervantes M y, Pedro L, Gavaldón Rosas D, Nava Vasquez C, et al. Estudio retrospectivo de seroprevalencia de leptospirosis bovina en México considerando las regiones ecológicas. Rev Cubana Med Trop. abril de 2005;57(1):28-31.
5. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. diciembre de 2003;3(12):757-71.
6. Matthias MA, Díaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR, Pacheco V, et al. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. Am J Trop Med Hyg. noviembre de 2005;73(5):964-74.
7. Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, et al. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. Eur J Epidemiol. enero de 2000;16(1):79-86.

8. Lilenbaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, et al. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci.* agosto de 2009;87(1):16-9.
9. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editores. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2010. p. 527-47. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470958209.ch28/summary>
10. Greene CE. *Enfermedades infecciosas del Perro y el gato* V.1. 3a ed. Buenos Aires: Inter-Médica; 2008. 731 Vol.1.
11. Sanchez JD. *Leptospirosis (información detallada)* | OPS OMS [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2012 [citado 20 de agosto de 2017]. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=7377%3A2012-leptospirosis-informacion-detallada&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&Itemid=39617&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7377%3A2012-leptospirosis-informacion-detallada&catid=4784%3Aleptospirosis-contents&Itemid=39617&lang=es)
12. Reller ME, Wunder EA, Miles JJ, Flom JE, Mayorga O, Woods CW, et al. Unsuspected Leptospirosis Is a Cause of Acute Febrile Illness in Nicaragua. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 24 de julio de 2014;8(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109853/>
13. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* julio de 2008;12(4):351-7.
14. Fernández LAR, Ndez, Santiesteban NB, Arrebola DFA, B&#225, Vald&#233rbara Y, et al. Efficacy of Leptospiral vaccine (vax-SPIRAL&#174;) against challenge with strains isolated from leptospirosis epidemic in Nicaragua using the hamster as biomodel. *Vet World* [Internet]. 2012 [citado 15 de marzo de

- 2018]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012067748>
15. Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Oliveira FS de, Costa AD de S, Hillen L, Pereira MM. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. mayo de 2010;105(3):353-5.
  16. Francois Barbagelata S, Brihuega Fernández B, Grune Löffler S, Gattarello Marcos V, Correa Pérez D, Petrakovsky Melillo J, et al. Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. junio de 2013 [citado 10 de septiembre de 2018];65(2):177-84. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0375-07602013000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602013000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  17. Romero-Vivas CM, Thiry D, Rodríguez V, Calderón A, Arrieta G, Máttar S, et al. Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. (English). *Caracterización Mol Serovariedades Leptospira Spp Aisl Muestras Anim Agua En Colomb Span*. julio de 2013;33(Supp 1):179-84.
  18. Benacer D, Woh PY, Mohd Zain SN, Amran F, Thong KL. Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. *Microbes Environ*. marzo de 2013;28(1):135-40.
  19. Calderón A, Rodríguez V, Máttar S, Arrieta G. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod*. febrero de 2014;46(2):427-32.
  20. Mason MR, Encina C, Sreevatsan S, Muñoz-Zanzi C. Distribution and Diversity of Pathogenic *Leptospira* Species in Peri-domestic Surface Waters from South Central Chile. *PLoS Negl Trop Dis*. agosto de 2016;10(8):e0004895.

21. Flores BJ, Pérez-Sánchez T, Fuertes H, Sheleby-Elías J, Múzquiz JL, Jirón W, et al. A cross-sectional epidemiological study of domestic animals related to human leptospirosis cases in Nicaragua. *Acta Trop.* junio de 2017;170:79-84.
22. Detección de *Leptospira* spp. en animales y muestras ambientales de áreas peridomésticas en Nicaragua - Dimensiones [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1101881847>
23. 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.* noviembre de 2012;9(11):3883-910.
24. Torres VAL. *Leptospirosis: modulo tecnico.* Lima, Perú: Peru. Ministerio de Salud; 2000. 59 p.
25. Faine S, Adler B, Bolin, C., Perolat, P. *Leptospira and leptospirosis.* 2nd ed. Melbourne: MediSci; 1999. 272 p.
26. Levett PN. Systematics of leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;387:11-20.
27. Saito M, Villanueva SYAM, Kawamura Y, Iida K, Tomida J, Kanemaru T, et al. *Leptospira idonei* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol.* julio de 2013;63(Pt 7):2457-62.
28. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* abril de 1999;49 Pt 2:839-58.

29. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 27 de enero de 2010;140(3-4):287-96.
30. 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.
31. Jawetz E, Melnick, J., Adelnerg, E. *Microbiología médica. El Manual Moderno*; 1990. 617 p.
32. Sánchez, E. DETECCIÓN DE LEPTOSPIRA PATÓGENA EN ORINA DE PACIENTES CRÓNICOS Y PERROS MEDIANTE PCR EN EL VALLE DEL CAUCA. ELIANA SÁNCHEZ ARTURO - Reviews - We Share Success [Internet]. DocumentSlide.Org. 2011 [citado 1 de abril de 2018]. Disponible en: <https://documentslide.org/deteccion-de-leptospira-patogena-en-orina-de-pacientes-cronicos-y-perros-mediante-pcr-en-el-valle-del-cauca-eliana-sanchez-arturo>
33. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun.* marzo de 1991;59(3):1131-40.
34. Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the *Leptospiral* Outer Membrane and Description of Three Novel *Leptospiral* Membrane Proteins. *Infect Immun.* septiembre de 2002;70(9):4936-45.
35. Bessen D, Gotschlich EC. Interactions of gonococci with HeLa cells: attachment, detachment, replication, penetration, and the role of protein II. *Infect Immun.* octubre de 1986;54(1):154-60.
36. Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F. The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol Microbiol.* septiembre de 1991;5(9):2153-64.

37. Stoebner JA, Payne SM. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* noviembre de 1988;56(11):2891-5.
38. Hoffman PS, Ripley M, Weeratna R. Cloning and nucleotide sequence of a gene (ompS) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol.* febrero de 1992;174(3):914-20.
39. Sansonetti PJ. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. *Rev Infect Dis.* abril de 1991;13 Suppl 4:S285-292.
40. Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SY, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol Immunol.* 2001;45(6):491-6.
41. Lin M, Surujballi O, Nielsen K, Nadin-Davis S, Randall G. Identification of a 35-kilodalton serovar-cross-reactive flagellar protein, FlaB, from *Leptospira interrogans* by N-terminal sequencing, gene cloning, and sequence analysis. *Infect Immun.* octubre de 1997;65(10):4355-9.
42. Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun.* agosto de 1995;63(8):3174-81.
43. 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.* 17 de diciembre de 2008;8:223.
44. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol.* julio de 1993;175(13):4225-34.

45. Zuerner RL, Knudtson W, Bolin CA, Trueba G. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *Microb Pathog.* abril de 1991;10(4):311-22.
46. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* abril de 2000;68(4):2276-85.
47. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* septiembre de 2001;39(9):3303-10.
48. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis M, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* agosto de 2001;69(8):4958-68.
49. Zhang X-Y, Yu Y, He P, Zhang Y-X, Hu B-Y, Yang Y, et al. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospire. *Acta Biochim Biophys Sin.* octubre de 2005;37(10):649-56.
50. Palaniappan RUM, Chang Y-F, Jusuf SSD, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* noviembre de 2002;70(11):5924-30.
51. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 23 de abril de 2008;2(4):e228.
52. Donaires LF, Céspedes MJ, Sihuincha MG, Pachas PE. Determinantes Ambientales Y Sociales Para La Reemergencia De La Leptospirosis En La

