

Universidad de Guayaquil



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**SERODIAGNOSTICO MEDIANTE PRUEBA DE ELISA
INDIRECTA A PACIENTES SOSPECHOSOS DE
LEPTOSPIROSIS AGUDA. SANTO DOMINGO DE LOS
TSÁCHILAS, PERIODO OCTUBRE DEL 2009 A MARZO DEL
2010.**

**Tesis presentada como requisito para optar el Grado de
Magister en Medicina Tropical**

Maestrante

Dra. Elsa Fabiola Samaniego Rentería

Tutor

Dr. José M. Aguilar Reyes M. Sc.

Guayaquil- Ecuador

2013

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Esta Tesis cuya autoría corresponde a la Doctora Elsa Fabiola Samaniego Rentarí, ha sido aprobada, luego de su defensa pública, en la forma presente por el Tribunal Examinador de Grado nominado por la Universidad de Guayaquil, como requisito parcial para optar el Grado de **MAGISTER EN MEDICINA TROPICAL**

Dr. Wilson Maitta Mendoza
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Wilson Pozo Guerrero
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Medardo Lasso Pedroso
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Abg. Carmen Morán Flores
SECRETARIA
FAC. DE CIENCIAS MÉDICAS

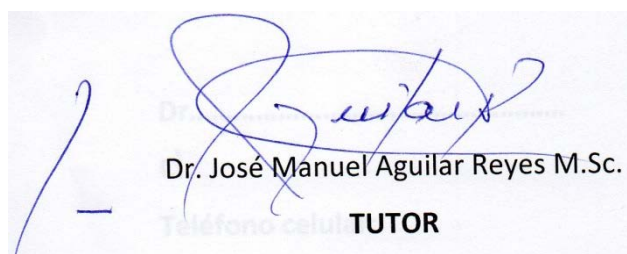
CERTIFICADO DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del trabajo de investigación de tesis para optar el Título de Magister en Medicina Tropical de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Guayaquil.

Certifico que he dirigido y revisado la tesis de grado presentada por la Doctora Elsa Fabiola Samaniego Renteria con cedula de identidad No 11-00573144

Cuyo tema de tesis es: “Serodiagnóstico mediante la prueba de Elisa Indirecta a pacientes sospechosos de Leptospirosis Aguda. Santo Domingo de los Tsáchila, periodo octubre del 2009 a marzo del 2010”

Revisada y corregida que fue la tesis, se aprobó en su totalidad, lo certifico.



Dr. José Manuel Aguilar Reyes M.Sc.
TUTOR

DEDICATORIA

A Thelmo, mi esposo, medico como yo, quien no ha muerto para nuestra familia, vigilando cauteloso nuestros pasos, alentándonos en los fracasos y estallando de alegría en los triunfos. A él con todo mi amor que no se apagará jamás.

A mis hijas, razón de vivir, quienes me han alentado pacientemente hacia esta nueva plasmación profesional. A ellas este aporte que estoy segura las enorgullecerá.

A mis nietos, reinicio de nuestras vidas saturadas de nuevos esquemas y horizontes. Que les sirva de estímulo.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron en el estudio, que marca nuevos esquemas de control de la salud pública en esta noble provincia, llamada a ser el nuevo polo de desarrollo del país.

Mi agradecimiento especial a:

- Doctor José Aguilar Reyes, Tutor del presente, mi reconocimiento elevado por su atinada conducción y apoyo constante.
- Doctor Telmo Fernández, por su tierna y profunda conducción profesional en el curso.
- Doctor Kléber Barrezueta Morillo, Jefe de los Laboratorios del Izquierda Pérez de esta ciudad, por su apoyo técnico
- A la señora Licenciada Ligia Segura. Laboratorista del Izquierda Pérez, por su apoyo técnico puntual y elevado.

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo “Realizar un estudio descriptivo exploratorio de la enfermedad utilizando la Prueba de ELISA Indirecta estandarizada con un “pool” de antígenos de *Leptospira interrogans*, de anticuerpos IgM, en muestras de suero de fase aguda de Leptospirosis humana”.

Se empleó 91 muestras de pacientes que acudieron a los centros de salud, de la ciudad de Santo Domingo, con síntomas de Dengue y con resultado negativo a ella; las cuales fueron sometidas a la prueba indicada.

Del total de muestras evaluadas por ELISA Indirecta (IgM), 21 muestras resultaron “reactivas” o positivas, que corresponde al 23%. No se encontró diferencias significativas al relacionar la enfermedad con el género, edad y área de residencia.

Se concluye que la detección de la Leptospirosis en los estados agudos iniciales, mediante la prueba de ELISA Indirecta, debe ser un procedimiento de rutina en el medio tropical, sumándose a la detección de Dengue habitual. Se recomienda revisar los planes de control ambiental y de salud pública en la ciudad, en especial el control de roedores y perros callejeros.

PALABRAS CLAVE: Leptospirosis, zoonosis, test de ELISA Indirecta, control ambiental.

ABSTRACT

This research aims to "Performing an exploratory descriptive study of disease using standardized indirect ELISA test with a" pool "of *Leptospira interrogans* antigens, IgM antibodies in serum samples from acute human leptospirosis."

We used 91 samples from patients attending health centers of the city of Santo Domingo, with symptoms of Dengue and negative to it, which were subjected to the test indicated.

Of all samples evaluated by indirect ELISA (IgM), 21 samples were "reactive" or positive, corresponding to 23%. No significant differences were found relating the disease to gender, age and area of residence.

We conclude that the detection of acute leptospirosis initial states by indirect ELISA test should be a routine procedure in the tropical environment, adding to the usual Dengue detection. We recommend reviewing the environmental control plans and public health in the city, especially the control of rodents and stray dogs.

KEYWORDS: Leptospirosis, zoonoses, Indirect ELISA test, environmental control.

INDICE

	Págs.
Aprobación de tesis.....	II
Certificado del Tutor.....	III
Dedicatoria.....	IV
Agradecimiento.....	V
Resumen español.....	VI
Resumen inglés.....	VII
Índice.....	VIII
Reposición en Ciencia y Tecnología.....	XIV
 Introducción.....	
1 Objetivos.....	1
1.1 Objetivo general.....	5
1.1.1 Objetivos específicos.....	5
1.1.2 Hipótesis.....	5
1.2 Variables.....	6
1.3 Variables Dependientes.....	6
1.3.1 Variable Independiente.....	6
1.3.2 	6
 Marco teórico.....	
2 Sección I.....	7
2.1 Definición de leptospira.....	7
2.1.1 Taxonomía.....	7
2.1.2 Sinonimia.....	8
2.1.3 Historia.....	9
2.1.4 Morfología y tinción.....	9
2.1.5 Diagnóstico epidemiológico.....	11
2.1.6 Diagnóstico clínico.....	11
2.1.7 	11

