

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
POSGRADO EN SALUD PUBLICA (POSAP)
MAESTRIA EN SALUD PUBLICA



EVALUACION DE LA PRUEBA DE INMUNOCROMATOGRAFIA
PARA EL DIAGNOSTICO RAPIDO DE LEPTOSPIROSIS HUMANA
EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIO DE HONDURAS
LABORATORIO NACIONAL DE VIGILANCIA
ENERO-MARZO 2009

TESIS
PARA OPTAR TITULO DE MASTER EN SALUD PUBLICA

ROQUE HUMBERTO LOPEZ MENDEZ

ASESOR DE TEMA
DR. HECTOR ESCALANTE

TEGUCIGALPA M.D.C. HONDURAS C.A.

DICIEMBRE 2010

19/9/13.
Ing. 8^{en} Indi
Indi Zorob
Lpd

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
POSGRADO EN SALUD PÚBLICA (POSAP)
MAESTRIA EN SALUD PÚBLICA**

**Evaluación de la prueba de inmunocromatografía para el
diagnostico rápido de Leptospirosis Humana en la Red
Nacional de Laboratorio de Honduras
Laboratorio Nacional de Vigilancia
Enero - Marzo 2009**

**Tesis
Para Optar Título de Master en Salud Publica**

ROQUE HUMBERTO LÓPEZ MÉNDEZ

**Asesor de Tema
Dr. Héctor Escálante**

**Tegucigalpa MDC, Honduras C.A.
Diciembre 2010**

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA
DE HONDURAS**

1847

DEDICATORIA

La vida me ha regalado muchas oportunidades, deseos y sueños.

En esta ocasión regalo mi esfuerzo, mis alegrías y penas a mi querida y amada Madre Maria Auxiliadora Méndez, ella que con solo su presencia me llena de vida, alegrías y ganas de luchar cada día más.

Su vida para mí es un aliento en mis caídas, una luz en mi oscuridad, un camino para crecer y fortalecerme, para ser un bastión en su vida.

Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida.

A. Schnitzler.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS

Rectora
Lic. Julieta Castellanos Ruiz

Vice Rectora Académica
Dra. Rutilia Calderón Padilla

Vice Rector de Asuntos Internacionales
Dr. Ernesto Paz Aguilar

Vice Rectora Orientación asuntos Estudiantiles
Dra. América Alvarado Díaz

Secretaria General
Lic. Emma Virginia Rivera

Director de Sistema de Estudios de Post Grado
Dra. Olga Marina Joya

Decano de la Facultad de Ciencias Médicas
Dr. Marco Tulio Medina

Secretaria de Facultad de Ciencias Médicas
Lic. Trinidad de Jesús Vásquez

Coordinadora General del post Grado en Salud Publica
MSc. Astarte Alegria Castellanos

AGRADECIMIENTO

Doy infinitas gracias:

A Dios por el camino recorrido...

A mi Madre por su amor, fuerza y apoyo...

A mis hermana y hermano porque siempre he contado con ellos y su cariño, en especial a Karla por su valioso apoyo tecnológico en la culminación de este trabajo...

A toda mi familia, quienes sin duda son mi principal pedestal de apoyo...

A la Doctora Maria Dolores Alonso por sus valiosos aportes y apoyo incondicional... (Mi Madre Cubana)

A mis asesores por asesorarme a lo largo de la tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente proyecto, por compartir sus conocimientos e inspirar en mi mucha admiración

A la doctora Carmen Morales por su leal y verdadera amistad...

Al Doctor Avelino Aguerriós por su apoyo y consejos en momentos adecuados

A cada uno de los maestros de quienes en las distintas áreas de estudio he recibido parte de su conocimiento para mi preparación...

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron o participaron en la realización de esta investigación...

INDICE

Contenido	Página
I. Introducción	1-2
II. Objetivos	3
III. Marco Teórico.	4-32
IV. Hipótesis.....	33
V. Metodología.....	34-40
VI. Resultados.	41-48
VII. Discusión.	49-52
VIII. Conclusiones	53
IX. Recomendaciones.	54
X. Referencias Bibliográficas	55-59
XI Anexos.....	60

I. Introducción

La leptospirosis es una zoonosis y un problema de salud pública causada por una espiroqueta del género *leptospira* que infecta a muchos mamíferos silvestres y domésticos. El humano puede infectarse y el espectro de la enfermedad puede ser de asintomático hasta severos síndromes, afectando múltiples órganos, provocando una alta mortalidad.

En Honduras la leptospirosis se va consolidando cada vez más como una zoonosis y como un problema de salud pública debido a los daños que ella causa por su incidencia y letalidad además causando problemas de índole económicos en la industria pecuaria nacional, ocurriendo de forma aislada o en brotes epidémicos estacionales.

Desde la ocurrencia de los primeros casos sospechosos en humanos en nuestro país en 1995, el país ha demostrado su interés por desarrollar la capacidad nacional para poder identificar tempranamente y diagnosticar con pruebas de laboratorio a cualquier sospechoso de padecer esta enfermedad zoonótica. Por eso se viene tratando de estimular, capacitar y agilizar la vigilancia epidemiológica y el control de esta enfermedad a nivel nacional, a través de la implantación de medidas adaptables a la realidad nacional. Este control debe basarse en acciones continuas y de carácter permanente y no apenas mediante la ocurrencia de inundaciones o situaciones emergenciales para que se logren resultados satisfactorios.

Se ha demostrado que se puede diagnosticar tempranamente la enfermedad a través de pruebas rápidas de laboratorio. Existe la técnica de microaglutinaciones, una técnica de referencia que ayuda principalmente en el diagnóstico, en estudios seroepidemiológicos entre otros pero no al diagnóstico temprano de la leptospirosis, además el mantenimiento o sostenimiento de esta técnica es muy costoso y peligroso a la vez, porque es necesario contar con un cepario vivo de leptospirosis, para cual se requiere de un laboratorio de bioseguridad nivel 3 y del personal

capacitado para este ensayo, todo esto hace un costo elevado, debido a lo anterior la implementación en la red nacional de laboratorios de Honduras se hace casi imposible.

En el mercado se cuenta con muy pocas pruebas de diagnóstico rápido y estas poseen ciertas desventajas como ser tiempo en el diagnóstico y costos, dichas pruebas nunca han sido evaluadas en nuestro país de forma sistemática para conocer la sensibilidad, especificidad y validez. A pesar de contar con una técnica de referencia en el Laboratorio Nacional de Vigilancia de Salud Pública.

Por lo anterior se ha tomado como iniciativa la evaluación de una prueba rápida para la detección precoz de leptospirosis en los laboratorios de la red nacional y su posible incorporación al Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad.

II. Objetivos

Objetivo General

Evaluar una prueba inmunocromatografica (prueba rápida) comparándola con la prueba de referencia, para el diagnostico de leptospirosis en muestras séricas que llegan al Laboratorio Nacional de vigilancia de Bacteriología de pacientes sospechosos, identificando sus características epidemiológicas en un periodo de Enero a Marzo 2009.

Objetivos Específicos

- Identificar las características epidemiológicas relacionadas con la enfermedad en los pacientes sospechosos.
- Estimar la especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo de la prueba inmunocromatografica como criterios de evaluación
- Estimar el costo de las pruebas empleadas.

III. Marco Teórico.

La leptospirosis es una zoonosis y un problema de salud pública causada por una espiroqueta del género *leptospira* que infecta a muchos mamíferos silvestres y domésticos. El humano puede infectarse y el espectro de la enfermedad puede ser de asintomático hasta severos síndromes, afectando múltiples órganos y puede provocar una alta mortalidad. La Leptospirosis Humana fue descrita por primera vez en 1,886 por Adolf Weil, el describió el síndrome de leptospirosis icterico acompañado de insuficiencia renal¹. En 1917, alemanes y japoneses demostraron el agente etiológico de la leptospirosis².

Inada e Ido, detectaron espiroquetas y anticuerpos contra esas espiroquetas en trabajadores japoneses.³

Los primeros casos que se registraron en América fue en Estados Unidos, en Filadelfia en 1939, en Argentina en 1976, en Brasil en 1987, en Cuba en 1986, en Nicaragua en 1995, en Costa Rica en 1996 entre otros^{2,4}

En Honduras el primer registro de este agente infeccioso fue en 1964, detectando anticuerpos anti-leptospiras en porcinos importados de EE.UU.⁵ Ruiz A y colaboradores registraron aislamientos de *Leptospira* en fetos de bovinos en Comayagua.⁶ En 1975, Espinoza L. realizó un estudio de seroprevalencia en bovinos, en el valle de Comayagua y detectó anticuerpos contra diferentes serogrupos de *Leptospira* patógena siendo los más frecuentes: *L. bataviae*, *L. pyrogenes*, *L. canicola*, *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. sejroe*, *L. autumnalis*⁷

¹ Weil, A. 1886. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. Dtsche. Arch. Klin. Med. 39:209–232

² Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Reviews. 14: 296–326 p

³ Inada, R., Y. Ido, R. Hoki, R. Kaneko, and H. Ito. 1916. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med. 23:377–402.

⁴ Trevejo, R. T., J. G. Rigau-Perez, D. A. Ashford, E. M. McClure, C. Jarquin Gonzalez, J. J. J. Amador, O. de los Reyes, A. Gonzalez, S. R. Zaki, W. J. Shieh, R. G. McLean, R. S. Nasci, R. S. Weyant, C. A. Bolin, S. L. Bragg, B. A. Perkins, and R. A. Spiegel. 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary haemorrhage—Nicaragua, 1995. J. Infect. Dis. 178:1457–1463

⁵ IHIMV. 1964. Notas registradas en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario

⁶ Ruiz A y Colaboradores. 1980. Aislamiento de *Leptospira* en fetos de bovino. Datos registrados en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario

⁷ Espinoza L. 1975. datos registrados en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario

Entre 1985-2005 Galeas S y Orellana B del Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinaria (IHIMV) llevaron a cabo un estudio de vigilancia epidemiológica de leptospirosis utilizando la MAT. En este estudio se procesaron alrededor de 67,375 muestras de bovino y 25,020 muestras de Porcinos, se identificaron 17 serovares y se mapearon los diferentes serovares en todo el país.⁸

En 1989 en Albarrada el Corpus-Choluteca se detectaron los primeros casos humanos infectados con Leptospirosis, pero un año más tarde se registraron 4 casos mortales en los municipios de Marcovia, El Corpus, y Nacaome diagnosticados clínicamente.

En 1998 OPS, SAG y SSP, realizaron un estudio seroepidemiológico en Marcovia-Choluteca antes del paso del huracán Mitch y detectaron un 28.5% de individuos seroreactivos.⁹

Después del paso del huracán Mitch, la SAG y SSP realizaron estudios sobre brotes de Leptospirosis en Tegucigalpa y San Pedro Sula, se detectaron 172 casos de los cuales 48 fueron seroreactivos (28%), el grupo etario más afectado fueron entre los 15 a 49 años de los cuales fallecieron 7 personas (4.06%).¹⁰ En el 2000, se reporta el desarrollo y estandarización de un ELISA casero.¹¹ En este mismo año se registra el desarrollo de un PCR-IS 1533 para diferenciar el ADN de *Leptospira* patógena de saprofítica.¹² Además, se publicó un trabajo en el que se detectaron ADN de *Leptospiras* en órganos de roedores capturados en la UNAH.¹³

⁸ Galeas S y Orellana B. 2005. Vigilancia seroepidemiológica de leptospirosis en Honduras entre 1195 al 2005. Datos registrados en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario

⁹ Gussenhoven GC, Van der Horn MAWG, Goris MGA. Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, Van Ingen CW, Smith HL. 1997. LEPTO Dipstick, a Dipstick Assay for Detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Sera. J Clin Microbiol. 35: 92-97

¹⁰ Secretaria de Salud Pública Honduras/Unidad de Zoonosis. 2003. Manual para el diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Leptospirosis. 1ra. Edición 19 p

¹¹ Pineda L, Sanchez C, Garcia-Suarez R, Carrasco J. 2000. Implementación y estandarización de una prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de leptospirosis. Memoria XII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.

¹² Pineda L P, Orellana B, Carrasco J. 2000. Desarrollo y estandarización del PCR-IS1533 para detectar DNA de *Leptospira* y diferenciar los serovares de *Leptospira interrogans*. Memoria XII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.