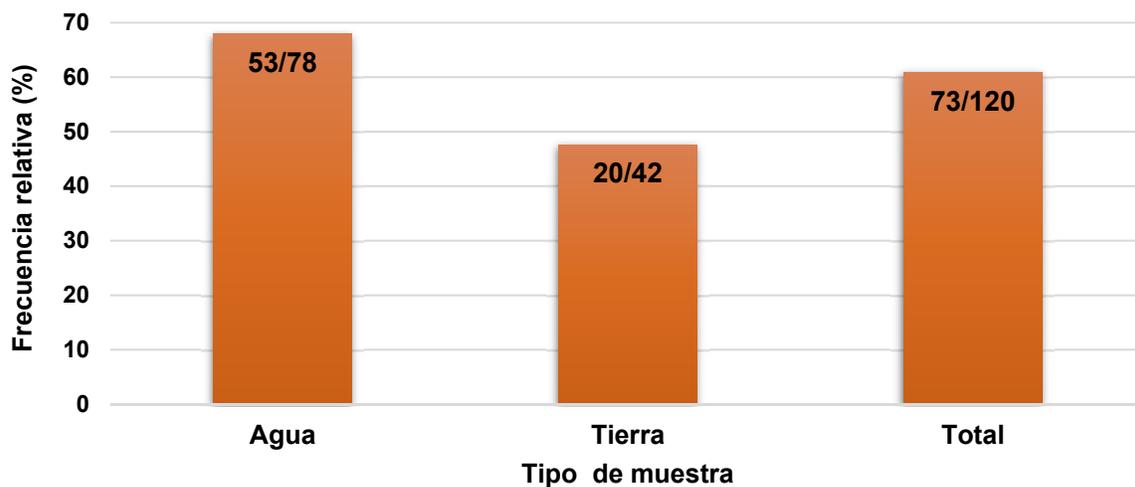
- Región Amazónica Del Perú, 2012. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2012;29(2):280-4.
53. Organization WH. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003 [citado 9 de abril de 2018]; Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42667>
54. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. abril de 2001;14(2):296-326.
55. Jobbins SE, Alexander KA. Evidence of Leptospira sp. infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1 de mayo de 2015;109(5):349-51.
56. 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.
57. Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, Tatarski C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of Leptospira Transmitted by Rodents in Southeast Asia. PLoS Negl Trop Dis. 5 de junio de 2014;8(6):e2902.
58. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infect Immun. mayo de 2007;75(5):2441-50.
59. Sykes J, Hartmann K, Lunn K, Moore G, Stoddard R, Goldstein R. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. J Vet Intern Med. enero de 2011;25(1):1-13.
60. Garba B, Bahaman AR, Khairani-Bejo S, Zakaria Z, Mutalib AR. Retrospective Study of Leptospirosis in Malaysia. Ecohealth. 2017;14(2):389-98.

61. Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene*. 22 de agosto de 2000;254(1-2):19-28.
62. Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, Ward RJ, et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. *Biochem Biophys Res Commun*. agosto de 2005;333(4):1341-7.
63. Atxaerandio Galdós R, Aduriz Rekalde G, Moreno B (Instituto V de I y DA. [Pathogeny, clinical sign and lesions of bovine leptospirosis]. *Bovis Esp* [Internet]. 2002 [citado 13 de abril de 2018]; Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES2002001868>
64. Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín-González C, Amador JJ, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*. noviembre de 1998;178(5):1457-63.
65. Pedro N A, SZYFRES B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I: Bacteriosis y micosis. *Rev Esp Salud Pública*. 1 de junio de 2001;75.
66. Goris MGA, Leeflang MMG, Boer KR, Goeijenbier M, Gorp ECM van, Wagenaar JFP, et al. Establishment of Valid Laboratory Case Definition for Human Leptospirosis. *J Bacteriol Parasitol* [Internet]. 25 de noviembre de 2011 [citado 13 de abril de 2018];3(2). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/establishment-of-valid-laboratory-case-definition-for-human-leptospirosis-2155-9597.1000132.php?aid=5676>
67. Adler B., de la Peña Moctezuma A. *Leptospira*. *Pathog Bact Infect Anim* [Internet]. 12 de mayo de 2010; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470958209.ch28>