	Págs.
Sección II.....	
2.2 Métodos de laboratorio.....	12
2.2.1 Detección directa de Leptospiras.....	12
2.2.1.1 Aislamiento.....	12
2.2.1.2 Inoculación en animales.....	12
2.2.1.3 Métodos serológicos.....	13
2.2.2 MAT.....	13
2.2.2.1 ELISA Indirecto IgM.....	13
2.2.2.2 Inmunofluorescencia.....	14
2.2.2.3 Otros métodos serológicos.....	15
2.2.3 Métodos moleculares.....	16
2.2.4 Sección III: Características fisiológicas.....	16
2.3 Características fisiológicas.....	16
2.3.1 Características antigénicas.....	16
2.3.2 Distribución y transmisión.....	17
2.3.3 Periodo de incubación.....	18
2.3.4 Patogenicidad.....	21
2.3.5 Sintomatología.....	21
2.3.6 Profilaxis.- Consideraciones generales.....	22
2.3.7 Situación Nacional.....	23
2.3.8 Sección IV: Saneamiento ambiental y profilaxis.....	25
2.4 Saneamiento ambiental y profilaxis.....	25
2.4.1 Saneamiento ambiental.....	25
2.4.1.1 Medidas recuperativas.....	25
2.4.1.2	27
Materiales y métodos.....	
3 Materiales.....	30
3.1 Lugar de la investigación.....	30
3.1.1 Periodo de la investigación.....	30
3.1.2 Recursos empleados.....	30
3.1.3 Universo y muestra.....	30
3.1.4	31

	Págs.
Métodos.....	
3.2 Tipo de investigacion.....	31
3.2.1 Diseño y determinación de la muestra.....	31
3.2.2 Manejo del estudio.....	31
3.2.3 Análisis de los Datos.....	33
3.2.4	34
Resultados y discusión.....	
4 Resultados.....	36
4.1 Manifestación de la Enfermedad.....	36
4.1.1 Muestras Reactivas por Área de Residencia.....	37
4.1.2 Muestras reactivas según el Género.....	39
4.1.3 Muestras Reactivas por Edad.....	40
4.1.4 Discusión.....	41
4.2	42
Conclusiones y recomendaciones.....	
5 Conclusiones.....	47
5.1 Recomendaciones.....	47
5.2	49
Bibliografía.....	
6 Anexos.....	50
7	56

ÍNDICE DE CUADROS

Nº		Págs.
1	Antibióticos más utilizados para combatir la Leptospirosis.....	29
2	Interpretación de resultados.Test Leptospira Igm Elisa of the Inverness Medical Australian Pty Ltd.2010.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Págs.
1	<i>L. interrogans</i> , patógena para el hombre y animales y <i>L. biflexa</i>	17
2	Formas de transmisión de la leptospira.....	19
3	Ciclo de la leptospira en el cuerpo humano.....	19
4	Número de muestras según manifestación de la enfermedad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	38
5	Porcentaje de muestras según manifestación de la enfermedad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	38
6	Número de muestras reactivas por área de residencia, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	39
7	Porcentaje de muestras reactivas por área de residencia, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	39
8	Número de muestras reactivas por género, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	40
9	Porcentaje de muestras reactivas por género, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	40
10	Número de muestras reactivas por edad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	41
11	Porcentaje de muestras reactivas por edad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.....	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Nº		Págs.
1	Mapas de focos de frecuencia de la enfermedad en la ciudad: zona urbana, y espacio provincial, zona rural.....	57
2	Listado de reactores en las dos zonas.....	59
3	Estimadores de máxima verosimilitud de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.....	60
4	Estimadores de los coeficientes de disparidad de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.....	60
5	Intervalos de confianza de verosimilitud de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.....	60
6	Intervalos de confianza de Wald para coeficientes de disparidad ajustados de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.....	61

REPOSITARIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS		
TÍTULO Y SUBTÍTULO: Serodiagnóstico mediante prueba de Elisa Indirecta a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda. Santo Domingo de los Tsáchilas, período octubre del 2009 a marzo del 2010.		
AUTOR/ES: Samaniego Rentería, Elsa Fabiola	REVISORES: Aguilar Reyes, José Manuel	
INSTITUCIÓN: Universidad Estatal de Guayaquil	FACULTAD: Facultad de Ciencias Médicas	
CARRERA: Maestría en Medicina Tropical		
FECHA DE PUBLICACIÓN: 22 de febrero del 2013	N. DE PAGS: 61	
ÁREAS TEMÁTICAS:		
PALABRAS CLAVE: Leptospirosis, zoonosis, test de Elisa indirecta, control ambiental.		
RESUMEN: Las enfermedades febriles inespecíficas son comunes en el medio tropical húmedo del Ecuador, una de ellas es la Leptospirosis, que como enfermedad zoonótica, pasa desapercibida en la consulta médica humana. Se realizó un estudio descriptivo exploratorio de la enfermedad utilizando la Prueba de ELISA Indirecta estandarizada con un “pool” de antígenos de Leptospira interrogans, de anticuerpos IgM, en muestras de suero de fase aguda de Leptospirosis humana. Se tomaron 91 muestras de pacientes que acudieron a los centros de salud, de la ciudad de Santo Domingo: Malaria e Izquierda Pérez, con síntomas de Dengue y con resultado negativo a ella, fueron sometidas a la prueba indicada, mediante selección al azar de 22 pacientes como promedio semanal y por el lapso de un mes. Del total de muestras evaluadas, 21 resultaron “reactivas”, 5 indeterminadas y 64 no reactivas. el mayor número de muestras positivas corresponden a la zona urbana (15), no se encontró diferencias en relación al género. La edad más vulnerable es la adulta, podemos concluir que Elisa indirecta (IgM) es muy sensible, específica y de fácil aplicación como prueba de tamizaje en una infección por Leptospiras.		
N. DE REGISTRO (en base de datos):	N. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	☐ SI	☐ NO
CONTACTO CON AUTORES/ES:	Teléfono: 0984605201	E-mail: elsa.fabiola1@hotmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Secretaria de la escuela de graduados	
	Teléfono: 2288086	
	E-mail: egraduadosug@hotmail.com	

1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por leptospiras patógenas, que se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el hombre, que oscilan desde una infección normal hasta una enfermedad fulminante y mortal. La Leptospirosis leve se puede presentar como un proceso pseudogripal, es decir, con cefaleas y mialgias. La leptospirosis grave se conoce también como *síndrome de Weil* y se caracteriza por ictericia, alteraciones en la función renal y diátesis hemorrágica (Speelman, P. 2000).

La leptospirosis es una antropozoonosis de amplia difusión en el mundo, que afecta como mínimo a 160 especies de mamíferos (Brooks, G. 2002). El reservorio más importante son los roedores, sobre todo las ratas, pero los perros, otros mamíferos salvajes, los peces y los pájaros también albergan estos microorganismos, estableciendo una relación de simbiosis con el huésped y a veces persisten durante años en el túbulo renal (Farr, RW. 1995). Las leptospiras son espiroquetas que pertenecen a la orden Spirochaetales y a la familia Leptospiraceae. Tradicionalmente, el género *Leptospira* constaba de dos especies: la *L. interrogans* patógena y la *L. biflexa* de vida libre.