¹³ Soley I, Carrasco J. 2000. Desarrollo y estandarización de PCR-IS1533 para detectar *Leptospira* en órganos de roedores selváticos. Memoria VII Jornada científica de las Ciencias Biológicas y de la Salud Facultad de Ciencias Médicas. UIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras

En el 2002, se identificaron *Leptospiras* patógenas aisladas de agua procedentes de Catacamas-Olancho mediante un PCR-IS 1533 y mediante experimentos in-vivo de infección.¹⁴ En el 2003, se registro un estudio de seroepidemiológico en 55 personas de trabajadores de alcantarillado de la ciudad de Tegucigalpa y se detecto un 62% de seroprevalencia.¹⁵ En el 2005 se reportan nuevos aislamientos de *Leptospiras* procedentes de aguas contaminadas y un brote de leptospirosis en Malguarita, Tamara-Francisco Morazán.¹⁶

Formas de Transmisión:

La leptospirosis puede ser transmitida de manera indirecta y directa. Una transmisión indirecta puede ser utilizando un vehículo como el agua, alimento, el lodo u objetos contaminados; de tal manera que la exposición de las mucosas o heridas al material contaminado facilita la entrada del microorganismo e infectar al humano. Una transmisión directa ocurre cuando el individuo infectado esta infectando a los demás de manera directa y esto puede ser por transplante de órganos y tejidos o por transmisión congénita.¹⁷ (Ver figura 1)

¹⁴ Orellana BM, Carrasco J. 2002. *Leptospira* sp. Aislada de muestras de agua potable y riego, identificada como *Leptospira interrogans* mediante métodos inmunoserológicos y moleculares (PCR). XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM), VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III congreso Cubano de Medicina Tropical. Habana, Cuba

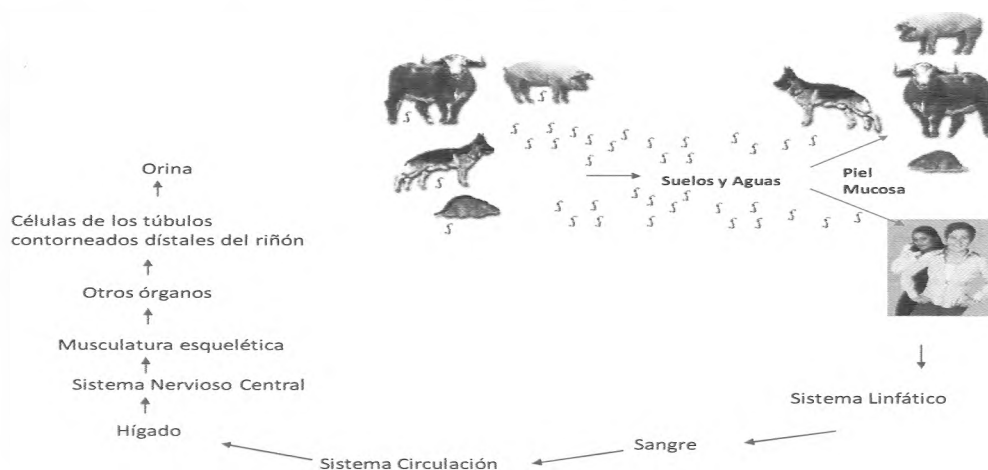
¹⁵ Senia R, Rivera RL, Pineda L, Rivera R. 2003. Prevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* en trabajadores de alcantarilla. Memoria XIV semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras. 110

¹⁶ Orellana B, Velásquez, Carrasco J. 2005. Estudio epidemiológico de leptospirosis en la comunidad de Malguarita, Támara, Francisco Morazán Memoria XVII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras. 132-133

¹⁷ Inada, R., Y. Ido, R. Hoki, R. Kaneko, and H. Ito. 1916. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med. 23:377-402.

Figura 1 Ciclo biológico de la Leptospirosis

CICLO BIOLÓGICO



Factores de Riesgo:

Los principales reservorios de *Leptospira* son los mamíferos domésticos y los silvestres, entre los animales domésticos que pueden estar infectados con la bacteria y pueden ser transmisores indirectos de las leptospiras; los perros, gatos, bovinos, porcinos entre otros y entre los mamíferos salvajes tenemos a los roedores, mofetas, zorros, mapaches, zarigüeyas entre otros. Los roedores suelen ser los que llevan el ciclo peri-domésticos porque mantienen un acercamiento con los humanos.¹⁸

El hombre y los mamíferos son susceptibles a las infecciones por leptospiras sin distinción de edad y sexo.

La mayor prevalencia de leptospirosis en los hombres puede ser por su actividad ocupacional o recreativa. Otro factor de riesgo suele ser cuando las altas densidades de las poblaciones de animal que migran o cuando viven en lugares en la cual su

¹⁸ Pineda L P, Orellana B, Carrasco J. 2000. Desarrollo y estandarización del PCR-IS1533 para detectar DNA de *Leptospira* y diferenciar los serovares de *Leptospira interrogans*. Memoria XII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.

topografía es quebrada, con muchos ríos y/o lagos y que los cambios estacionales esta exclusivamente en las épocas lluviosas.¹⁹

El hombre es un huésped accidental y rara vez se transmite de persona a persona, la infección puede ser frecuente por la exposición ocupacional en las alcantarillas, las procesadoras de carnes (pescados, camarones, aves, vacuno, porcino, etc.), en las minerías, en los limpiadores de zanjas, en los cultivadores de arroz, mariscos entre otros. Además, hay otras actividades ocupacionales en la puede estar en contacto con las leptospiras y es en las clínicas veterinarias, los entrenadores de perros y otros animales, entre otros.²⁰

En la actualidad se han clasificado a *Leptospira* en género, especies y complejos como ser patógeno y no patógeno. Además se han clasificado en sub. Unidades taxonómicas de las cuales se basa en la diferenciación antigénica que permiten separarla en serovares y serogrupos.

1 *Leptospira* patógena: Estas leptospiras habitan en riñones y son excretadas en orina al medio ambiente. *Leptospira interrogans* al que pertenecen a 23 serogrupos y a 250 serovares (*L. borgpeterseni*, *L. santarosai*, *L. neguchii*, *L. weilli*, *L. inadai*, *L. kirshneri*). En Honduras, el serovar que mas circula en los ultimos dos años datos de la seroteca del laboratorio central es *L. pyrogenes*

2 Dentro de las *Leptospiras* no patógenas están las leptospiras que habitan en el medio ambiente *Leptospira biflexa* pertenece a 38 serogrupos y a 63 serovares (*L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. parva*)

¹⁹ Adler, B., A. M. Murphy, S. A. Locarnini, and S. Faine. 1980. Detection of specific antileptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 11:452-457.

²⁰ Orellana B, Velásquez, Carrasco J. 2005. Estudio epidemiológico de leptospirosis en la comunidad de Malguarita, Támara, Francisco Morazán Memoria XVII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.132-133

Las Leptospiras en general pertenecen al Phylum: Spirochetes, clase Spirochetes, orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, genero Leptospira, especie *L. interrogans sensu lato*, *L. interrogans sensu stricto*.

Estas bacterias son flexibles, delgadas, apretadamente enrollada de forma espiral, formas "S" y en los extremos forman ganchos, son altamente móviles, miden de 10-20µm de largo por 0.5µm de diámetro. Crecen a pH 7.2-7.6 a temperatura de 28-30 °C, tardan en crecer entre 6-14 días, son susceptibles a desecación, la luz solar, altas temperaturas, agentes químicos, detergentes, jabones y antibióticos.²¹ Es sabido que los antígenos de superficie son los responsables de la activación de la respuesta inmune y que los lipopolisacáridos (LPS) son los que nos da esa diversidad antigénica, el cual es usado para el diagnóstico de una infección con *Leptospira* usando la técnica de la Microaglutinación (MAT)²².

Además, otros investigadores han demostrado que los anticuerpos de la clase IgM van dirigidos más a LPS y que los anticuerpos de la clase IgG se dirigen más a las proteínas.²³

Patogenicidad:

Los mecanismos por el cual la leptospira causa enfermedad son desconocidos, hoy se conoce diferentes factores de virulencia que sugieren los mecanismos de patogenicidad pero aun no son claros. Algunos de los factores de virulencia que se han encontrado son los siguientes: endotoxina de baja actividad (LPS), fosfolipasa C con actividad de hemolisina, citotoxina con actividad de citotoxicidad a macrófagos y polimorfonucleares. Además, las leptospiras tienen una capacidad de adherirse a las células epiteliales del riñón y agregar aglutinaciones con los anticuerpos homólogos, esto conlleva atraer a los macrófagos y los neutrófilos a la zona donde fallan en la fagocitosis de estos inmunocomplejos.²⁴

²¹ Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Reviews. 14: 296–326 p.

²² Arimitsu, Y., S. Kobayashi, K. Akama, and T. Matuhasi. 1982. Development of a simple serological method for diagnosing leptospirosis: a microcapsule agglutination test. J. Clin. Microbiol. 15:835–841.

²³ Adler, B., A. M. Murphy, S. A. Locarnini, and S. Faine. 1980. Detection of specific antileptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 11:452–457.

²⁴ Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Reviews. 14: 296–326 p.

Sintomatología Clínica:

El espectro de la sintomatología es muy amplio, pero el clásico es el síndrome de "Wiel" siendo esta una de las manifestaciones más severa de esta enfermedad. Las presentaciones clínicas de esta enfermedad es bifásica que consiste de la fase leptospiremica que ocurre en una semana seguido de la fase inmune donde hay una producción de anticuerpo, la excreción de leptospira por orina y ubicación de leptospira en tejido. Además de esto, se puede observar una leptospirosis anictérica y una leptospirosis ictérica.

En la leptospirosis anictérica, puede ser asintomático, fiebre, escalofrío, dolor de cabeza, mialgia, dolor abdominal; esto puede durar una semana y la desaparición de los síntomas coincide con la aparición de los anticuerpos.

En la leptospirosis ictérica, la enfermedad es más severa porque ello contribuye a una alta tasa de mortalidad. La ictericia no se debe al daño de los hepatocitos si no al retorno de la bilirrubina, pero las complicaciones severas enfatizan a una falla renal aguda, a las hemorragias internas causadas por la trombocitopenia y trastornos cardiacos que puede ser letal.

Otras complicaciones pueden ser en las mujeres embarazadas del cual ya se han registrado abortos y muerte fetal.²⁵ Porque la sintomatología clínica de amplio espectro puede confundirse con otros agentes infecciosos que causan sintomatología similar entre las que encuentra el virus de la hepatitis, malaria y dengue entre otros (ver Tabla 1).

Hallazgos del laboratorio clínico:

1. Leucocitosis con neutrofilia y formas inmaduras
2. Anemia hipocrómica
3. VES aumentado
4. Trombocitopenia.
5. La bilirrubina directa arriba de 20mg/dl,
6. TGO, TGO no pasan de 500 U/dl, que usualmente esta mas elevada la TGO

²⁵ Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Reviews. 14: 296–326 p.

7. Fosfatasa alcalina elevada
8. Potasio sérico normal o disminuido, urea y creatinina elevadas
9. Prolongación del tiempo de protombina.
10. CPK aumentado de 4 a 5 veces.
11. Baja densidad urinaria, proteinuria, hematuria y leucocituria
12. LCR Xantocrómico en casos ictericos, con pleocitosis linfomonocitaria comúnmente durante la segunda semana de la enfermedad al igual que en ausencia clínica de compromiso meníngeo²⁶

²⁶ Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras. Año Manual de Marchas Técnicas Utilizadas en el Diagnóstico Microbiológico de la Leptospirosis. Instituto de Parasitología "Kouri" (IPK), Habana-Cuba

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de Leptospirosis con otras enfermedades hemorrágicas

Síntomas y signos	Leptospirosis	Dengue	Malaria	Hepatitis
Fiebre	Aparece bruscamente	Alta de inicio agudo y continua	Muy altas cada 2 a 4 días	Baja intensidad
Cefalea	Intensa, dolor retro-ocular en 50%	Continuo dolor retro-ocular, aumenta con el movimiento	Ligera	Rara
Ictericia	Forma ictérica	No hay	En casos graves	En adultos y niños mayores de 5 años
Mialgia	Región lumbar, miembros inferiores	Generalizada	En fosas lumbares durante el acceso febril	No frecuente
Función renal	En cuadro renal	En caso de shock	En casos de <i>P. falciparum</i>	
Esplenomegalia	Raro	Raro	Si	No
Hemorragia pulmonar	En cuadro pulmonar	No hay	No	No
Hemograma	Plaquetas , neutrofilia, VES	Hto , leucopenia, plaquetas	Hto plaquetas Normales Eosinofilos ligera.	Hto y Plaquetas Normales
CPK	Aumento 4-a 5 veces	Normal	Normal	Normal

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de los casos de Leptospirosis humana y animal puede ser complicado o difícil, debido, principalmente, a las características intrínsecas de las leptospiras y a la epidemiología de la pandemia. En la actualidad, se cuenta con un gran número de técnicas de laboratorios pero su realización previa es conveniente recabar información sobre una serie de datos que puedan orientar en el diagnóstico. Para ello se debe combinar los siguientes: el diagnóstico epidemiológico, clínico y de laboratorio.

El diagnóstico ideal debería basarse en el aislamiento, cultivo e identificación, pero las peculiares características de las leptospiras como ser crecimiento difícil y lento, hacen que esta metodología esté indicada en aquellos casos que otros más sencillos, como los serológicos, carecen de confiabilidad.²⁷

En el caso de los estudios epidemiológicos, y cuyo objetivo es la obtención de un resultado de prevalencia, las técnicas indicadas para esto son, las serológicas a pesar de que su interpretación es muchas veces subjetivo.

DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO

En aquella aparición tanto humana como animal, en las que se encuentran con cuadros sintomatológicos compatibles con un caso de Leptospirosis, se debe enfatizar en las anamnesis de los aspectos siguientes:

Humanos: edad, sexo, dirección, ocupación, síntomas clínicos, hospitalización (sí/no), antecedentes y lugar de exposición (contactos con animales, ambiente), factores climáticos: precipitación, temperatura, inundación, desastres naturales, número de casos, fecha del diagnóstico, datos microbiológicos y serológicos²⁸

27 Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*, 2nd ed. Med. Sci. Melbourne, Australia

28 Savio, L.E. Linder, 2002. Leptospirosis Humana. Clínica y diagnósticos diferenciales. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.11-15

Animales:

- Época del año en la que ha aparecido el brote, con especial atención a las climáticas: precipitación, temperatura, humedad relativa
 - 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, perros, cerdos etc.
 - Control de animales silvestres portadores.
 - Si el rebaño comparte el bebedero con otros animales silvestres
 - Edad y sexo de los animales afectados
 - Sintomatologías predominantes y características de los signos clínicos
 - Antecedentes de leptospirosis
 - Si se realiza vacunación contra la Leptospirosis.²⁹
- (Alonso – Andicoberry et al., 2001).

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Tiene un carácter presuntivo y se realiza fundamentalmente a través de los signos y síntomas que presentan los animales y el humano. Además las lesiones anatomopatológicas características de la enfermedad que aportan una gran contribución (Schaeffer, 1951; Heath et al., 1965; Ellis, 1994; 1996; Kelley, 1998; Guijarro y Calvo, 1999).

²⁹ Alonso- Andicoberry, C., García-Peña, F.J., Pereira Bueno, J., Costas, E. and Ortega-Moral, M. 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. Prev. Vet. Med. 52:109-117

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las técnicas bacteriológicas son las más complejas pero nos brindan resultados muy importantes, tales como: la observación, el aislamiento y la identificación del microorganismo (Adler, 1986).

El diagnóstico debe basarse en el conocimiento de la patogenia del microorganismo, así como de sus propiedades. Estos métodos se pueden dividir en : técnicas indirectas que detectan anticuerpos frente a la leptospiras y técnicas directas encaminadas a la detección de leptospiras o sus antígenos y/o ácidos nucleicos en los tejidos y/o fluidos corporales.

En caso de muestras procedentes de fetos, las técnicas directas son las más indicadas que las indirectas, ya que el diagnóstico individual cobra mayor importancia. Para las muestras procedentes de animales adultos, las técnicas indirectas se utilizan más frecuentemente pues son más sencillas de realizar y su costo es menor.³⁰

De los animales vivos, se enviará sangre y leche en fase aguda de la enfermedad y orina en la fase crónica. De los fetos, los órganos de elección son: hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno. De los animales muertos y sacrificados, las muestras que se deben enviar son: cerebro, médula espinal, LCR y ojo cuando hay síntomas nerviosos y la mayoría de los órganos parenquimatosos, en los casos que cursan con ictericia (hígado, riñón, bazo etc.) y la vejiga y su contenido, humor acuoso, aborto y contenido estomacal³¹ (Bofill et al., 1996)

En humanos durante el período de leptospiremia los productos patológicos útiles son sangre (pareadas) y líquido cefalorraquídeo (durante la primera semana) y la orina en la segunda o tercera semana.

Las muestras postmortem más adecuada son: riñón (parte cortical), hígado, bazo, así como sangre de corazón o líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido

³⁰ Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8

³¹ Bofill, P., Rivas, A., Ramírez, W. Montañez, J., Martínez, A., Quincoses, T., Reinaldo, L. y Fuentes, E. 1996. Manual de Enfermedades Infecciosas. Tomo # 1. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional, México, 139-187

peritoneal, cerebro, fetos abortados, semen y leche materna, deben preservarse congelados en glicerol a partes iguales³²

Para propósitos epidemiológicos, pueden obtenerse muestras de agua y suelo, y en caso de epidemias o epizootias, sangre, riñón, hígado de animales capturados (roedores u otros animales silvestres).

TÉCNICAS INDIRECTAS

Los métodos serológicos nos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales (que pueden ser de la clase IgM e IgG), las que constituyen las técnicas de elección. Además, son las pruebas de laboratorio más utilizadas en el diagnóstico de la Leptospirosis, al igual que para la realización de estudios epidemiológicos.³³

El mayor problema que presenta son los niveles de anticuerpos, aunque se mantienen durante años, alcanzan niveles tan bajos en animales y personas infectados crónicamente los cuales no siempre se detectan, además en los casos de infección por serovares adaptados un porcentaje de los animales pueden no presentar respuestas con anticuerpos.³⁴

Para el diagnóstico serológico se ha utilizado técnicas como: prueba de aglutinación microscópica (MAT), prueba de microaglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT), aglutinación macroscópica, prueba hemolítica, fijación de complemento, ensayo inmunoenzimático (ELISA) y PCR.³⁵

A). MAT. Es el método serológico de referencia a la hora de evaluar otras pruebas para el diagnóstico de Leptospirosis. Se emplea para detectar anticuerpos en sueros de sospechosos o enfermos (humanos y animales) donde el suero del paciente sospechos o enfermo reacciona con antígenos vivos de leptospiras de 10

³² Ginebra, G. A. Olga. 2001. Microorganismos Espirales. En: Llop H. Alina, Valdés-Dapena V. M., Zuazo, S.J. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo 1. Ed. Ciencia Médica Ciudad de La Habana. 37:388-415.

³³ Mazzone, J. 1994. Técnicas actuales de laboratorio de diagnóstico de leptospirosis. Rev. Lab. 77(457):9-18

³⁴ Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8.

³⁵ Greenlee, J.J. 2002. The diagnosis and description of experimental Leptospirosis in dogs. Memorias XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Habana, Cuba

días de crecimiento en medio líquido de EMJH con enriquecimiento, y es el más utilizado cotidianamente³⁶

Además es la prueba oficial para la exportación e importación de animales. El MAT fue creado por Martin et al., en 1917 y en 1918, Martin y Pettit lograron describir el fenómeno de aglutinación y "lisis" con suero. Desde entonces, el método ha sido modificado y mejorado por (Schüffner y Mochtar, 1926; Borg-Peterson y Fagroeus, 1949; Wolff, 1954; Carbrej, 1960; Galton et al., 1965; Cole et al., 1973; Sulzer y Jones, 1973). Ellos trataron de estandarizar factores como: tiempo y temperatura de incubación, el punto de corte, la concentración del antígeno y la edad de siembra.³⁷

Antiguamente, era conocido como la prueba de aglutinación lisis por la formación lisis de las bolas (Schüffner y Mochtar, 1927) o lisis de glóbulos (van Thiel, 1948) de despojos o ruinas celular en la presencia de alto títulos de antisuero, pero Borg-Peterson, (1954) demostraron que no se producía una lisis sino una aglutinación. En la actualidad, para obtener una adecuada sensibilidad, se recomienda utilizar cepas representativas de todos los serogrupos presentes en un lugar determinado concreto y de la especie objeto de estudio. También hay reportes de una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92 % y 95 %, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95 % y negativo 100 %.³⁸

Para la realización de la prueba se utilizan cultivos de cuatro a ocho días de edad cuya suspensión produzca una transmitancia del 60-70 % en un espectrofotómetro a 400nm de longitud de onda (Ellis, 1996). Además, es necesario determinar el punto de corte, título por debajo del cual es considerado que la aglutinación es debido a reacciones inespecíficas. El título de anticuerpos del suero será la dilución más alta en la cual aun encontramos 50 % de aglutinación³⁹

El punto de corte más recomendado es el título 1:100 en bovinos; para los perros, felinos, ovinos, suinos y equinos se considera positivo un resultado superior a 1:50, Blood et al., (1982) y para porcino consideraron 1:100 positivo, pero casi siempre

³⁶ Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8.

³⁷ Haake, D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology 146:1491-1504

³⁸ Prescott, J.F. 1993. Leptospirosis, In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (Eds.) Pathology of domestic animals. Academic Press, Inc, 4th edition. 503-511.

³⁹ Herrera Blanca. 2002. Diagnostico de Laboratorio. En: Guia de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.27-34

estos valores difieren de laboratorios. El 1:100 en bovinos no siempre resulta adecuado, principalmente en infecciones por serovar adaptado como *L. hardjo*. En caso de abortos en bovino 1:40 se considera diagnóstico, aunque el porcentaje de fetos que presentan reacción de inmunidad humoral es bajo⁴⁰.

En seres humanos para este método se considera lo siguiente:

En caso de una sola muestra, el título serológico $\leq 1:800$ confirma el diagnóstico. Los títulos comprendidos entre 1:50 y 1:800 deben ser interpretados en el marco de la situación clínico-epidemiológico del paciente. Para las muestras pareadas, 1:1600 o más es confirmativo

Al igual que otras pruebas serológicas, para diagnosticar una infección individual mediante MAT, se requiere estudiar dos muestras pareadas de 7-14 días de intervalo de la primera y si se observa que ha habido seroconversión, se considera de valor diagnóstico un cambio en el título de al menos, cuatro veces el título inicial. Es una prueba principalmente de rebaños, pues la obtención de títulos individuales frente a las leptospiras, se considera poco significativo.⁴¹

A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacunales de los de infección, resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva, requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras y no siempre detecta a los animales infectados, en especial cuando el serovar implicado es *L. hardjo*, que presenta como características ser poco antigénico⁴²

B). Prueba de Aglutinación Microscópica con Antígeno Muerto (MSAT) utiliza leptospiras formoladas y centrifugadas, resuspendidas a una cierta densidad estándar, con un "pool" de antígenos de varios serogrupos. La aglutinación que se

⁴⁰ Barr, B. C. y Anderson, M. L. 1993. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract. 9: 343-368

⁴¹ Hathaway, S.C., Little, T.W.A. and Pritchard, D.G. 1986. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in bovine population. Vet. Rec., 119:84-86

⁴² Thiermann, A.B. and Handsaker, A.L. 1985. Experimental infection of calves with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*: conjunctival versus intravenous route of exposure. Am. J. Vet. Res., 46:329-331

produce es semicuantitativa y puede leerse a simple vista. Esta reacción es menos específica que MAT, menor nivel de títulos obtenido, mayor reacción cruzada, los antígenos son estables a 4 °C por lo menos un año, es especie específica y de la misma forma que MAT, no diferencia reacción entre anticuerpos de la infección reciente y tardía, pero tiene una buena reacción temprana de la enfermedad que MAT.⁴³

C) Fijación del Complemento (FC). Es una prueba género-específica que emplea como antígenos de *L. biflexa*, se considera tan fiable como el MAT para la detección de animales con leptospirosis, pero, detecta infección reciente, es útil en el pesquaje de grandes cantidades de sueros ya que puede semiautomatizarse. Es una herramienta epidemiológica para diagnóstico rápido, menos laboriosa que el MAT. Las desventajas son las sustancias anticomplementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovares y no detecta niveles bajos de anticuerpos.

44

D) ELISA: Las deficiencias que permite el MAT ha obligado a los científicos emplear esta técnica que ayude a la detección de anticuerpos tanto en tanque de leche (Guijarro y Calvo, 1999) como en el suero. Ella es capaz de detectar la IgM durante la primera semana de la enfermedad y la detección tardía de IgG que permite diferenciar infecciones recientes de pasadas (Smith et al., 1994). La detección de anticuerpos específicos IgM con una sola muestra es confirmatoria de una infección reciente por leptospirosis. Además, se considera como más sensible que MAT, es fácil de estandarizar y los antígenos se pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos y poca reacciones cruzadas, tampoco diferencia los anticuerpos vacúnales de las

⁴³ Hartskeerl, R., Smith, H., Korver, H., Goris, M. and Terstra, W. 2000. International Course on Laboratory Methods for diagnosis of Leptospirosis. Royal Institute. Amsterdam, Holland

⁴⁴ Smith C.R., Ketterer P.J., McGowan M.R. and Corney, B.G., 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. Aus. Vet. J. 71, 290-294

infecciones⁴⁵. A pesar de que es una prueba muy eficaz, aun no está considerada como prueba oficial.

E) Aglutinación macroscópica: Se desarrolló para evitar los problemas derivados del mantenimiento de cepas vivas de leptospiras en el laboratorio. Poco autores la recomiendan debida a su falta de sensibilidad y porque no es capaz de determinar el serovar⁴⁶

F) Aglutinación en microcápsula: Es una técnica que se presentó como posible opción a las utilizadas habitualmente. En ella, se utiliza antígeno leptospiral transportado en microcápsulas de un polímero sintético. Los autores la consideran como una prueba muy específica y sensible. En una evaluación internacional fue más sensible que MAT o ELISA-IgM en la fase aguda de la enfermedad, pero no puede detectar infecciones causada por otros serovares. Se puede trabajar sin la modificación del suero de otras especies animales.⁴⁷

G) Hemoaglutinación indirecta (HA): Es una prueba serológica género-específica de alta sensibilidad y solamente detecta las IgM. Utiliza eritrocitos de ovejas o del grupo sanguíneo O humano. A pesar de que siempre se ha considerado de utilidad, no ha llegado a desplazar al MAT y de hecho, se utiliza de manera paralela a él. Resulta de valor para el cribado de sueros y para la detección de infecciones recientes. Esta técnica desarrollada por CDC, reveló una sensibilidad y especificidad de 92 % y 95 % comparado con MAT respectivamente. Por estos altos valores en el territorio cubano es la técnica elegida para el diagnóstico de Leptospirosis human. Además, al inicio demostrará una sensibilidad de 92-100 % durante la fase aguda y de convalecencia y 95-97 % de especificidad , pero algunos autores obtuvieron

⁴⁵ Thiermann, A.B. and Garret, L.A. 1983. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 884-887

⁴⁶ Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8

⁴⁷ Arimitsu, Y., Fukumura, K. and Shintaki, Y. 1989. Distribution of Leptospirosis among stray dogs in the Okinawa Islands, Japan: comparison of the microcapsule and microscopic agglutination tests. Br. Vet. J. 145:473-477

una sensibilidad de 81 % al séptimo día de media y al 100 % al octavo día de promedio. Estos niveles contradice lo obtenido por Effler, (2000) el 15 % de sensibilidad al 14 día y 68 % de convalecencia después de 14 día⁴⁸.