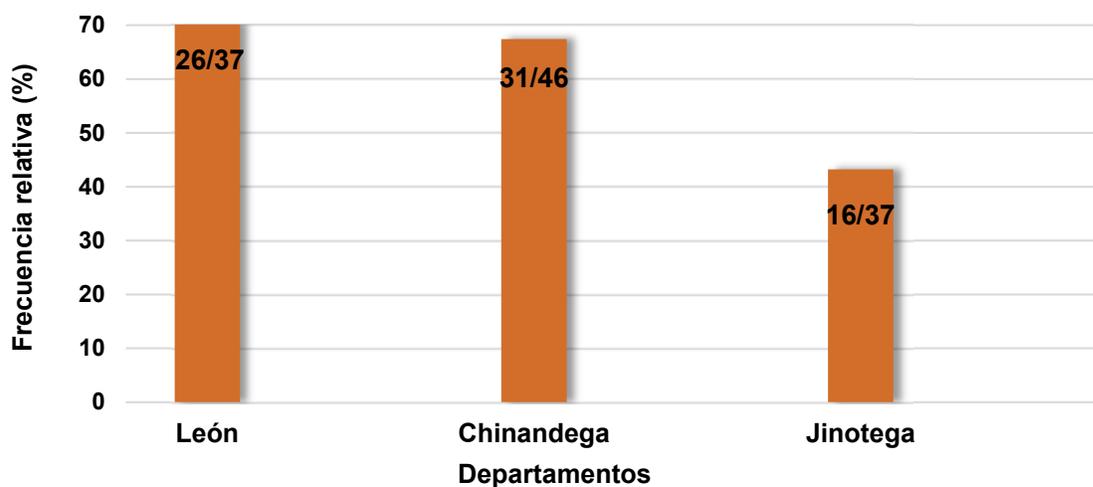
68. Acosta H, Moreno CH, B DV. Leptospirosis. Revisión de tema. Colomb Médica. 1994;25(1):36-42.
69. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae. I. Growth at low temperatures. J Bacteriol. julio de 1967;94(1):27-31.
70. Rodríguez Sánchez IP, Barrera Saldaña HA. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Cienc UANL [Internet]. 2004 [citado 13 de abril de 2018];7(3). Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/1584/>
71. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica ISSN 0213-005X Vol 22 N° 5 2004 Pags 299-305. 1 de mayo de 2004;22.
72. Dirección General de Meteorología [Internet]. [servmet.gob.ni](http://servmet.gob.ni). 2012 [citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://servmet.ineter.gob.ni/Meteorologia/climadenicaragua.php>
73. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, et al. Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic Leptospira. PLoS Med [Internet]. agosto de 2006;3(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1551915/>
74. Ridzlan FR, Bahaman AR, Khairani-Bejo S, Mutalib AR. Detection of pathogenic Leptospira from selected environment in Kelantan and Terengganu, Malaysia. Trop Biomed. diciembre de 2010;27(3):632-8.
75. García Masaya ML, Herrera García ME, Pérez Vásquez AM, Castillo Signor L del C, Kestler Ordóñez RO. Seroprevalencia de leptospirosis humana en un asentamiento del área urbana de la ciudad de Guatemala. (Spanish). Seroprevalence Hum Leptospirosis Settlt Urban Area Guatem City Engl. mayo de 2013;65(2):166-76.

76. Zelaya de Romillo B, García Masaya ML, Villagran Blanco CI. Prevalencia de leptospirosis en la aldea El Milagro Masagua, Escuintla / [Internet]. [citado 23 de agosto de 2018]. Disponible en: <http://glifos.concyt.gob.gt/library/index.php?title=2563&query=@title=Special:GSMSearchPage@process=@encabezamiento=ETNICIDAD%20@mode=&recnum=1035>
77. 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.* 15 de noviembre de 2014;80(22):6926-32.
78. Latifah I, Abdul Halim A, Rahmat MS, Nadia MF, Ubil ZE, Asmah H, et al. Isolation by culture and PCR identification of LipL32 gene of pathogenic *Leptospira* spp. in wild rats of Kuala Lumpur. *Malays J Pathol.* agosto de 2017;39(2):161-6.
79. Arellano J. Cierran balnearios populares en León • El Nuevo Diario [Internet]. El Nevo Diario. 2008 [citado 11 de septiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.elnuevodiario.com.ni/nacionales/10231-cierran-balnearios-populares-leon/>
80. Chaiwattananrungruengpaisan S, Suwanpakdee S, Sangkachai N, Chamsai T, Taruyanon K, Thongdee M. Potential pathogenic *Leptospira* species isolated from waterfall in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 31 de octubre de 2017;