En la actualidad se conocen siete especies de leptospiras patógenas, clasificadas según su parentesco de ADN, pero resulta más práctico desde el punto de vista clínico y epidemiológico utilizar una clasificación basada en las diferencias serológicas; en esta línea de análisis, se dividen en serotipos según su conformación antigénica, existiendo más de 200 serotipos que componen los 23 grupos serológicos conocidos hasta este momento (Murria, P. y colab. 2002). Son microorganismos espirales, finos y dotados de gran movilidad con extremos en forma de gancho y dos flagelos periplasmáticos, con los cuales labran surcos en los tejidos, miden de 6 a 20 μm de longitud y aproximadamente 0.1 μm de anchura y apenas se tiñen, requiriendo medios especiales para su crecimiento.

Según el Boletín epidemiológico de la OPS (2004), en nuestro país se evidenció el germen por primera vez en la ciudad de Guayaquil por el doctor Hidayo Noguchi, cuando en 1918 estudiaba la fiebre amarilla por mandato de un organismo internacional. Observó en pacientes con estado febril e ictericos un patógeno espiral al que denominó *Leptospira icteroides*, al tener similitud con gérmenes descritos en 1914 por los japoneses Inada e Ido, quienes lo reportaron como espiroqueta, siendo los verdaderos descubridores de esta patógeno por primera vez en el mundo, aunque sus estragos a la especie humana se registran en el año 2500 AC, donde aparecen signos de la enfermedad en la literatura cuniefome mesopotánica y luego en papiros de la medicina egipcia, para acentuarse el interés por Louis Landouzy (1883) al describir el primer caso reconociendo y describiendo el cuadro en humanos, abonando el camino para que el doctor Adolf Weil (1988), estudiara con profundidad, en trabajadores agrícolas alemanes, cuadros visibles de la enfermedad lo que significó la denominación de Enfermedad de Weil, como también se conoce la forma más agresiva de la enfermedad.

Según el Ministerio de Salud del Ecuador (2008), la leptospirosis humana incrementó su presentación desde los años 1988 hasta nuestros días con episodios ondulantes, debido especialmente al incremento de los huéspedes intermediarios y circunscritos a lugares y sitios de crítica salubridad donde los roedores, en especial, han definido su presencia. En efecto, cerca de 900 casos se han confirmado por laboratorio en diferentes lugares del país: 1988 (398 casos); 2003 (155); 2006 (122); 2007 (155); 2008 (15) y cerca de 16 casos en el 2009 (Aguilar, J. 2009), reportada en las provincias de Guayas, Manabí, Los Ríos y El Oro especialmente y complementariamente Pichincha y, Zamora, estimándose por consulta a médicos humanos en la nueva Provincia de Santo Domingo de los Tsáchila, una prevalencia en los rangos del 2 al 3% (dato de la autora) de la enfermedad en humanos.

Los cambios demográficos, ambientales, la globalización, así como, la más estrecha relación entre los animales y el hombre que se incrementa cada

día, trae consigo el enfrentamiento del hombre a nuevos desafíos médicos, donde las enfermedades “emergentes” o zoonosis, ocupa prevalente atención en el mundo; pero en contraposición a lo expresado, son éste grupo de enfermedades que más desatención experimentan, en especial en los países en desarrollo como el nuestro, donde pasan desapercibidas por el médico tratante y los organismos oficiales de salud, en especial y particularmente la leptospirosis, enfermedad no diagnosticada normalmente, aspecto estimulado por su presentación clínica que carece, en su mayoría de casos, de manifestaciones específicas, observándose a menudo un cuadro febril de comienzo repentino, cefalea y mialgia, diagnosticándose equivocadamente como meningitis o encefalitis, solicitándose pruebas serológicas confirmatorias únicamente en un 10% de los casos que se sospecha su presentación, siendo el resto no diagnosticado.

La Leptospirosis se presenta en las zonas urbanas y rurales, desarrolladas y subdesarrolladas de todo el mundo, excepto en las regiones polares. Constituye un riesgo ocupacional de los agrotrabajadores, granjeros, trabajadores de alcantarillados, mineros, veterinarios, criadores de animales, empleados de mataderos, trabajadores piscícolas, militares, habitantes de las zonas periféricas de las ciudades así como familias de cerca relación epidemiológica con reservorios de ratas (*rattus*), bañistas y deportistas que acampan en el campo o en zonas infectadas (Donado, E., Barredo, N. 2000). Estos mismos autores, indican que es una enfermedad que afecta predominantemente a hombres y se relaciona con la ocupación.

Según Douglas, B., Mandell, G. 2002, esta enfermedad compromete endémicamente a: animales domésticos, peridomésticos silvestres y esporádicamente al hombre. Rara vez se presenta como epidemia. Es más frecuente en verano o durante las temporadas más lluviosas y tiene mayor incidencia en edades laboralmente más activas.

La transmisión se presenta por contacto con la piel, especialmente si esta escoriada; o de las membranas mucosas, con agua, tierra húmeda o

vegetación contaminadas con la orina de animales infectados, como ocurre al nadar, o por inmersión accidental u ocupacional; contacto directo con la orina o los tejidos de animales infectados a veces por ingestión de alimentos contaminados con orina de ratas infectadas y otras veces más inhalación de gotitas de aerosol de líquidos contaminados (Vinetz, J. 2001). Es rara la transmisión directa de persona a persona. Las Leptospiras pueden excretarse por la orina durante un mes, pero se ha observado la bacteria incluso hasta 11 meses después de la enfermedad aguda. La bacteria se aloja en el riñón de los animales infectados eliminando el agente por la orina. Los roedores son considerados portadores sanos (Donado, E. Barredo, N. 2000). Los perros, vacunos, cerdos, peces, equinos y otros animales domésticos y silvestres desarrollan la enfermedad siendo una fuente de infección al hombre.

Con este ligero esbozo de particularidades técnicas, Santo Domingo de los Tsáchilas con su capital Santo Domingo, constituye el foco ideal para el desarrollo y difusión de la enfermedad, en los animales y el hombre. La ciudad, en su zona urbana, presa en su mayoría de condiciones insalubres, producto del elevado hacinamiento; deficiente servicio de desechos sólidos, con botaderos improvisados ideal para el desarrollo de roedores; agua escasa y carente de las condiciones de potable; escaso control de perros callejeros, que diseminan la basura dando un espectáculo deprimente de insalubridad, en un entorno caracterizado de alta humedad y temperatura; y la zona periurbana, donde estas condiciones indicadas asumen el nivel de “alarmantes”, exponen a la población humana y animal a infecciones recurrentes de leptospira, asumiendo los animales el papel de transmisores directos a la población humana de la bacteria, tornando al medio, según nuestro pre-juicio, a ser “endémico” de la enfermedad, agudizada por que el médico humano desestima su presencia y solo cuando el paciente lamentablemente se encuentra en un estado de postración clínica dirigida, aparece el interés por estudiar la posibilidad de su existencia.