TÉCNICAS DIRECTAS

La demostración de la presencia de Leptospiras, o sus componentes en la sangre, tejidos y/o leche de animales y humanos con signos clínicos es de gran valor diagnóstico⁴⁹

A) **Observación en microscopio de campo oscuro:** Este método se realiza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos. Es difícil debido al gran número de artefactos que, por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión. Además precisa que haya un gran número de microorganismos en las muestras⁵⁰

B) **Tinción Argénica:** Dentro de este grupo podemos considerar diferentes técnicas, como: la técnica de Warthing-Starry y sus modificaciones y la técnica de Steiner y Steiner. Se utiliza para la demostración de Leptospiras en los órganos de animales presumiblemente muertos por leptospiras. La presencia de leptospiras en fetos abortados y mortinatos son indicadores claros de que es una infección activa en el feto y crónica en la madre, considerando de valor diagnóstico. Además de su baja especificidad y sensibilidad, presenta las mismas inconveniencias que la anterior.⁵¹

C) **Técnicas de tinción Inmunohistoquímica:** Tienen baja sensibilidad, por lo que son poco adecuados para el diagnóstico de portadores crónicos, lo que depende del número de microorganismos en la muestra (Ellis, 1996)

48 Obregón, F., Ana Margarita Rodríguez, G. Islay y Rodríguez, S. J. 2001. Hemoaglutinación Indirecta. IPK. Cuidada de La Habana, Cuba.

49 Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8.

50 Ellis, W.A. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract. 10:463-478.

51 Baskerville, A. 1986. Histological aspects of diagnosis of Leptospirosis. In: Ellis W.A., Little T.W.A.(Eds.) Present state of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, 33-43

Inmunofluorescencia: Es más adecuada para la detección de leptospiras que las anteriores. Casi siempre se utiliza en el diagnóstico para los casos de abortos y de la presencia de *Leptospiras* en sedimentos de orina. Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros policlonales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia.

Inmunoperoxidasa: Es más rápida y asequible que la anterior ya que no precisa de un microscopio de fluorescencia

Marcado de partículas de oro Al igual que las anteriores, depende del número de microorganismos y poco sensible.

D) Técnicas de detección y estudio de ácidos nucleicos: Son pruebas relativamente modernas que aun precisan más estudios sobre su efectividad y utilidad. Comprende: marcado con sondas de ADN, hibridación de ARN, marcado con radio y PCR con mayor efectividad en la orina ⁵²

E) Aislamiento: Para muchos autores, es la técnica más sensible para el diagnóstico de leptospiras, además es la que confirma la presencia del germen, tanto en casos agudos como crónicos a pesar de que requiere mucho tiempo y de laboratorios especializados ⁵³

La inoculación en animales de experimentación puede considerarse una forma especial del aislamiento y está considerada como la técnica más sensible por algunos científicos.

También existen otros métodos pero no de amplio uso en el mundo como: Prueba Hemolítica (HL), Contraelectroforesis (CIE), Inmunoabsorción Magnética, Hibridación de ADN., Absorción de antígeno inmunomagnética etc.

⁵² Wagenaar, J., Zuerner, R. L., Alt, D. and. Bolin, C. A. 2000. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in urine of cattle. Am. J. Vet. Res. 61:316-20

⁵³ Thiermann, A.B. and Garret, L.A. 1983. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 884-887

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Para llegar al diagnóstico diferencial, es necesaria una buena anamnesis que abarque los antecedentes particulares y/o animales patológicos de 15-20 días anteriores a la presentación de la enfermedad. Dada las diversas presentaciones, se deben diferenciar de algunas pandemias por especies según las manifestaciones clínicas predominantes.⁵⁴

Bovinos: Se deben diferenciar con cuadros que cursan con: hemoglobulinuria, hematuria, hemólisis, aborto, Mastitis y disminución de la producción láctea como: Anaplasmosis, Babesiosis, Pasteurellosis, Brucelosis, Listeriosis, Vibriosis, Trichomoniasis, Toxoplasmosis, IHBB., intoxicación por cobre y "rapum", hemoglobulinuria posparto y trastornos alimentarios.⁵⁵

Porcino: Brucelosis, Peste porcina, Aujeszky, Listeriosis, Salmonelosis, SMEDI virus, Parvovirus porcina, Encefalitis viral japonesa, Erisipela porcina, deficiencia nutricional, etc.

Equino: Anemia Infecciosa Equina, Salmonelosis, Babesiosis, Tripanosomiasis, Artritis viral equina, Rinoneumonitis viral equina y la causada por *streptococcus genitalium*⁵⁶

Canino: Hepatitis canina, trastornos gastrointestinales.

Humano: Dengue, Malaria (paludismo), Influenza, Hepatitis viral, Fiebre hemorrágico epidémica, hantavirus, septicemia con ictericia, Fiebre Q, tifus, Brucelosis, Borreliosis, Toxoplasmosis, Fiebre Amarilla, Piolonefritis, Gripe, síndrome de disfunción orgánica múltiple⁵⁷ (Díaz et al., 2000; Villar et al., 2000; Everret, 2002; Savio, 2002; Torales, 2002).

⁵⁴ Savio, L.E. Linder, 2002. Leptospirosis Humana. Clínica y diagnósticos diferenciales. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis.

OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.11-15

⁵⁵ Bofill, P., Rivas, A., Ramírez, W. Montañez, J., Martínez, A., Quincoces, T., Reinaldo, L. y Fuentes, E. 1996. Manual de Enfermedades Infecciosas. Torno

1. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional, México, 139-18

⁵⁶ Blood, D.C., Radostits, O.M. and Henderson, J.A. 1982. Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. 6 Eds. ELBS, 675-6857

⁵⁷ Torales, M. 2002. Leptospirosis. Carta Infectológica, 2(1):3-6.

PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

Para que las medidas que se quieren tomar sean efectivas para el control de la enfermedad en cuestión, es sumamente imprescindible la identificación lo antes posible de los animales afectados, así como el serogrupo y/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.⁵⁸

PROFILAXIS

Desde el punto de vista epidemiológico, la Leptospirosis es una enfermedad difícil de controlar ya que el microorganismo se puede albergar en el riñón y ser eliminado en la orina de muchos animales, perpetuándose entre ellos el estado de portador. Sin embargo, se deben realizar esfuerzos para conocer la prevalencia de serotipos específicos en una determinada población y describir los focos de contagio a fin de evitar aparición de nuevos casos (WHO, 1982)

INMUNOPROFILAXIS

Dentro de la inmunoprofilaxis se puede considerar tanto la vacunación como la inmunización pasiva con suero hiperinmune.

La vacunación es una práctica muy extendida en muchos países, siendo, para algunos autores, la mejor herramienta de control. Sin embargo, presenta una serie de inconveniencias en primer lugar: las vacunas comerciales son biterinas y no proporcionan inmunidad cruzada entre serovares distintos y sola permiten una protección limitada frente a cepas distintas de un mismo serovar. Los serovares y las cepas varían entre países, por lo que la protección ofrecida por las vacunas elaboradas con cepas de otro país o región, en otras regiones puede ser poca eficaz.⁵⁹

En segundo lugar, diversos estudios sobre las vacunas existentes, han demostrado que tanto monovalente, bi y hasta pentavalente, no evitan la infección, la migración al

⁵⁸ Johnston, J. H., Lloyd, J. McDonald, J. and Waitkins, S. 1983. Leptospirosis-an occupational disease of soldiers. J. R. Army Med. Corps 129:111-114

⁵⁹ Thiermann, A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. JAVMA 184, 722-725

útero y oviducto ni la persistencia de la infección renal y por consiguiente, tampoco evitan la leptospirosis ni el nacimiento de algunas crías débiles y mortinatos⁶⁰

A pesar de estas limitaciones, la vacunación sigue siendo parte importante del sistema control en los rebaños

Little et al., (1992) demostraron que un programa de vacunación de todo un rebaño (bovino) durante cinco años, es posible el control de las infecciones por *L. hardjo* y su eliminación del rebaño. También, se considera que el calendario de vacunación debe ser al principio del período seco y en el parto, puede disminuir las pérdidas económicas por abortos

Primo vacunación: se vacunan todos los animales del rebaño, machos, hembras y terneros.

Segunda dosis a los 21 días de la primera dosis.

Revacunación en forma anual o semestral de acuerdo al productor.

Machos: vacunar antes de entrar al servicio para proteger al rodeo.

A Hembras: vacunar antes del servicio y previo al parto.

Terneros: vacunar a los 2 meses de edad y luego revacunar en dependencia del productor⁶¹

La otra variante es la vacunación total del rebaño y luego tratar con dihidroestreptomicina 2 mg/kg. A todas las vacas preñadas también hay programa de vacunación cuando se aplica en los cerdos y perros.

En los seres humanos las vacunas se aplican de modo más restrictivo, a las poblaciones de alto riesgo y /o en zonas endémicas. La inmunización casi siempre en humano utiliza vacunas polivalentes en trabajadores de arrozales, cañeros, etc. en la China. En Cuba se utiliza una vacuna trivalente de *pomona*, *canicola* e

60 Bolin, C.A. 2000. **Leptospirosis**, 185-200. In :C. Brown, and C. Bolin (ed.), Emerging diseases of animals. ASM Press, Washington, D.C

61 Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. 1999. *Leptospira* and **leptospirosis**, 2nd ed. Med. Sci. Melbourne, Australia

*icterohaemorrhagiae*⁶². En los últimos años en Cuba, se utiliza la vacuna Vex-Spiral en dos dosis de intervalo de 6 semanas.

La quimioprofilaxis; mediante la aplicación de doxiciclina en la dosis de 200 mg una vez a la semana durante 4-6 semanas ha tenido efectividad de 95 % en los adultos de alto riesgo y también en los animales, sobre todo en ganado porcino en combinación con la vacuna.

PROFILAXIS HIGIÉNICO-SANITARIO

La profilaxis higiénico-sanitario es esencial en el control de la leptospirosis en una población humana y animal, pero siempre ha de formar parte de un sistema general de control, junto con la vacunación y el tratamiento, ya que ninguna de estas medidas son eficaces por separado (Ellis, 1994). Las medidas higiénicas- sanitarias deben basarse en dos puntos esenciales: el control de hospedadores de mantenimiento silvestres y el control de hospedaderos domésticos. También los factores ecológicos que influyen en la epizootiología de la Leptospirosis como: densidad alta de población animal, su migración natural o planeada, las características geográficas, agronómicas y meteorológicas del ambiente y los cambios estacionales deben tomar en cuenta.⁶³

Algunas de las medidas principales recomendadas por varios autores son:

Educación y difusión a las poblaciones en especial las de alto riesgo sobre la forma de contagio y como evitar la enfermedad.

- Protección individual de los trabajadores como: ganaderos, trabajadores de alcantarillados, obreros agrícolas, veterinarios, arrozales, cañeros etc. mediante el uso de calzado y vestimentas apropiadas (botas, delantales guantes, antiparras, tapaboca) según la tarea que se desempeñen.
- Higiene personal y del ambiente doméstico, se debe impedir el ingreso de animales al interior de los domicilios así como a los galpones de producción o

⁶² Martínez, M. G., Matos, K. T., Da Silva, M. V and. Abreu, M. T. de. 1998. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. Ocul. Immunol. Inflamm. 6:75-79

⁶³ Ginebra, G. A. Olga. 2001. Microorganismos Espirales. En: Llop H. Alina, Valdés-Dapena V. M., Zuazo, S.J. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo 1. Ed. Ciencia Médica Ciudad de La Habana. 37:388-415

almacenamiento de alimento se debe hacer hincapié en la higiene y desinfección en los locales de ordeño etc., con hipoclorito de sodio.