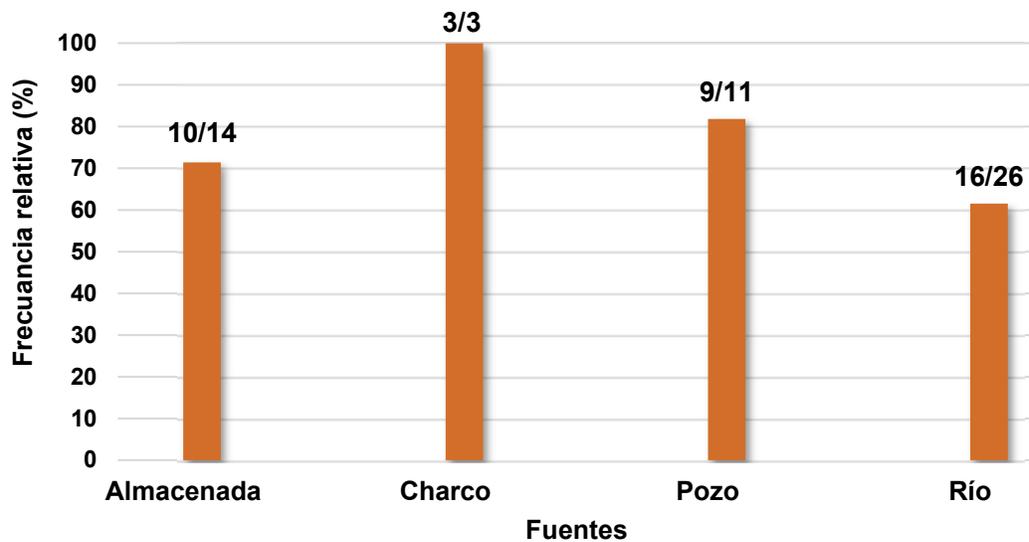
## 10. ANEXOS



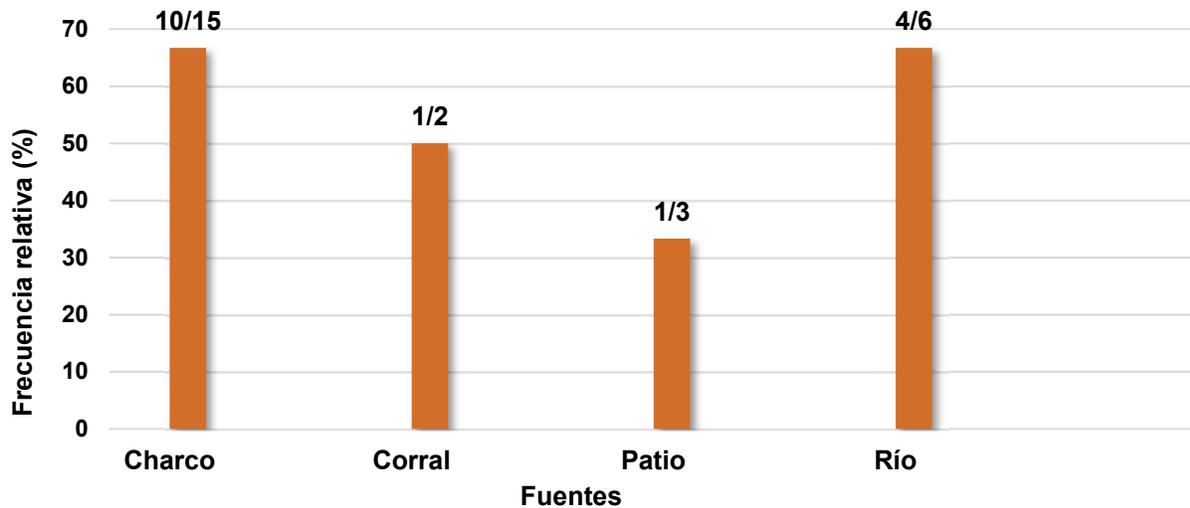
Gráfica 1: Frecuencia de aislamientos de acuerdo con el tipo de muestra