A esta realidad se suma otra, tan real y patética, que sostiene en el fondo el interés de la autora. Es conocido que en los centros asistenciales del

Ministerio de Salud, para enfermedades febriles indeterminados, solo identifican los pacientes afectados de Dengue y Paludismo, siendo su número elevado, calculándose en no menos de 100 los pacientes que acuden diariamente a ellos, definiéndose como hipótesis, que existe un número considerable de pacientes afectados de Leptospirosis aguda, que pasan sin ser “descubiertos”, evidenciándose un grave error clínico-sanitario-epidemiológico, que merece ser investigado en sus primeras expresiones posible, lo cual justifica el esfuerzo por realizar el presente estudio y contribuir a mejorar la respuesta del área de salud pública a las crecientes y nuevas formas patológicas de afectación a la comunidad.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

- Determinar mediante un estudio serológico de Elisa Indirecta, la frecuencia de Leptospirosis aguda en la población humana que presentando estados febriles indeterminados, acuden a los diferentes centros de salud de la ciudad de Santo Domingo de los Colorados.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar la frecuencia de Leptospirosis aguda en pacientes que acuden con reacciones febriles indeterminadas a los centros de salud de la ciudad.
- Identificar la procedencia urbana o peri-urbana de los pacientes que resulten “Reactores Positivos” a la Prueba Elisa Indirecta seleccionada.
- Determinar de los Reactores Positivos, la diferencia por sexo y edad, que como variables dependientes caracteriza la enfermedad en el medio afectado.
- Diseñar una propuesta de prevención que tienda a disminuir el riesgo de contraer la enfermedad en poblaciones susceptibles.

1.2 HIPÓTESIS

- La Leptospirosis como enfermedad “emergente”, está afectando la salud de la población, en especial a los que viven en zonas peri-urbanas de Santo Domingo de los Tsáchilas.

1.3 VARIABLES

1.3.1 Variables Dependientes

- Sexo
- Edad
- Área de residencia

1.3.2 Variable Independiente

- Leptospirosis como enfermedad “emergente”.

2. Marco Teórico

2.1 SECCIÓN I

2.1.1 Definición de leptospira

Es una enfermedad “reemergente” en los países del Cono Sur. Aunque está ampliamente distribuida en el mundo, su prevalencia es mayor en las regiones tropicales. Es más frecuente en la población rural que en la urbana y predomina en el hombre, con un pico de incidencia en la 4ª década de la vida. Las condiciones ambientales prevalentes en la mayoría de países tropicales y subtropicales de América (lluvias abundantes, desborde de aguas residuales durante las inundaciones, suelos no ácidos, altas temperaturas) favorecen la transmisión. Afecta a numerosas especies animales, salvajes y domésticas, que son el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Los más afectados son los roedores salvajes, perros, vacas, cerdos, caballos y ovejas. En ellos la infección es desde inaparente a severa y causa pérdidas económicas importantes.

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

Por lo general el hombre es un huésped terminal. La transmisión de persona a persona es sumamente rara. La población con riesgo de enfermar comprende la que habita zonas endémicas de los países tropicales

subdesarrollados; mientras que en los países desarrollados suele ser una enfermedad profesional de los que trabajan con animales o sus productos, o en medios contaminados especialmente por roedores (veterinarios, ganaderos, tamberos, carniceros, trabajadores de frigoríficos, agricultores, trabajadores de la red de saneamiento, limpiadores de alcantarillas, urgadores). El hombre también pueden infectarse en actividades recreativas al entrar en contacto con agua dulce estancada contaminada (baño, pesca, deportes acuáticos) y por contacto con su mascota.

Aerosoles inhalados pueden vehicular microorganismos directamente a los pulmones. También es posible la transmisión transplacentaria. En nuestro país la leptospirosis se comporta como una enfermedad endémica, con brotes epidémicos, siendo observada en zonas urbana, suburbana y rural. Desde 1998 la tasa de incidencia está en aumento, al igual que en otros países del Cono Sur. Este aumento se relaciona a la situación regional y a factores climáticos como las inundaciones sufridas.

2.1.2 Taxonomía

Las espiroquetas pertenecen al orden *Spirochaetales* que incluye dos familias: *Spirochaetaceae* y *Leptospiraceae*. De los géneros que componen la familia *Spirochaetaceae* solo dos causan enfermedad en humanos y son *Treponema* y *Borrelia*. La familia *Leptospiraceae* por el contrario, posee un único género, *Leptospira*, el cual incluye tradicionalmente dos especies: *Leptospira interrogans* y *Leptospira biflexa*. *L. Interrogans*, con más de 218 serovares, incluye microorganismos patógenos tanto para animales domésticos y salvajes como para el hombre *biflexa*, con al menos 60 serovares reconocidos, comprende microorganismos saprófitos de vida libre que habitan ambientes húmedos y no producen enfermedades.

2.1.3 Sinonimia

La Leptospirosis se conocen por otros nombres tales como: enfermedad de Weil (*L. icterohaemorrhagiae*); Fiebre de los arrozales (*L. bataviae*); enfermedad de los heneficadoras; enfermedad de los porqueros (*L. pomona*); enfermedad de los manipuladores de pescados, ictericia enzótica; enfermedad de Stuttgart (*L. canicola* en Europa); ictericia hemorrágica; ictericia infecciosa; agua roja; fiebre de los 7 días (*L. hebdomadis* en Japón); fiebre otoñal japonesa (*L. autumnalis*); fiebre de los ratones; tifus canino; fiebre de cieno, fiebre de los pantanos (*L. grippotyphosa* en los trópicos) fiebre del agua; fiebre de los cosechadores; fiebre de los campos, etc. (González et al., 1990; Ferguson, 1993; Bofill et al., 1996; Fresno, 1996). Todas estas denominaciones han sido utilizadas para describir la enfermedad producida por leptospiras según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, especies afectadas, estacionalidad, etc.

2.1.4 Historia

Las primeras reseñas de la enfermedad datan 2.500 AC, donde aparecen signos de la enfermedad en la literatura cunieforme mesopotámica y luego en papiros de la medicina egipcia. Ya por el año 1800 Larrey observó una enfermedad en el hombre caracterizada por fiebre, ictericia y hemorragias petequiales. Adolfo Weil en 1886 diferenció esta enfermedad de otras similares, estableciendo como una entidad separada la designada "ictericia infecciosa". En 1887 Goldschmidt fue el primero en usar el término "enfermedad de Weil" (Figueroa, 1984).

En 1898 se propagó en la especie canina epizooticamente en Alemania donde se llamó al principio "enfermedad de Stuttgart" (Merchant y Packer, 1973). La primera leptospira patógena fue observada por Stimson en New Orleans en el Año 1907 en cortes de riñón de humano que se creía había

muerto de fiebre amarilla, el organismo lo llamó *Espirochaeta interrogans* (Figueroa, 1984).

La causa de la enfermedad de Weil según comprobaron en 1914 Inada e Ido en Japón es un microorganismo al que llamaron *Leptospira icterohaemorrhagiae* (Merchant Y Packer, 1973), esto lo reportaron Inada et al. En 1916 al afirmar haber observado espiroquetas en el tejido hepático de cobayos inoculados con sangre de humanos que padecían la enfermedad de Weil (Figueroa, 1984).