- Buen drenaje o relleno de terrenos bajos o fácilmente inundables de residuos líquidos y agua pluviales.
- Se debe prohibir tanto a la población humana como animal beber o bañarse en agua de ríos, charcos y lagunas posiblemente contaminados con el agente.
- Disposición, colecta y eliminación de los residuos (recipientes apropiados, colecta permanente y coordinada con la población, relleno sanitario correcto y en condiciones).
- Control ecológico de la población animal salvaje.
- Aislamiento de los animales domésticos.
- Tratamiento específico de personas y animales enfermos según los esquemas terapéuticos.
- Drenaje, canalización de cursos o espejos de agua que tienden a provocar inundaciones o que representen posible focos de esta enfermedad.
- Realizar estudios epidemiológicos para tener noción sobre prevalencia de la enfermedad en la especie así como para saber que serogrupo o serovar está circulando.
- Desratización general de la explotación y construcción de edificio 'a prueba de roedores'.
- Reducir el pastoreo conjunto con otras especies domésticas y con otros rebaños.
- Mantener una política de ciclo cerrado y en su defecto someter a la cuarentena estricta a los animales de reposición que entran nuevos en la explotación.
- No separar las crías de las madres después de parto (bovino).
- Evitar el uso de machos enfermos para la monta directa.
- Las mascotas deben vacunarse anualmente.
- Realizar informe anual sobre la situación de la enfermedad en el territorio.⁶⁴

⁶⁴ Lyford, P.V. y Blanca Herrera. 2002. Medidas de Prevención, Protección y Control para los animales. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.37-41

TRATAMIENTO: El objetivo primordial para el tratamiento contra la infección por Leptospirosis, es controlar la infección antes del daño irreparable que puede ocurrir en el hígado y riñón. Prácticamente todos los antimicrobianos tienen efecto sobre la infección por leptospiras, excepto de las sulfanamidas y el cloranfenicol en animales. Los antibióticos más recomendados son: dihidroestreptomicina, penicilina, estreptomicina, oxytetraciclina, tetraciclina, etc.⁶⁵

Tratamiento en humanos:

Tomando en cuenta que la Leptospirosis humana, tiene una evolución clínica sumamente variable y suele ser una enfermedad fatal cuando se tarda en su reconocimiento temprano. Resulta difícil evaluar con precisión la eficacia del tratamiento antimicrobiano; por lo que se debe considerar estos elementos de gran importancia en su manejo⁶⁶ Antibióticos, soporte respiratorio y cardiovascular, diálisis (peritoneal o hemodiálisis) y transfusión sanguínea en casos muy graves.

Existe un grupo de antibióticos con grado variable de efectividad contra la leptospira. Los más importantes son: penicilina, doxiciclina, tetraciclina, eritromicina, ampicilina, amoxacilina y estreptomicina. De estos, la penicilina y la doxiciclina son los más utilizados y aceptados en la práctica clínica. El tratamiento siempre se indicará de inmediato y en correspondencia con los síntomas que presente el paciente.

Las cefaloporinas de tercera generación (cefotaxina, ceftizoxima) han tenido buenos resultados en Cuba (Ginebra, 2001). También algunos autores proponen la misma cefaloparina un gramo por vía endovenosa de cada 4 horas durante las primeras 72 horas y continuar posteriormente con un gramo diario por vía intramuscular durante 7 días.⁶⁷

⁶⁵ Merck. Manual de Veterinaria, Ed. 2000. 5ta ed. Barcelona, España. Ed. Océano Grupo, 532-533

⁶⁶ Ginebra, G. A. Olga. 2001. Microorganismo Espirale. En: Llop H. Alina, Valdés-Dapena V. M., Zuazo, S.J. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo 1. Ed. Ciencia Médica Ciudad de La Habana. 37:388-415

⁶⁷ Hickey, W. P. 2002. Leptospirosis. Disponible en: <http://www.emedicine.com/PED/topic1298.htm>

Introducción al análisis costo-efectividad

Preliminares

En el ámbito de la investigación en Economía, la Economía de la Salud es uno de los terrenos en los que más intensamente se viene trabajando. A este respecto, una de las mayores preocupaciones de los investigadores es la comparación entre tratamientos o tecnologías. La medición de la efectividad de los distintos tratamientos no es suficiente para tomar decisiones. Si optamos únicamente por esta alternativa estamos aceptando una capacidad ilimitada de recursos destinados a la sanidad, y la realidad confirma que los recursos sanitarios son limitados y la efectividad tiene un precio". Como Weinstein y Stason (1977) afirmaron, para un nivel de recursos disponibles, la sociedad debe maximizar el total agregado de beneficios en salud". Por tanto, es necesaria la introducción de los costos, así como de alguna medida que los relacione y permita la comparación.

A medida que el control en el gasto sanitario ha aumentado en los últimos veinte años, el termino costo-efectividad ha ganado en popularidad. Esta atención creciente al análisis costo-efectividad (CEA) de nuevos o existentes tratamientos ha venido liderada por el desarrollo de agencias de evaluación de tecnológicas, tales como el *National Institute for Clinical Excellence* (NICE) del Reino Unido, que trata de proporcionar guías a los proveedores de salud y decidir que tratamientos deben ser cubiertos en un contexto de recursos económicos escasos. En los Estados Unidos, por ejemplo, los altos precios de entrada al mercado de nuevos medicamentos, unido al cada vez más estricto presupuesto del sistema sanitario, han inducido la alta demanda de este tipo de estudios. La organización de mantenimiento de la salud (HMO) y las agencias Medicaid habitualmente solicitan información sobre la efectividad de un determinado fármaco antes de comprarlo (Luce y Brown, 1995). Las empresas farmacéuticas compiten entre ellas para demostrar que sus productos son costo-efectivos. Como resultado, el numero de análisis costo-efectividad realizados aumenta cada año.

En otros países, como por ejemplo Australia o Canadá, están regulado que las compañías farmacéuticas deben someter sus productos al análisis costo-efectividad⁶⁸

Actualmente, la mayoría de agencias de evaluación de tecnologías médicas emplean la técnica del análisis costo-efectividad para la comparación de tecnologías.

Tipos de evaluación económica

Una vez medido el coste y la efectividad de las tecnologías a comparar debemos realizar el análisis económico de las mismas. En función de cómo se decida medir el efecto de la tecnología, podemos encontrarnos con varios tipos de metodologías para la evaluación económica: el análisis costo-beneficio, el análisis costo-efectividad y el análisis costo-utilidad.

Introducción al análisis costo-efectividad

Análisis costo-beneficio (CBA): En el análisis costo-beneficio, los costos y los efectos de las tecnologías comparadas se miden en unidades monetarias⁶⁹. El criterio para la elección del programa más adecuado es sencillo, que el beneficio sea mayor que el costo. Este análisis tiene la ventaja de que permite comparar tecnologías con medidas de efectividad diferentes. Esto supone también una desventaja ya que resulta muy difícil transformar unidades de salud en unidades monetarias.

La medida monetaria del beneficio en salud es obtenida estimando la disposición al pago de los individuos por mejoras en la calidad de vida. La dependencia de este tipo de análisis a la valoración monetaria de la salud y a los métodos empleados para su estimación ha motivado que esta técnica sea cada vez menos utilizada en la evaluación de tecnologías sanitarias.

Análisis costo-efectividad (CEA): El análisis costo-efectividad es una técnica de evaluación económica en la que se comparan dos o más tecnologías sanitarias en

⁶⁸ Henry, 1992; Ontario Ministry of Health, 1994; Canadian Coordinating Office of Health Technology Assessment, 1997.

⁶⁹ Foster, 1980; Mishan, 1988; Albi, 1989; Kamlet, 1992.

términos de unidades naturales de efectividad⁷⁰ La aplicación de esta técnica es muy concreta. Se trata de comparar tecnologías que comparten los mismos objetivos terapéuticos, si bien sus niveles de efectividad difieren. Por lo tanto, no pueden compararse dos tecnologías cuya finalidad sea distinta, a la vez que no tendría sentido un análisis costo-efectividad de dos tecnologías con igual nivel de efectividad. En ese caso, solo será necesario un estudio de costos. La principal limitación de esta técnica es que solamente permite comparar tecnologías cuyos resultados en salud puedan ser expresados en las mismas unidades.

Análisis costo-utilidad: Este método ha sido desarrollado específicamente en el campo sanitario. El análisis costo-efectividad no es válido para comparar intervenciones cuyos efectos en salud sean cualitativamente diferentes. El objetivo era buscar una medida para los efectos de los tratamientos que capturase las dimensiones importantes de la salud, y por lo tanto, integrase cantidad y calidad de vida. Las unidades obtenidas son los años de vida ajustados por calidad (QALYs)⁷¹ Para el cálculo del QALY se asigna a cada periodo de tiempo un peso, con valores de 0 a 1, que corresponde a la calidad de vida del periodo, donde un peso 1 señala un perfecto estado de salud y el valor 0 equivale al peor estado de salud imaginable. El QALY se obtendrá como la suma de dichos pesos.

El QALY también puede ser interpretado como el número de años saludables equivalentes al verdadero estado de salud. La principal ventaja de este tipo de análisis es la posibilidad de comparar diferentes tipos de intervenciones o programas sanitarios, expandiendo considerablemente el rango de aplicación.

El análisis costo-utilidad es considerado por algunos autores⁷² como un tipo particular de análisis costo-efectividad con QALYs como medida de efectividad.

Históricamente no hay un único fundamento teórico del análisis costo-efectividad. Sus raíces pueden asociarse a diferentes fuentes y tareas, como el análisis de

⁷⁰ Desky y Naglie, 1990; Weinstein, 1990; Birch y Gafni, 1992; Gold *et al.*, 1996.

⁷¹ Torrance *et al.*, 1972; Torrance, 1976; Kaplan y Bush, 1982; Torrance, 1986; Drummond *et al.*, 1987; Torrance, 1987; Mehrez y Gafni, 1989; Torrance y Feeny, 1989; Torrance, 1995; entre otros.

⁷² Weinstein y Stason, 1977; Eisenberg, 1989

decisión o la investigación operativa. Muchas herramientas del CEA, tales como las técnicas de optimización necesarias para su aplicación o los instrumentos desarrollados para medir la calidad de vida, reflejan las contribuciones de autores de muy distintas líneas de investigación. Algunos autores afirman que el CEA se desarrolló como una técnica de ingeniería aplicada para la asignación de recursos (Garber et al., 1996). Algunos economistas (Garber y Phelps, 1995) han relacionado el CEA con las raíces teóricas de la economía del bienestar.

Componentes del análisis costo-efectividad:

Efectividad: La efectividad de un tratamiento constituye uno de los elementos indispensables de la práctica clínica. Por efectividad entendemos el grado en el que un tratamiento o intervención sanitaria logra alcanzar los objetivos para los que fue diseñado en un escenario real. La efectividad debe distinguirse de un concepto muy relacionado: la eficiencia, que hace referencia al grado de realización de los objetivos en unas condiciones ideales.

Coste: El análisis de los costes de una intervención incluye la identificación, medida y valoración de todos los recursos que son utilizados en una determinada intervención. La Figura 2 indica de forma general que uso de recursos debe ser considerado, identificado, estimado en términos cuantitativos y valorados monetariamente.

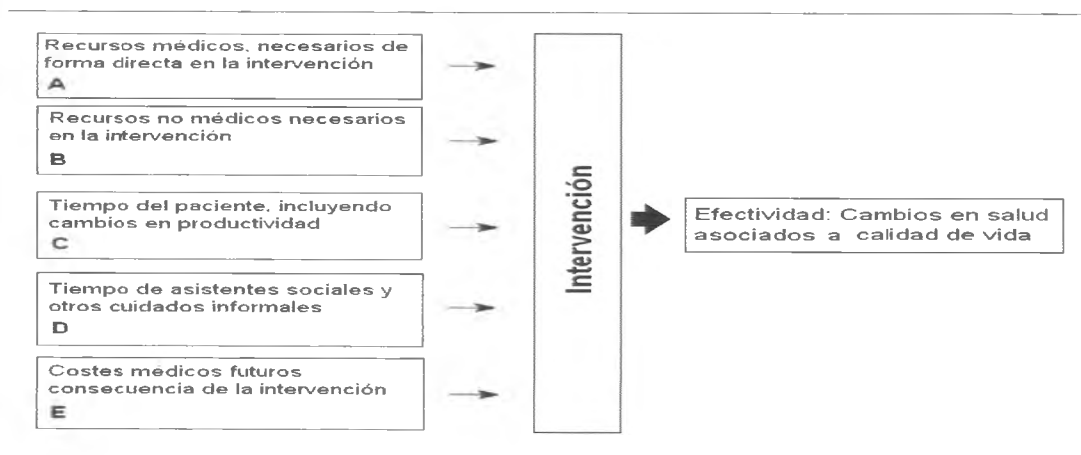


Figura 2 Uso de recursos (Brouwer et al., 2001).

IV Hipótesis

La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de la prueba rápida de inmunocromatográfica para diagnóstico de leptospirosis son iguales o mayores del 70%

Preguntas de investigación

1. ¿Cuáles son los antecedentes epidemiológicos asociados a la enfermedad de los pacientes sospechosos?
2. ¿Cuál es la Especificidad, sensibilidad, y valor predictivo positivo y negativo de la prueba inmunocromatográfica?
3. ¿Cuáles son los costos de la prueba inmunocromatográfica y la Microaglutinación?