Gráfica 2: Frecuencia de aislamiento por departamento



**Gráfico 3: frecuencias de aislamientos positivos en muestras de agua de acuerdo a la fuente**



**Gráfico 4: frecuencia de aislamientos positivos en muestras de tierra de acuerdo a la fuente**



Figura 1: recolección de muestras

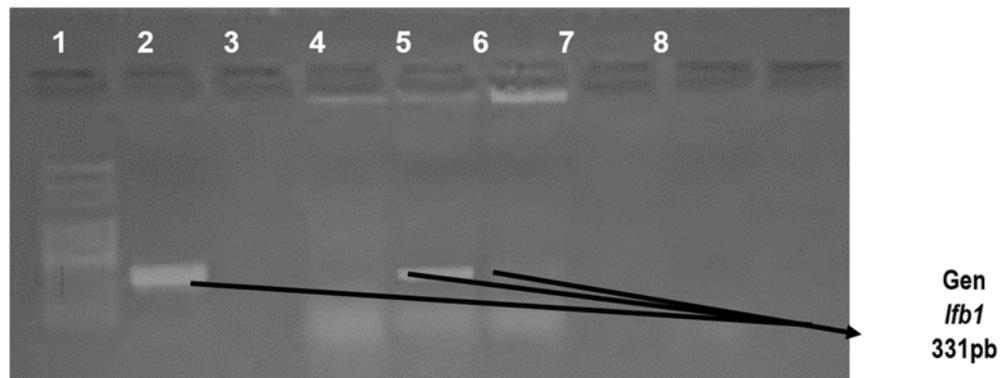


Figura 2: electroforesis

Amplificación del gen *lfb1* específico para leptospiras patógena a través de PCR convencional.

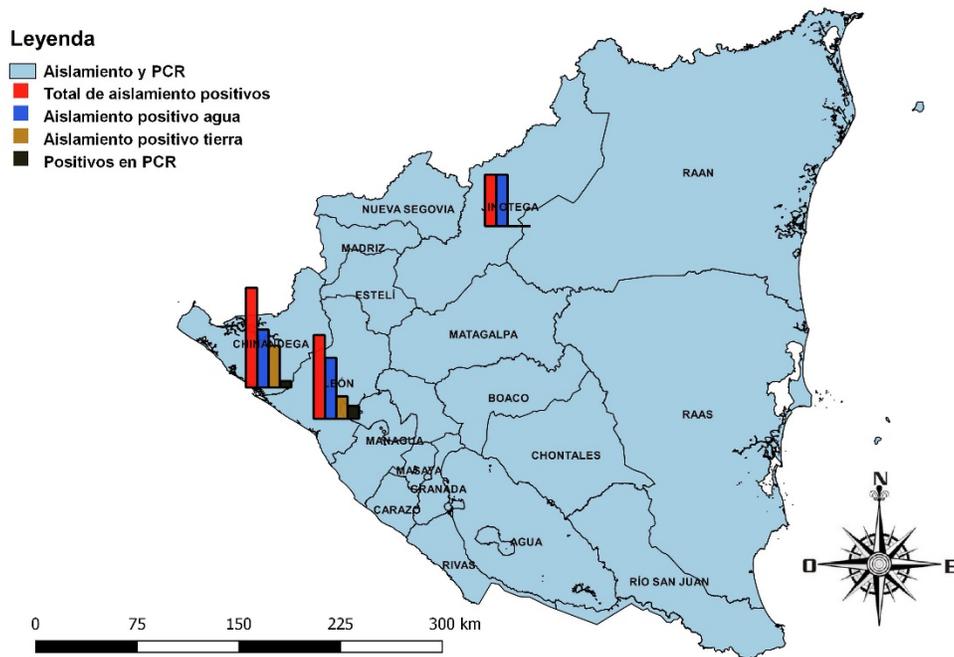
Carril 1: marcador de peso molecular 100pb, carril 2: control positivo, carril 3,4 y 7: muestras negativas, carril 5 y 6: muestras positivas (gen *lfb1* 331pb) y carril 8: control negativo.



**Figura 3: ríos muestreados en el estudio**



**Figura 4:** áreas del río Telica identificadas con leptospiras patógenas por el PCR



**Figura 5:** resultados del aislamiento y el PCR por departamentos