En 1917 Coymont y Durant vieron que los cachorros podían ser infectados con las espiroquetas que producían la ictericia típica humana. Ulenrhuth y Fromme en 1918 identificaron como leptospirosis la ictericia infecciosa del perro cuando demostraron que el proceso era originado por el mismo tipo de leptospira que el descrito por Inada e Ido en el hombre (Manninger y Mocsy, 1978), estos investigadores alemanes la llamaron *Spirochaeta icterogenes* y fueron los primeros en Europa en observar las leptospiros a campo obscuro y por fijación y coloración de Giemsa y Levaditi (Figueroa, 1984).

En 1931 Klarenbeek y Schuffner admitieron que un considerable porcentaje de leptospirosis caninas era producida por otra especie llamada *Leptospira canicola*, esta fue aislada por Mayer et al. en 1937 en San Francisco (Merchant y Packer, 1973).

Desde que Mikhin y Azhinov en 1935 comunicaron la presencia de la enfermedad en los bovinos se afirmaron las sospechas que el proceso se hallaba extendido por todo el mundo. Además se demostró que en otros mamíferos se producen enfermedades parecidas. Los trabajos de investigación en este sentido permitieron comprobar la existencia de diferentes tipos de leptospiros, así como llegar al conocimiento de las características

epidemiológicas de la leptospirosis de cada especie animal y del hombre (Menninger y Mocsy, 1978).

2.1.5 Morfología y tinción

El diagnóstico real debería basarse en el aislamiento, cultivo e identificación, pero las peculiares características de las leptospirosis tales como crecimiento difícil y lento, hacen que esta metodología esté indicada en aquellos casos que otros más sencillos, como los serológicos, carecen de confiabilidad (Faine, 1991; Ellis, 1994). En el caso de los estudios epidemiológicos, en los que se cuenta un gran número de muestras y el objetivo es la obtención de un resultado de prevalencia, las técnicas indicadas son, las serológicas, a pesar de que su interpretación es muchas veces subjetivas (Ellis, 1996).

2.1.6 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 serológicos (Savio y Lindner, 2002).

2.1.7 Diagnóstico clínico

Tiene un carácter presuntivo y se realiza fundamentalmente a través de los signos y síntomas que presenten. 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).

2.2 SECCIÓN II

2.2.1 Métodos de laboratorio

2.2.1.1 Detección directa de Leptospiras

Se pueden utilizar métodos de impregnación argéntica o Giemsa, o la observación directa de leptospiras de orina centrifugada en microscopio de campo oscuro. Sin embargo, no se aconseja su empleo como procedimiento rutinario ya que ciertos artefactos de la tinción o filamentos de fibrina podrían dar lugar a errores diagnósticos. Los colorantes de anilina no deben ser utilizados ya que las espiroquetas no se tiñen bien con ellos.

2.2.1.2 Aislamiento

Durante la fase aguda de la enfermedad las leptospiras pueden ser aisladas de sangre o líquido cefalorraquídeo y también pueden aparecer en orina a partir de la segunda semana desde el inicio de la enfermedad. Se deben extremar los cuidados en la toma y transporte de la muestra ya que la mayoría de los contaminantes de la misma producen sobrecrecimiento sobre las leptospiras durante el cultivo. Los cultivos de orina, si se realizan, deben inocularse lo más pronto posible en medios de cultivo, ya que estos microorganismos sobreviven unas pocas horas en la orina con pH ácido. Se utilizan medios semisólidos como el Fletcher, EMJH y Tween 80-albúmina, debiendo ser inoculadas de 1 a 3 gotas en 5 ml de medio e incubadas a 28-30°C en la oscuridad durante 5 a 6 semanas.

En los medios de crecimiento semisólidos el crecimiento de leptospiras se aprecia por la formación de un anillo de turbidez debajo de la superficie, de unos 0,5 a 1 cm de espesor, que aparece en los 6-14 días posteriores a la inoculación. La adición de 5-fluoruracilo al medio evita la contaminación bacteriana y permite mejores aislamientos.

2.2.1.3 Inoculación en animales

Sirve para lograr aislamientos de cepas de materiales contaminados, o para producir anticuerpos. Se inoculan dos cobayos o hámsters vía intraperitoneal previo estudio serológico negativo de los mismos. A los 5 días se siembra la sangre en medio EMJH o Fletcher y se investiga la presencia de anticuerpos. El procedimiento se repite semanalmente durante 1 mes donde se sacrifica al animal y se cultivan los materiales de necropsia (hígado, bazo, riñón).

2.2.2 Métodos serológicos

2.2.2.1 MAT

Creada por Martin y Petit, esta técnica consiste en la microaglutinación con antígenos vivos. Requiere enfrentar diluciones sucesivas del suero del paciente, (comenzando con 1:50), a un pool o grupo de serovares seleccionados de leptospiras, que luego de incubados durante 60 minutos a 37°C son observados en microscopio de campo oscuro. La respuesta de anticuerpos aparece entre el 6º y el 12º día de la enfermedad, y los máximos títulos pueden alcanzarse entre la 3ª y 4ª semanas, siendo muy variables entre cada paciente. El título de corte es el de la dilución más alta que pueda aglutinar 50% de las leptospiras con respecto al suero utilizado como control negativo.

Se utilizó 16 serovares cultivados en medio líquido durante 7 a 10 días, siendo los más frecuentemente reactivos, en ese orden *bratislava*, *pyrogenes*, *mini*, *icterohemorrhagiae*, *pomona* y en menor grado otras como *hardjo*, *canicola*, *cynopteri*, *grippotyphosa*, *Ballum*, *wolfi*, y otras. Si bien constituye la técnica "gold standard", solo puede ser realizada en centros de referencia, con infraestructura adecuada y personal entrenado para la lectura e interpretación de los resultados y mantenimiento del separio.

Interpretación de resultados

Se define que un caso es positivo cuando existe una seroconversión con un aumento de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos para uno o varios serovares entre la fase aguda y la de convalecencia, por lo que se recomienda testear al menos dos muestras del suero del paciente con un intervalo de unos 15 días entre ambas.

Un suero reactivo en dilución 1/50 o mayor se considera positivo. Un título de al menos 1:200 para un solo serovar luego del establecimiento de los síntomas, o títulos de 1:100 para varios serovares son sugestivos de leptospirosis requiriéndose sucesivas muestras para su confirmación.

Títulos mayores de 1/200 para uno o más serovares, o la seroconversión ya mencionada constituyen diagnóstico confirmatorio. Una reacción negativa en una sola muestra no descarta una posible infección.