V. Metodología

Se realizó un estudio descriptivo transversal con la finalidad de evaluar la prueba de inmunocromatografía comparándola con la prueba de referencia MAT para el diagnóstico rápido de leptospirosis.

El universo de análisis estuvo constituido por 152 sueros, todas fueron la primeras muestras de pacientes sospechosos de Leptospirosis, 17 muestras analizadas por la prueba de referencia (MAT) con títulos mayores o igual de 1:20 con notable seroconversión, correspondiendo el 100% de sueros positivos diagnosticados entre Enero y Marzo del 2009, también se procesaron 135 Sueros MAT negativos todos diagnosticados, los cuales están almacenados a -75°C en la seroteca del Laboratorio Nacional de Vigilancia sección de Bacteriología.

Las muestras fueron tomadas por punciones venosas y remitidas con su ficha epidemiológica respectiva(ver anexo 1) al Laboratorio Nacional de Bacteriología de los diferentes Laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios ubicados en los diferentes departamentos del País.

Las muestras seleccionadas se sometieron a su vez a la prueba de inmunocromatografía *Leptospira* IgG/IgM, Bioline®.

El análisis de los datos se efectuó a partir del registro de los datos vaciados en una tabla de doble entrada utilizando el programa Excel 2007, También el análisis de los datos fue realizado con el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados Versión 3.0 (EPIDAT versión 3.0). La información fue guardada en el programa Microsoft EXEL 2007 lo que permitió los cálculos de la test de sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de la prueba. Se construyeron intervalos de confianza para la proporción con un 95% de confiabilidad. La comparación de los grupos se hizo mediante la prueba de hipótesis para la proporción con nivel de significación de 5%.

Para realizar este estudio se consideraron las siguientes variables

1. Sexo: Características biológicas que distinguen al hombre de la mujer Se refiere exclusivamente al ámbito de lo biológico y lo natural, a las diferencias biológicas entre personas, las que determinan la presencia del cromosoma X o Y en el cuerpo humano.

Masculino

Femenino

2. Edad en Grupo Etario: Dicho de varias personas: Que tienen la misma edad..

Grupos de edades (años)
< 10
10 – 19
20 – 29
30 – 39
40 – 49
50 y más

3. Lugar de procedencia: Origen, principio del que algo procede: su familia es de procedencia irlandesa.

Urbano

Rural

4. Ocupación: Trabajo que una persona realiza a cambio de dinero y de manera más o menos continuada.

Ocupación
Agropecuario
Comerciante
Obrero
Labor doméstica
Administrativo
Profesionales
Estudiante
Otra
Ninguna
Menor de 5 años

5. Tiempo de evolución. Medida del tiempo que transcurre desde el diagnóstico (o tratamiento) de una enfermedad hasta que la enfermedad empieza a empeorar.

Tiempo de evolución (días)
1 – 7
8 – 14
15 – 21
22 – 28
29 y más

6. Letalidad: es la proporción de personas que mueren por una enfermedad entre los afectados por la misma en un periodo y área determinados. Es un indicador de la virulencia o de la gravedad de una enfermedad.

7. Especificidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos. A partir de una tabla como la Tabla 1, la especificidad se estimaría como:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

De ahí que también sea denominada “fracción de verdaderos negativos (FVN)”.

8. Sensibilidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

Cuando los datos obtenidos a partir de una muestra de pacientes se clasifican en una tabla como la que se muestra en la tabla siguiente:

Tabla1 Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad

		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia	
		Positivo	Negativo
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
	Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Es fácil estimar a partir de ella la sensibilidad como la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica. Es decir:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

De ahí que también la sensibilidad se conozca como “fracción de verdaderos positivos (FVP)”.

9. Valor Predictivo Positivo: Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

10. Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

11. Costo de ambas pruebas: Se denomina '**coste**' o **costo** al montante económico que representa la fabricación de cualquier componente o producto, o la prestación de cualquier servicio.

12. Prueba del MAT

La MAT cuantitativa se realiza como prueba de referencia para comparar la prueba rápida en estudio. Para ejecutar MAT se utiliza PBS, el suero se diluye 1:10 en PBS, posteriormente se le agrega 5 µl de suero del paciente y se hacen diluciones dobles

consecutivas 1:2 en PBS y finalmente se añade 25 µl del pool de 16 serogrupo de *L. interrogans sensu lato* en todos los pocillos incubar a 35 °C durante 1 hora. Los resultados serán interpretados al microscopio en campos oscuro mediante una aglutinación de las leptospiras en un 50% por campo un suero negativo para IgM será cuando se observa lo siguiente:

a) cuando MAT es no reactivo o sea ausencia de aglutinación o aglutinación menor del 50%

b) cuando el MAT tiene un título de reactividad con aglutinación igual o mayor al 50%. El tiempo aproximado entre la toma de muestra y el resultado es de aproximadamente de una semana y media.

Materiales necesarios

- Medio de cultivo liquido para leptospiras (EMJH o Korthof)
- Panel de cepas de referencia de los 15 serogrupos
- Cultivo de cepas de leptospiras con concentración de 2×10^8 leptospiras/mL sin autoaglutinación (Ej. Cultivo de 5 – 7 días).
- Sueros policlonales de referencia de los 23 serogrupos (útil para el control de calidad del panel de cepas utilizado para la MAT y para la clasificación de cepas autóctonas)
- PBS pH 7,2 -7,4 (Cloruro de sodio, Cloruro de potasio, Fosfato di-básico de Sodio, y Fosfato de Potasio)
- Tubos de cristal con tapas de rosca 16 x 125
- Pipetas de cristal 1 mL, 5 mL, y 10 mL
- Pipet aid o auxiliar de pipeteado
- Micropipetas 1 canal de 2 a 20 µL, de 20 a 200 µL y 200 a 1 000 µL
- Micropipetas 12 canales de 5 a 50 µL y de 50 a 300 µL
- Laminas Porta objetos para microscopía
- Placas de 96 pocillos fondo plano o en U
- Puntas amarillas
- Puntas azules
- Viales de 1,5 mL

- Microscopio óptico con aditamentos para campo oscuro, y con objetivos 10X y oculares 20X
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora para 30°C
- Freezer -20°C
- Refrigerador 4 °C
- Gradillas
- Dispensadores o canales
- Guantes
- Desinfectante

13. Prueba inmunocromatografica (leptospira IgM/IgG, Bioline)

La Prueba rápida: Es una técnica Inmunocromatográfica que detecta cualitativamente y diferencialmente anticuerpos de la clase IgG y/o IgM contra antígenos de *leptospiras interrogans* en el suero o plasma humano. En la tira de soporte solidó (papel de nitrocelulosa) encontramos adherido covalentemente el antígeno. En una microplaca se le añade 4 gotas de un buffer, posteriormente se le adiciono 5 µl de muestra de suero, luego se incubo a temperatura ambiente durante 20 minutos y finalmente se hizo la lectura correspondiente. Los resultados se interpretaron según la aparición de banda de tal manera que: a) sitio de banda para IgG es IgG positivo, b) sitio de banda para IgM es IgM positivo, c) si aparecen simultáneamente ambas bandas es IgG e IgM positivos y d) ausencia de banda el resultado es negativo para ambos anticuerpos. El tiempo aproximado entre la toma de muestra y el resultado es de aproximadamente veinte minutos.

Materiales necesarios:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------|
| ➤ Prueba Rapida | Gradillas |
| ➤ Guantes | Refrigerador 4 °C |
| ➤ Micropipetas 1 canal de 2 a 20 µL | |
| ➤ Puntas amarillas | |
| ➤ Viales de 1,5 mL | |
| ➤ Freezer -20° | |

VI. RESULTADOS

Con respecto a los positivos por sexo podemos decir que el 4,7% fueron masculinos y el 4,1% son femeninos y para los negativos corresponde a un 52,0% para los masculinos y un 39,2% para los femeninos. (Tabla 1)

Tabla 1 Distribución de los verdaderos positivos y negativos de casos de leptospirosis según sexo Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Sexo	Verdaderos				Total
	Positivos		Negativos		
	No.	%	No.	%	
Masculino	7	4,7	77	52,0	84
Femenino	6	4,1	58	39,2	64
Total	13	8,8	135	91,2	148

Nota: los porcentajes fueron calculados del total de muestras verdaderas

Al examinarse los datos por edades se observó que los menores de 10 años el 2,0% de positividad y un 18,2% fueron negativos, para el rango de edad de 10-19 años la positividad fue de 2,7% y 24,3% negativos, para el rango de edad de 20-29 años la positividad fue de un 1,4% y negativos fueron 24,3%, en el rango de 30-39 fueron positivos un total de 1,4% y un 8,1%, para el rango de 40-49 años la positividad fue de 0,7% y los negativos salió un 8,4% y para los mayores de 50 años salió positivo el 0,7% y un 7,4% negativos. (Tabla 2)

Tabla 2 Distribución de los verdaderos positivos y negativos de casos de leptospirosis según edad Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Grupos de edades (años)	Verdaderos				Total
	Positivo		Negativo		
	No.	%	No.	%	
< 10	3	2,0	26	18,2	29
10 – 19	4	2,7	35	24,3	39
20 – 29	2	1,4	35	24,3	37
30 – 39	2	1,4	11	8,1	13
40 – 49	1	0,7	12	8,4	13
50 y más	1	0,7	10	7,4	17
Total	13	8,8	135	91,2	148

Nota: los porcentajes fueron calculados del total de muestras verdaderas

De los 18 departamentos que tiene Honduras el departamento que mas muestras ha enviado es el departamento de Cortes con 41 muestras seguido de Francisco Morazán con 40, después le sigue Colon con 17 muestras y Choluteca con 15, Santa Barbara tiene 5, Comayagua, Intibucá y Yoro son 4 muestras, Atlántida, El paraíso y Olancho tienen 3 muestras, Gracias a Dios, La Paz y Lempira remitieron solo 2 muestras, Copan y Ocotepeque realizaron 1 muestra.

El departamento que más positivos tiene dentro de las muestras que enviaron es Colon con un 4,1%, seguido por Choluteca con un 2,6%, luego Cortes con un 1,4% y por ultimo Santa Barbara con un 0,7%, el resto de los departamento no presentaron positividad en las muestras enviadas.

En el caso de los negativos el departamento con mayor numero de negativos fueron Cortes y Francisco Morazan con un 27,0%, seguidos por Choluteca y Colon con un 7,4% después se encuentra Comayagua, Francisco Morazan, Intibuca, Santa Barbara, y Yoro con un porcentaje de 2,7% encontrándose Atlantida, El paraíso y olancho con un 2,0%, después le siguen Gracias a Dios, La Paz, Lempira con un 1,4%, y por ultimo se encuentra copan y Ocotepeque con 0,7% (Tabla 3)

Tabla 3 Distribución de los verdaderos positivos y negativos de casos de leptospirosis según Departamento. Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Departamento	Verdaderos				Total
	Positivo		Negativo		
	No.	%	No.	%	
Atlántida	0	0,0	3	2,0	3
Choluteca	4	2,6	11	7,4	15
Colón	6	4,1	11	7,4	17
Comayagua	0	0,0	4	2,7	4
Copán	0	0,0	1	0,7	1
Cortés	2	1,4	40	27,0	41
El Paraíso	0	0,0	3	2,0	3
Francisco Morazán	0	0,0	40	27,0	40
Gracias a Dios	0	0,0	2	1,4	2
Intibucá	0	0,0	4	2,7	4
La Paz	0	0,0	2	1,4	2
Lempira	0	0,0	2	1,4	2
Ocatepeque	0	0,0	1	0,7	1
Olancho	0	0,0	3	2,0	3
Santa Bárbara	1	0,7	4	2,7	5
Yoro	0	0,0	4	2,7	4
Total	13	8,8	135	91,2	148

Nota: los porcentajes fueron calculados del total de muestras verdaderas

Para la ocupación de los pacientes se determinó que las personas tenían mayor porcentaje de positividad fueron las que se dedican a las actividades agropecuarias con un 2,7% seguidas labores domésticas y estudiantes tienen un porcentaje de

2,0%, las personas que se dedican al comercio, los obreros y los niños menores de 5 años un resultado de 0,7%. (Tabla 4)

Tabla 4 Distribución de los verdaderos positivos y negativos de casos de leptospirosis según ocupación.
Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Ocupación	Verdaderos				Total
	Positivo		Negativo		
	No.	%	No.	%	
Agropecuario	4	2,7	9	6,1	13
Comerciante	1	0,7	7	4,7	8
Obrero	1	0,7	10	6,8	11
Labor doméstica	3	2,0	23	15,6	26
Administrativo	0	0,0	10	6,8	10
Profesionales	0	0,0	3	2,0	3
Estudiante	3	2,0	38	25,6	41
Otra	0	0,0	3	2,0	3
Ninguna	0	0,0	22	14,8	22
Menor de 5 años	1	0,7	10	6,8	11
Total	13	8,8	135	91.2	148

Nota: los porcentajes fueron calculados del total de muestras verdaderas

Para el tiempo de evolución de la enfermedad la prueba pudo detectar en el rango de 1-7 días el 15.2% de los casos, 8-14 días el 46.2%, de 15-21 días el 15.4%, en el rango de 22-28 días se detectó el 7.7% y 29 días y más se detectó un 15,4% de positivos. (Tabla 5)