- a) La muestra de suero puede haber sido tomada prematuramente, antes de cumplirse al menos una semana de evolución desde el inicio de la enfermedad.
- b) Más raramente, el paciente puede estar infectado por un serovar ausente en la batería de antígenos utilizados y la respuesta inmune no ser suficientemente intensa todavía como para producir reacciones cruzadas detectables con otros serovares. Las reacciones cruzadas son sin embargo muy frecuentes, y los

tests serológicos no son apropiados para identificar en forma precisa el serovar involucrado en una infección. No creemos por ejemplo que la frecuente reactividad de los serovares pyrogenes y bratislava en los sueros de nuestros pacientes infectados se deba siempre a infecciones por los mismos, sino a gran reactividad cruzada y consecuente gran utilidad diagnóstica de estas cepas. Los niveles de anticuerpos descienden en 4 a 10 meses, pero títulos bajos a uno o varios serovares pueden permanecer por varios años luego de la infección aguda.

2.2.2.2 ELISA Indirecto IgM

El método ELISA es usado como una prueba adicional o como una alternativa a la prueba MAT. Es el método más usado para detectar leptospirosis aguda. Los anticuerpos de tipo IgM son los que se presentan en una infección reciente y éstas se pueden detectar específicamente por ELISA. Se han desarrollado una gran variedad de ELISASs y comparándolos con la prueba MAT mostraron una concordancia muy alta. Pero necesariamente los sueros salieron positivos deberán ser confirmados por MAT (Ministerio de Salud del Perú, 2008).

2.2.2.3 Inmunofluorescencia

Es otra de las técnicas diagnósticas que se investigan en nuestro laboratorio como método de screening que revela especialmente la aparición de IgM y puede ser positivo más precozmente que la MAT. Consiste en la fijación de los serovares más frecuentes en láminas de Inmunofluorescencia. Una vez fijado el antígeno con acetona, se coloca una dilución 1:100 del suero del paciente en cada uno de los hoyos y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. Luego de varios lavados con PBS, se colocan 50 microlitros de una dilución de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulina humana conjugados con isotiocianato de fluoresceína en cada hoyo y se incuban en cámara húmeda por 30 minutos para ser nuevamente lavadas y secadas. Posteriormente se

montan los preparados con glicerol y se observan al microscopio de fluorescencia. En los sueros positivos se aprecian las espiroquetas color verde manzana.

2.2.3 Otros métodos serológicos

La aglutinación con antígenos tratados con formalina o liofilizados difiere de la realizada con antígenos vivos y es más sencilla, representando una alternativa válida. Debido a la complejidad de la MAT, recientemente se han elaborado otros métodos de screening rápidos para detección de anticuerpos de fase aguda, como el IgM dot- ELISA dipstick. Son fáciles de realizar, con bajos costos reales y con alta sensibilidad y especificidad. Entre otros métodos descritos en la bibliografía se encuentran la aglutinación macroscópica, la hemoaglutinación indirecta (IHA) y la fijación de complemento (CF).

2.2.4 Métodos moleculares

Entre los métodos rápidos que se han desarrollado en años recientes se utiliza la detección de ADN de leptospira mediante PCR. El análisis por esta técnica debe ser realizado entre los 10 y 14 días desde el inicio de los síntomas, ya que el ADN bacteriano debe detectarse antes de que se produzca la respuesta inmune. Se ha logrado detectar ADN en suero, orina, humor acuoso y LCR; sin embargo se debe ser cuidadoso al trabajar con sueros ya que el contenido de los eritrocitos lisados contiene inhibidores.

2.3 SECCIÓN III

2.3.1 Características fisiológicas

Espiroqueta, debe su nombre a su forma de espiral Leptospira.

Las espiroquetas son células helicoidales flexibles, que miden de 0,1 μm de diámetro y 6 a 24 μm de largo. La *Leptospira* es una bacteria estrechamente enrollada, aeróbica, que vive por largo tiempo en agua fresca, estiércol, barro y ambientes marinos, en asociación con animales y seres humanos.

Se conocen dos tipos de *Leptospira*: *L. interrogans*, patógena para el hombre y animales y *L. biflexa*, que no provoca enfermedad.

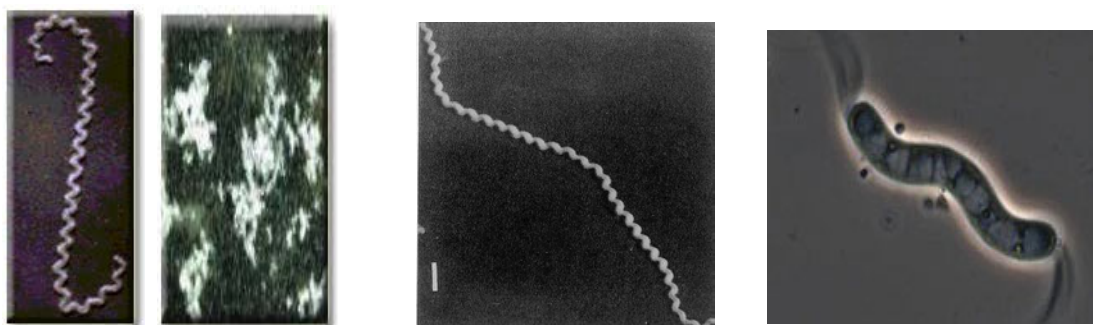


Figura 1. *L. interrogans*, patógena para el hombre y animales y *L. biflexa*.

Fuente: <http://epi.minsal.cl/epi/html/enfer/leptospirosis.html>

La *L. interrogans* tiene a su vez más de 200 variantes serológicas, que se asocian con distintos animales y afectan a diferentes órganos, siendo cada una responsable de estados mórbidos más o menos benignos. Sin embargo, estudios genéticos de la *Leptospira* han demostrado que en un mismo grupo genético puede haber varios serotipos diferentes.

2.3.2 Características antigénicas

El genoma de las *Leptospira* patogénicas consiste en dos cromosomas. El tamaño de los genomas de las *L. interrogans* serotipo Copenhageni y Lai es de aproximadamente 4.6 Mb.[32] Ambos genomas han sido secuenciados, el *L. interrogans* serovar Copenhageni, tiene dos cromosomas que codifican a 3728 genes, dos operones del ARNm y 37 ARNt.[33] El *L. interrogans* serovar Lai es casi del mismo tamaño con 4727 genes anotados con casi un exceso de 1000 genes, quizás debido a la diferencia en puntos de corte de los genes de ambos grupos.

Por su parte, el genoma de *L. borgpetersenii* serotipo Hardjo es de solo 3.9 Mb, con un gran número de pseudo-genes, es decir, fragmentos de genes con secuencias de inserción, en comparación con los *L. interrogans*. [34] *L. borgpetersenii* serotipo Hardjo se transmite usualmente por la exposición directa a tejidos infectados, mientras que *L. interrogans* por lo general se adquiere del agua y el suelo contaminados con la orina de animales portadores de *Leptospira* en sus riñones. El gran número de genes defectuosos y de genes de inserción en comparación con *L. interrogans* que *L. borgpetersenii* está pasando por una decadencia genómica, con una continua pérdida.

2.3.3 Distribución y transmisión

La Leptospirosis es catalogada como zoonosis, pues forma parte del grupo de enfermedades que se transmite entre animales y seres humanos. La *Leptospira* se asocia con animales domésticos y silvestres, como perros, gatos, bovinos, caprinos, porcinos, caballos, roedores y mamíferos marinos (lobos de mar), entre otros. La bacteria se transmite fundamentalmente a través de la orina de animales infectados, aunque puede encontrarse también en otros fluidos corporales. Los animales infectados, especialmente los roedores y animales silvestres, generalmente no presentan síntomas. La *Leptospira* se elimina rápidamente de todos los tejidos, excepto del cerebro, los ojos y los riñones, donde sobrevive y se multiplica para luego eliminarse a través de la orina. La bacteria permanece en el huésped por semanas o meses y, en el caso de los roedores, puede reproducirse y ser eliminada durante toda la vida.

Una vez que es excretada viva por el huésped, sobrevive por semanas o meses en el agua y en el suelo. Tanto el ser humano como los animales adquieren la infección por contacto directo con agua contaminada, desde donde penetra en el cuerpo a través de erosiones o cortes en la piel y de las mucosas de ojos, nariz y boca. El ser humano también puede contraer la enfermedad por contacto directo con sangre, tejidos, órganos y orina de animales infectados. Aunque es infrecuente, es posible infectarse al ingerir agua o alimentos contaminados. La transmisión persona a persona es extremadamente rara.

Los roedores son los principales reservorios de la bacteria y, por lo tanto, los animales que la transmiten con mayor frecuencia al hombre. Las ratas, son reservorios del serovar icterohemorrhagiae, que provoca ictericia y causa una de las formas más graves de la enfermedad.

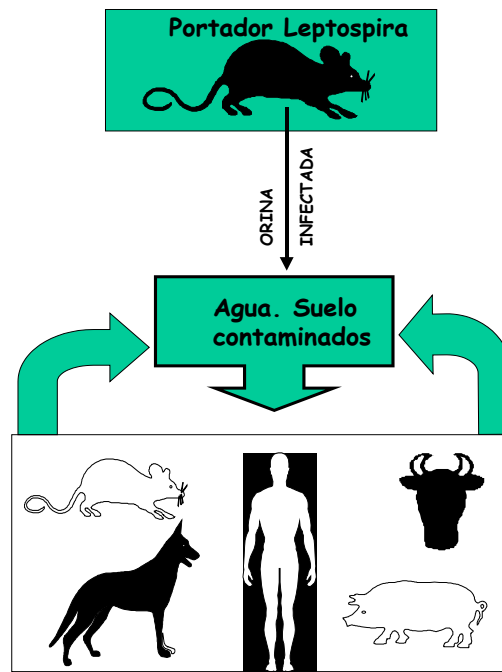


Figura 2. Formas de transmisión de la leptospira.

Fuente: <http://epi.minsal.cl/epi/html/enfer/leptospirosis.html>

¿Cómo se presenta la enfermedad?

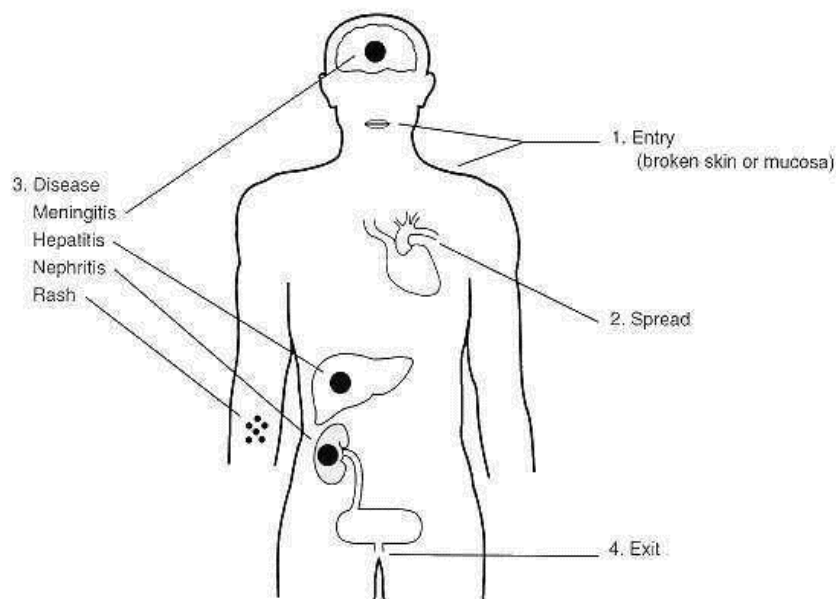


Figura 3. Ciclo de la leptospira en el cuerpo humano.

Fuente: <http://epi.minsal.cl/epi/html/enfer/leptospirosis.html>

En el ser humano, la bacteria sigue un ciclo similar al que realiza en los otros huéspedes. La bacteria penetra al cuerpo por la piel o mucosas, se disemina por la sangre atacando diversos órganos y se elimina por la orina. El tiempo de incubación, es decir, desde que la bacteria penetra al cuerpo hasta que aparecen los primeros síntomas va de 2 días a 4 semanas. La enfermedad se presenta en forma brusca, con síntomas similares a los de la gripe:

- Fiebre,
- Dolor de cabeza,
- Mialgia (principalmente de pantorrillas y región lumbar)
- Malestar general o postración,
- Náuseas o vómitos,
- Dolor abdominal,
- Diarrea
- Artralgia.

Luego de esta primera fase y de un período sin molestias se puede presentar una segunda fase de mayor gravedad, dependiendo del serogrupo de la bacteria infectante. Este segundo período es llamado también enfermedad de Weil. Entre sus síntomas, se pueden dar:

- Irritación conjuntival
- Irritación meníngea y rigidez de nuca
- Insuficiencia renal
- Ictericia
- Manifestaciones hemorrágicas intestinales o pulmonares
- Arritmia o insuficiencia cardíaca o disnea

La enfermedad dura desde unos pocos días hasta tres o más semanas, dependiendo de su gravedad. La mayor parte de las personas presentan sólo una primera fase, con síntomas moderados o sin ningún malestar. La segunda fase puede ser grave y, si no es tratada en forma adecuada y a tiempo, puede

tener una recuperación lenta, de hasta varios meses, y dejar secuelas renales o derivar en la muerte.

2.3.4 Periodo de incubación

El tiempo de incubación, es decir, desde que la bacteria penetra al cuerpo hasta que aparecen los primeros síntomas va de 2 días a 4 semanas. La enfermedad se presenta en forma brusca, con síntomas similares a los de la gripe: fiebre, dolor de cabeza, mialgia (principalmente de pantorrillas y región lumbar) malestar general o postración, náuseas o vómitos, dolor abdominal, diarrea y artralgia. Una segunda fase más grave. Luego de esta primera fase y de un período sin molestias se puede presentar una segunda fase de mayor gravedad, dependiendo del serogrupo de la bacteria infectante. Este segundo período es llamado también enfermedad de Weil.