Tabla 5 Distribución de los verdaderos positivos de casos de leptospirosis según tiempo de evolución de la enfermedad
Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Tiempo de evolución (días)	No.	%
1 – 7	2	15,4
8 – 14	6	46,2
15 – 21	2	15,4
22 – 28	1	7,7
29 y más	2	15,4
Total	13	100,0

La tasa de mortalidad fue de un 7.7% y la tasa de supervivencia fue de un 92.3%.
(Tabla 6)

Tabla 6 Distribución de los verdaderos positivos de casos de leptospirosis según supervivencia Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Supervivencia	No.	%
Vivos	12	92,3
Fallecidos	1*	7,7
Total	13	100,0

* Sexo Masculino de ocupación agricultor

El procesamiento del grupo de sueros positivos por la prueba de MAT determinó aglutinaciones con las siete serovariedades de *Leptospira spp* de 15 serovariedades existentes en el cepario, en títulos mayores a 1:20 así: *L. interrogans Pomona* con un 35.2%, *L. interrogans Cynopteri* y *L. Tarassovi* con 17.6%, *L. interrogans Javanica* con 11.8%, *L. interrogans Bataviae*, *Australis* e *Icterohaemorrhagiae* con 5.9% respectivamente. (Tabla 7)

Tabla 7 Serovariedades identificadas por MAT en el Laboratorio Nacional de Vigilancia de Bacteriología de Honduras durante el Primer semestre año 2009

Serovariedad	Frecuencia	Porcentaje
<i>Pomona</i>	6	35.2%
<i>Cynopteri</i>	3	17.6%
<i>Tarassovi</i>	3	17.6%
<i>Javanica</i>	2	11.8%
<i>Bataviae</i>	1	5.9%
<i>Australis</i>	1	5.9%
<i>Icterohemorrhagiae</i>	1	5.9%
Total	17	100%

Se presentaron coaglutinaciones con más de dos serovares de *Leptospira spp* en 61,22% de las muestras. Se consideró el serovar infectante como aquel en donde se registró el mayor título en una o en dos muestras pareadas.

Los resultados obtenidos demostraron que la prueba rápida inmunocromatografica tuvo una sensibilidad para detectar el **76.5%** (IC95% 49.76% a 92.18%) de los sueros del grupo de positivos una confiabilidad del 95 %. Por su parte, la prueba rápida detectó como negativas todas las muestras del grupo de verdaderos negativos, lo que es equivalente a una especificidad de **100%**. El valor predictivo negativo de la prueba fue de **97.1%** (IC95% 92.34 a 99.07%) y el valor predictivo positivo fue de **100%** (Ver Tabla 8)

Tabla 8 Resultados de la prueba en estudio y la confirmatoria para el diagnóstico rápido de leptospirosis. Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Inmunocromatografía	MAT				Total	
	Positivo		Negativo			
	No.	%	No.	%	No.	%
Positivo	13	76,5	0	0,0	13	8,6
Negativo	4	23,5	135	100,0	139	91,4
Total	17	100,0	135	100,0	152	100,0

Sensibilidad: 76.5%

Valor predictivo positivo: 100.0%

Especificidad: 100.0%

Valor predictivo negativo: 97.1%

De las 17 muestras que detecto como positivas la prueba rápida el 82.4% dieron resultado IgM positivo mientras que el 17.6% dio resultado IgG positivo. (Ver tabla 9)

Tabla 9 Porcentaje de detección de inmunoglobulinas en la prueba rápida

Inmunoglobulina	Numero de muestra	Porcentaje de Positividad
IgM	14	82.4%
IgG	3	17.6%
Total	17	100%

Hay reportes de una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92% y 95%, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95 % y negativo 100 % (Hickey, 2002). (Ver tabla 10)

Tabla 10 Comparación de la Sensibilidad, Especificidad y valor Predictivo Positivo y Negativo de la prueba Rápida en evaluación contra la MAT

Análisis	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
MAT	92%	95%	95%	100%
Prueba Rápida	76.5%	100%	100%	97.1%

Al hacer una comparación del costo total por prueba MAT realizada a las 152 muestras fue de US \$ 2,280 dando así un costo por prueba MAT de US\$ 15.00 y el costo de la prueba rápida en el total de las muestras fue de US\$ 957.6 y el costo por prueba rápida fue de US\$ 6.30 en donde la diferencia por costo total de US\$ 1322.4, de este modo la secretaria de salud pública de Honduras pudo haber ahorrado un 42% en total de las muestras analizadas solo por prueba rápida, (Tabla 11)

Tabla 11 Estimación de costo total según tipo de prueba.

Laboratorio Nacional de Vigilancia, 2009

Prueba	Costo por prueba (USD)
MAT	15,00
Inmunocromatografía	6,30

VII. Discusión de Resultados

El predominio del sexo masculino se explica por ser el hombre el que está más expuesto a las fuentes de contagio en la realización de labores agrícolas, o también expuesto a condiciones adversas que propician el contacto directo o indirecto con roedores en aguas contaminadas en el campo, zonas inundadas, alcantarillado⁷³. La edad, es considerada el factor más importante del huésped que contribuye a que aumente la mortalidad^{74, 75, 76} y el presente estudio se demuestra que la presencia de anticuerpos fue más alta en el grupo de adultos mayores y esto ha sido explicado por la hipótesis de que la exposición continua a través de la vida puede resultar en un incremento edad dependiente de la seropositividad de anticuerpos. En otras palabras podemos decir que a mayor exposición mayor título de anticuerpos⁷⁷.

En Honduras la enfermedad está totalmente distribuida en todo el país donde se han obtenido datos de la presencia de ésta enfermedad en todos los departamentos y los resultados del estudio indican que la población más expuesta corresponde a los trabajadores rurales los cuales en Honduras son aproximadamente 3,845,324 habitantes de los cuales 989,000 realizan actividades de ganadería, lechería o cría de cerdos, (Fuente: Encuesta Permanente de Hogares y de Propósitos Múltiples del INE 2008) seguido por los Estudiantes que son aproximadamente 2,257,331 para primaria, secundaria y nivel superior (HONDURAS EN CIFRAS, BANCO Central de Honduras)

Se encontró que el diagnóstico se realiza mejor entre 8 – 14 días de evolución esto se debe a la gran cantidad de anticuerpos tanto IgM como IgG presentes en la muestra.

⁷³ Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. J Small Anim Pract 1998;39(5):231-6.

⁷⁴ Sanford JP. Leptospirosis. En: Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB. Tratado de medicina interna de Cecil. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1984:636-40

⁷⁵ Benenson AS. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. En: OPS. Informe Oficial de la Asociación Estadounidense de la Salud Pública. Washington, DC, 1997:294-7.

⁷⁶ Martone WJ. Infecciones producidas por leptospiras (leptospirosis). En: Stein HL. Tratado de medicina interna. La Habana: Editorial Científico Técnica, 1988:1794-6.

⁷⁷ Ferguson I. Leptospirosis en Surveinllance. Comn Disp Resp CDR Rev 1993;26(3):47-8.

El diagnóstico de la leptospirosis es difícil y son muchas las enfermedades con manifestaciones clínicas similares por el cual el uso del laboratorio es necesario para confirmar el diagnóstico de leptospirosis y para apoyar las acciones de control y de prevención. El MAT es la prueba de referencia de la OMS y aumenta su confiabilidad cuantos más serovares de referencia y aislamientos locales se utilicen en la reacción⁷⁸

En el país, además de la prueba de MAT, algunos laboratorios realizan pruebas serológicas comerciales tipo ELISA u otras. Cuando éste es el caso, el clínico debe entender que estas pruebas pueden tener valores de sensibilidad y especificidad que varían de acuerdo a la población y al tipo de antígeno empleado⁷⁹. Cabe anotar que en países donde estas evaluaciones se han llevado a cabo, los rangos de sensibilidad para diferentes fases de la enfermedad van desde el 25% hasta el 92% para diferentes pruebas comerciales⁸⁰.

En un estudio realizado en Colombia en 2001 comparó las técnicas serológicas PanBio IgM ELISA y MAT en el diagnóstico de leptospirosis, se obtuvo un valor de sensibilidad del 29% para PanBio⁸¹

Al compararla con el MAT, la prueba de inmunocromatografía tiene la ventaja de no requerir el mantenimiento de un gran cepario en continuo repique, posibilidad que se restringe a laboratorios de referencia.

Además, por utilizar una cepa no patógena de *Leptospira*, se reduce el riesgo de infección ocupacional entre el personal del laboratorio que la ejecuta. Las investigaciones de otros grupos de estudio han encontrado que la prueba tiene una

⁷⁸ World Health Organization. International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control 2003. Consultado: 05/05/2005.

⁷⁹ Effler PV, Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, Sasaki DM. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. J Clin Microbiol 2002;40:1464-9.

⁸⁰ Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 2003;41:803-9.

⁸¹ Astudillo H.M, Parra B, Corral R, Barona G, Muñoz E.P, Rengifo G.

sensibilidad de 40, 48 y 89,2% y una especificidad de 85, 97 y 100%⁸². Los niveles variables de sensibilidad de la prueba pueden deberse a las diferencias en los antígenos utilizados y a las diferentes fases de la enfermedad en que se encontraban los pacientes cuando les fue tomada la muestra. Los datos de especificidad son comparables con los de los estudios referenciados, coinciden con nuestro estudio en que la prueba inmunocromatografía es una prueba específica, lo que es ventajoso para el clínico en el momento de definir el diagnóstico de una enfermedad con síntomas tan inespecíficos.

La inmunocromatografía es una prueba género específica que puede usarse como prueba de tamizaje de la infección antigua por la detección de IgG y como prueba de diagnóstico de la infección reciente monitorizando IgM. Los anticuerpos género específicos aparecen más temprano que los anticuerpos serovar específicos⁸³, lo que resulta ventajoso, especialmente en pruebas que detectan IgM, y útil para el diagnóstico de la enfermedad, facilitando el inicio oportuno del tratamiento para así evitar complicaciones. Es recomendable entonces que el clínico remita a un diagnóstico serológico por inmunocromatografía ante la sospecha inicial de un caso de leptospirosis con el fin de aumentar la posibilidad de registrar los anticuerpos género específicos que la prueba detecta y así aumentar su sensibilidad.

En cuanto a los costos de ambas pruebas a pesar de utilizar los mismos equipos la prueba de MAT se hace más costosa en relación a la prueba rápida que validamos dado que se complejiza por el mantenimiento de un cepario, que cuyo costo esta alrededor de 10 USD.

La incorporación del uso de pruebas rápidas resultó ser más efectiva en función del costo para el diagnóstico de la leptospirosis y su implementación le permitiría a la Secretaria de Salud de Honduras ahorrar aproximadamente un 42% además de evitar casos grave y muertes por esa enfermedad.

⁸² Pradutkanchana S, Pradutkanchana J, Khuntikij P. Detection of IgM specific antibody using indirect immunofluorescent assay for diagnosis of acute leptospirosis. J Med Assoc Thai 2003;86:641-6.

⁸³ World Health Organization. International Leptospirosis Society. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control 2003. Consultado: 05/05/2005.

El diagnóstico sin uso de pruebas rápidas, empleado en la actualidad, resultó la menos efectiva; el elevado número de tratamientos inoportunos o inapropiados, el mayor número de complicaciones y de muertes y el elevado costo que todo ello conlleva, la convierten en diagnóstico menos indicado. En general, cualquier factor como el diagnóstico y el tratamiento tardíos que contribuya a prolongar la enfermedad sin administrar el tratamiento adecuado incrementa las complicaciones, la presencia de la bacteria en el organismo del enfermo y la probabilidad de que la infección evolucione a formas graves.

VIII. Conclusiones

- Los verdaderos positivos y negativos predominan en el sexo masculino mientras que el mayor número de casos sospechosos estuvieron comprendidos en las edades de 10 a 29 años sin embargo el mayor número de positivos estuvieron por debajo de los 19 años de edad.
- Siendo la leptospirosis una infección transmisible y sujeta a condiciones socio-económicas que predisponen la enfermedad con este estudio se puede concluir que los departamentos de Cortes, Francisco Morazán y Colon fueron los que más aportaron con el número de casos sospechosos mientras que los verdaderos positivos predominaron en el departamento de Colon seguido de Choluteca.
- Los casos positivos predominaron en el sector agropecuario seguido por labores domésticas, con una evolución de la enfermedad que osciló entre 8-14 días.
- La supervivencia de los positivos fue superior a los fallecidos siendo el único fallecido de ocupación agropecuaria y de sexo masculino.
- En la técnica probada frente al MAT en personas con sospecha de la enfermedad, existe validez y concordancia en sus resultados.
- La prueba inmunocromatográfica puede constituir un diagnóstico presuntivo ya permite la detección de anticuerpos en la primera semana de evolución de la enfermedad en donde los resultados inmediatos son relevantes, logrando así una posibilidad terapéutica inmediata, permitiendo una disminución en la tasa de mortalidad.
- La prueba de inmunocromatografía no requiere de equipo especializado, gran cantidad de materiales, ni personal con alta experiencia en el diagnóstico de leptospirosis para su realización.
- La incorporación de pruebas rápidas resultó ser más conveniente en función del costo para el diagnóstico de leptospirosis y su implementación le permitirá a la Secretaría de Salud Pública ahorrar aproximadamente 42% por paciente sospechoso además de tener un valor social porque reduce la mortalidad.

• IX. Recomendaciones

- ❖ Basados en los resultados de nuestro estudio en donde las edades que han padecido de leptospirosis son menores de 19 años, por lo que resulta necesario tomar acciones de salud que logren eliminar este problema, recomendamos realizar intervenciones de promoción y prevención en estas etapas de la vida.
- ❖ Siendo la leptospirosis una enfermedad recurrente en nuestro país y donde se han observado un considerable número de casos en los períodos de grandes precipitaciones pluviales, que es lo habitualmente esperado, ya que como es conocido, las abundantes lluvias al caer en terrenos mal drenados se acumulan y le brindan a las leptospiras un ambiente favorable para su desarrollo, elementos que asociados a un alto grado de humedad ambiental y las temperaturas elevadas, típicas de nuestro país, originan la permanencia viable de ellas en esta agua estancada provocando la infección del hombre durante semanas, aumentando así la incidencia de esta enfermedad en Honduras, dado que la SD leptó permite la identificación rápida y diferencial de anticuerpos anti leptospirales es conveniente su uso para el diagnóstico de la leptospirosis humana en la red nacional de laboratorios lo que permitirá la aplicación del tratamiento de forma INMEDIATA disminuyendo la mortalidad drásticamente.
- ❖ La evaluación económica de intervenciones sanitarias ha experimentado un fuerte desarrollo durante los últimos años. La necesidad de conciliar unos recursos limitados con una demanda cada vez mayor, ha hecho que el criterio de eficiencia haya empezado a utilizarse en el establecimiento de prioridades por parte de gestores y políticos sanitarios, fundado en que uno de los objetivos del estudio era estimar el costo de ambas pruebas recomendamos realizar estudios posteriores sobre costo-efectividad de las pruebas de leptospirosis.

X BIBLIOGRAFÍA

1. Adler, B., A. M. Murphy, S. A. Locarnini, and S. Faine. 1980. Detection of specific antileptospiral immunoglobulin M and G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 11:452-457.
2. Alonso- Andicoberry, C., García-Peña, F.J., Pereira Bueno, J., Costas, E. and Ortega-Moral, M. 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev. Vet. Med.* 52:109-¹¹⁷
3. Arimitsu, Y., Fukumura, K. and Shintaki, Y. 1989. Distribution of Leptospirosis among stray dogs in the Okinawa Islands, Japan: comparison of the microcapsule and microscopic agglutination tests. *Br. Vet. J.* 145:473-477
4. Arimitsu, Y., S. Kobayashi, K. Akama, and T. Matuhasi. 1982. Development of a simple serological method for diagnosing leptospirosis: a microcapsule agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 15:835-841.
5. Barr, B. C. y Anderson, M. L. 1993. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Vet. Clin.North. Am. Food Anim. Pract.* 9: 343-368
6. Bofill, P., Rivas, A., Ramírez, W. Montañez, J., Martínez, A., Quincoses, T., Reinaldo, L. y Fuentes, E. 1996. Manual de Enfermedades Infecciosas. Tomo # Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos del Instituto Politécnico Nacional, México, 139-187
7. Ellis W.A. 1996. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8
8. Ellis W.A. 1998. Leptospirosis. OIE Manual: Amedment I, 1-8
9. Espinoza L. 1975. datos registrados en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario
10. Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*, 2nd ed. Med. Sci. Melbourne, Australia
11. Galeas S y Orellana B. 2005. Vigilancia seroepidemiológica de leptospirosis en Honduras entre 1195 al 2005. Datos registrados en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario

12. Ginebra, G. A. Olga. 2001. Microorganismos Espirales. En: Llop H. Alina, Valdés-Dapena V. M., Zuazo, S.J. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo 1. Ed. Ciencia Médica Ciudad de La Habana. 37:388-415.
13. Greenlee, J.J. 2002. The diagnosis and description of experimental Leptospirosis in dogs. Memorias XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Habana, Cuba
14. Guerreiro H, Croada J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis MG, Levett PN, Ko A, Haake DA. 2001. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. Infection and Immunity. 69: 4958–4968
15. Gussenhoven GC, Van der Horn MAWG, Goris MGA. Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, Van Ingen CW, Smith HL. 1997. LEPTO Dipstick, a Dipstick Assay for Detection of Leptospira-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Sera. J Clin Microbiol. 35: 92–97
16. Haake, D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology 146:1491-1504
17. Hartskeerl, R., Smith, H., Korver, H., Goris, M. and Terstra, W. 2000. International Course on Laboratory Methods for diagnosis of Leptospirosis. Royal Institute. Amsterdam, Holland
18. Hathaway, S.C., Little, T.W.A. and Pritchard, D.G. 1986. Problems associated with the serological diagnosis of Leptospira Interrogans serovar hardjo infection in bovine population. Vet. Rec., 119:84-86
19. Herrera Blanca. 2002. Diagnostico de Laboratorio. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.27-34
20. http://www.standardia.com/html_s/mn03/mn03_01_00.asp?intId=40
21. IHIMV. 1964. Notas registradas en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario
22. Inada, R., Y. Ido, R. Hoki, R. Kaneko, and H. Ito. 1916. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med. 23:377–402.

23. Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras. Año Manual de Marchas Técnicas Utilizadas en el Diagnóstico Microbiológico de la Leptospirosis. Instituto de Parasitología "Kouri" (IPK), Habana-Cuba
24. Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Reviews. 14: 296–326 p.
25. Martínez, M. G., Matos, K. T., Da Silva, M. V and. Abreu. M. T. de. 1998. Ocular manifestations in the acute phase of leptospirosis. Ocul. Immunol. Inflamm. 6:75-79
26. Matsuo, K., E. Isogai, and Y. Araki. 2000. Utilization of exocellular mannan from *Rhodotorula glutinis* as an immunoreactive antigen in diagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 38:3750–3754
27. Mazzonelli, J. 1994. Tecnicas actuales de laboratorio de diagnostico de leptospirosis. Rev. Lab. 77(457):9-18
28. Ministerio de Salud Publica, Dirección Nacional de Epidemiología, 1997. Programa nacional de prevención y control de Leptospirosis humana.
29. Orellana B, Velásquez, Carrasco J. 2005. Estudio epidemiológico de leptospirosis en la comunidad de Malguarita, Támara, Francisco Morazán Memoria XVII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras. 132-133
30. Orellana BM, Carrasco J. 2002. *Leptospira* sp. Aislada de muestras de agua potable y riego, identificada como *Leptospira interrogans* mediante métodos inmunoserológicos y moleculares (PCR). XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM), VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, III congreso Cubano de Medicina Tropical. Habana, Cuba.
31. Pineda L P, Orellana B, Carrasco J. 2000. Desarrollo y estandarización del PCR-IS1533 para detectar DNA de *Leptospira* y diferenciar los serovares de *Leptospira interrogans*. Memoria XII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.
32. Pineda L, Sanchez C, Garcia-Suarez R, Carrasco J. 2000. Implementación y estandarización de una prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de leptospirosis. Memoria XII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.

33. Prescott, J.F. 1993. Leptospirosis, In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (Eds.) Pathology of domestic animals. Academic Press, Inc, 4th edition. 503-511.
34. Ruiz A y Colaboradores. 1980. Aislamiento de *Leptospira* en fetos de bovino. Datos registrados en el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinario
35. Savio, L.E. Linder, 2002. Leptospirosis Humana. Clínica y diagnósticos diferenciales. En: Guía de Control y Manejo de Leptospirosis. OPS/HCP/HCV/URU.ZOO.11-15
36. SD BIOLINE *Leptospira*.
37. Secretaria de Salud Pública Honduras/Unidad de Zoonosis. 2003. Manual para el diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Leptospirosis. 1ra. Edición 19 p
38. Secretaria de Salud Publica/Honduras/Guatemala/Costa Rica/El Salvador/Panamá/Rep. Dominicana. 1999-2000 Manual Sub-Regional de Normas de Bioseguridad para Laboratorios de Salud Publica y Programa de Reconstrucción Post-Huracanes Gorge y Match
39. Senia R, Rivera RL, Pineda L, Rivera R. 2003. Prevalencia de anticuerpos contra *L. interrogans* en trabajadores de alcantarilla. Memoria XIV semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras. 110
40. Smith C.R., Ketterer P.J., McGowan M.R. and Corney, B.G., 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aus. Vet. J. 71, 290-294
41. Soley I, Carrasco J. 2000. Desarrollo y estandarización de PCR-IS1533 para detectar *Leptospira* en órganos de roedores selváticos. Memoria VII Jornada científica de las Ciencias Biológicas y de la Salud Facultad de Ciencias Médicas. UIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.
42. Thiermann, A.B. and Garret, L.A. 1983. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle. Am. J. Vet. Res. 44, 884-887

43. Thiermann, A.B. and Handsaker, A.L. 1985. Experimental infection of calves with *Leptospira interrogans* serovar hardjo: conjunctival versus intravenous route of exposure. *Am. J. Vet. Res.*, 46:329-331
44. Trevejo, R. T., J. G. Rigau-Perez, D. A. Ashford, E. M. McClure, C. Jarquin Gonzalez, J. J. J. Amador. O. de los Reyes, A. Gonzalez, S. R. Zaki, W. J. Shieh, R. G. McLean, R. S. Nasci, R. S. Weyant, C. A. Bolin, S. L. Bragg, B. A. Perkins, and R. A. Spiegel. 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary haemorrhage—Nicaragua, 1995. *J. Infect. Dis.* 178:1457–1463
45. Valencia L, Bu A, Morales C, Carrasco J. 2006. Desarrollo y estandarización de ELISA IgM en pacientes con Leptospirosis agudos tamizados mediante la técnica serológica de MAT. Memoria XVII semana Científica. DIC-UNAH. Tegucigalpa, Honduras.
46. Wagenaar, J., Zuerner, R. L., Alt, D. and. Bolin, C. A. 2000. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 61:316-20
47. Weil, A. 1886. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsche. Arch. Klin. Med.* 39:209–232.
48. WHO/CDC. 2004. Laboratory Biosafety Manual. 3ra. Edicion

XI Anexos

Anexo 1

FICHA DE INVESTIGACIÓN DE CASO SOSPECHOSO DE LEPTOSPIROSIS

Región _____ Área No. _____ US _____ Sala _____
Nombre del Paciente: _____ Historia Clínica No. _____
Edad: _____ Sexo: _____ Dirección _____
Localidad _____ Municipio: _____ Depto: _____ Teléf. _____
Ocupación: _____ Lugar de Trabajo: _____

Fecha de inicio de síntomas: _____ Fecha de consulta: _____ fecha de Hospitalización: _____

Signos y Síntomas	SI	NO	Signos y Síntomas	SI	NO
Fiebre de Inicio Brusco			Manifestaciones Insuficiencia Renal (anuria, oliguria, proteinuria)		
Dolor de cabeza (cefalea)			Ictericia		
Malestar general/ postración			Manif. Hemorragias (incluyendo intestinales y pulmonares)		
Mialgias			Arritmia/insuficiencia cardíaca		
Dolor en pantorrillas			Erupción cutánea (rash)		
Irritación conjuntival			Náuseas, Vómitos		
Irritación meníngea			Dolor abdominal		
Diarrea			Artralgias		
Disnea			Escalofríos		
Incremento de la CPK					

ANTECEDENTES:

A.- Exposición o contacto ocurrido entre 4 y 20 días antes de iniciar los síntomas

Exposición a:	SI	NO	Antecedentes de:	SI	NO
Aguas estancadas/ inundaciones			Contacto con perros		
Terreno lodoso			Contacto con cerdos		
Letrinas/Desagües /Alcantarillas			Contacto con bovinos		
Bañeros no controlados			Roedores en vivienda o cercanía		

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Fecha de toma de 1era Muestra: ____/____/____ Técnica Utilizada: _____
Fecha del Resultado: ____/____/____ No Reactivo ____ Reactivo ____ Serotipo y Título _____
Fecha de toma de Segunda Muestra sangre: ____/____/____ Técnica Utilizada: _____
Fecha de Resultado Resultado: Positivo ____/____/____ No Reactivo ____ Reactivo ____ Serotipo y Título _____

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Dengue: No Concluyente _____ Negativo: _____ Positivo: _____ Serotipo: _____
Hematozooario: Negativo _____ Positivo _____
Hepatitis A: Negativo _____ Positivo _____
Virus Hanta: Negativo _____ Positivo _____

Condición Final del Paciente: Mejorado _____ Fallecido _____ Fecha: ____/____/____

Clasificación Final del Paciente: Confirmado Por: Laboratorio _____ Clínico Epidemiológico: _____
Descartado _____

Nombre y Firma de la Persona Responsable del Llenado de la Ficha: _____

Original: Para la US

Copia: Epidemiología regional y Programa Zoonosis Nivel Central