Entre sus síntomas, se pueden dar: irritación conjuntival, irritación meníngea y rigidez de nuca, insuficiencia renal, ictericia, manifestaciones hemorrágicas intestinales o pulmonares, arritmia o insuficiencia cardíaca. La enfermedad dura desde unos pocos días hasta tres o más semanas, dependiendo de su gravedad. La mayor parte de las personas presentan sólo una primera fase, con síntomas moderados o sin ningún malestar. La segunda fase puede ser grave y, si no es tratada en forma adecuada y a tiempo, puede tener una recuperación lenta, de hasta varios meses, y dejar secuelas renales o derivar en la muerte.

2.3.5 Patogenicidad

La espiroqueta *Leptospira interrogans* produce la enfermedad de Weil, una enfermedad zoonótica de distribución mundial pero que afecta con más ímpetu a las zonas tropicales y subtropicales⁸ y transmitida por la orina de animales salvajes y domésticos, en especial ratas y perros. La infección, en el

hombre se produce por contacto directo con la orina o los tejidos del animal infectado o por medio del agua y el suelo contaminados. Se observan ictericia, hemorragia cutánea, fiebre, escalofríos y dolor muscular. Las *Leptospira* son muy invasivas y difunden por vía sanguínea y asociadas a la endotoxina fibrolisina. En el estado agudo se puede aislar la espiroqueta en la orina y en la sangre. Durante la convalecencia se encuentran anticuerpos. Con mucha frecuencia es confundida con otras enfermedades febriles que por lo general también abundan en las regiones en cuestión, como el dengue y otras enfermedades virales e incluso el resfriado común. Es por ello que el diagnóstico por PCR es confirmatorio debido a su especificidad, capacidad de detectar genomo-especies y rápidos resultados -aproximadamente 3 horas.

La misma sintomatología están presentes en animales, como el perro, búfalo, equinos, vacunos y otros mamíferos. La infección por *Leptospira* genera inmunidad, sin embargo, por razón de las variaciones en la composición de lipopolisacáridos, refleja una diversidad antigénica entre un serotipo y el otro, incluyendo en la misma especie de leptospirosas patogénicas. Por ello, la inmunidad es específica solo contra el organismo infectante y no contra otros serotipos.

2.3.6 Sintomatología

La forma más común y leve en que se presenta la enfermedad es la leptopirosis anictérica y con frecuencia es bifásica. La fase inicial o "septicemia" se inicia con fiebre repentina de 39 a 40° C, escalofríos, dolor abdominal, cefalea intensa y mialgias (principalmente en las pantorrillas). Existe sufusión conjuntival intensa. Después de uno a 3 días de mejoría de los síntomas y ausencia de fiebre da comienzo la segunda fase o "inmunológica", en este momento la leptospira solo se encuentra en riñón y aparecen anticuerpos específicos. En la primera fase de la enfermedad, y en el inicio de la meningitis, se observa una recurrencia de los síntomas. Puede haber uveítis. Exantema y adenopatía. La enfermedad suele curarse espontáneamente, durando de 4 a 30 días y como regla la recuperación es completa.

La leptopirosis icterica (enfermedad de Weil, causada por icterohaemorrhagiae) es la forma más grave de la enfermedad y su sintomatología se caracteriza por un deterioro de las funciones mentales, renales y hepáticas, hipotensión y mortalidad de 5 a 10%. Los signos y síntomas son continuos y no bifásicos.

Durante la segunda guerra mundial se presentó una forma de leptopirosis leve, causada por *Leptospira antummalis* y se caracterizó por provocar un eritema en placa en la piel de las piernas o exantemas generalizados con fiebre. La leptopirosis sin ictericia casi nunca es mortal, y cuando ésta aparece la mortalidad es del 5% en menores de 30 años y de 30% en mayores de 60 años.

2.3.7 Profilaxis.- Consideraciones generales

Según Abdusalam (1976), la leptospirosis puede desaparecer espontáneamente de un foco de infección como resultado de cambios ecológicos, los esfuerzos para eliminarla de una manera deliberada en general no han tenido éxito. Ante numerosos fracasos sobre control de la enfermedad reportes esporádicos de que se ha eliminado satisfactoriamente la leptospirosis de rebaños recaen sobre la terapia, vacunación y saneamiento ambiental (desratización). La vacunación es la única medida conocida que puede reducir la morbilidad en el hombre y los animales y las pérdidas económicas resultantes.

Blood (1982), plantea que la vacunación se ha convertido en una medida generalizada contra la leptospirosis en bovinos y en porcinos y es eficaz para controlar la enfermedad. La respuesta inmunológica proporcionada por las bacterias es específica de algunas serovariantes dependiendo la protección conferida por éstas de las serovariedades predominantes en la región donde se aplica.

Figueroa (1984), enumera las siguientes medidas de saneamiento como complemento de la terapia y vacunación:

- Drenar las aguas acumuladas y estancadas en las unidades.
- Realizar un efectivo control de roedores.
- Tratamiento adecuado de los residuales.
- Almacenamiento adecuado de los alimentos.

Según Malajov y Alejin (1989), la lucha contra la leptospirosis animal se realiza en las siguientes direcciones: prevenir la infección leptospirósica de zonas no afectadas o la penetración de nuevos serovares en zonas donde éstos no habitan, sanear las unidades insalubres y proteger las personas contra la infección. La protección de zonas no afectadas abarca: realizar pruebas serológicas planificadas a los animales, especialmente a los reproductores, aplicar cuarentena a todos los animales que entran a la granja e investigarlos con sueros pareados, vacunar en el período de cuarentena a los nuevos ingresos y a toda la masa periódicamente, excluir el contacto con fuentes probables de infección como otros animales domésticos y salvajes o depósitos de agua a cielo abierto, investigar flora autóctona y aplicar medidas periódicas de saneamiento ambiental.

Para prevenir el contagio humano en sectores de riesgo se recomienda planes educativos (descripción del agente, vías de transmisión, síntomas y métodos de prevención personal), utilización de antisépticos, medios de higiene personal y utilización de ropa especial en las personas en contacto directo con fuentes de infección en animales domésticos y la lucha contra reservorios y vacunación a poblaciones en alto riesgo.

Bennett (1993), subraya que subsecuente a la investigación de leptospirosis en granjas lecheras se sintió la necesidad de éstas a mayor información acerca de la enfermedad, de las estrategias para su control y de los costos y beneficios que envuelve. Se describen dos métodos que

ayudan a la exploración de los riesgos e implicaciones financieras de la infección con *L. interrogans* serovar hardjo para los productores de leche.

Biegel y Mortensen (1995), recomienda que en la prevención de la leptospirosis es importante el efectivo control de ratas y protección individual con ropas protectoras en áreas de trabajo contaminadas.

2.3.8 Situación Nacional

Lamentablemente no hay estudios en el país que demuestren la situación epidemiológica general de la enfermedad, lo existente son informes citados en la presente revisión por parte del Ministerio de Salud Pública que indican su presencia, en especial en la Costa ecuatoriana.

2.4 SECCIÓN IV

2.4.1 Saneamiento ambiental y profilaxis

2.4.1.1 Saneamiento ambiental

a) Control de roedores perjudiciales

Debido a que los roedores son un eslabón fundamental en el mantenimiento de la infección en nuestro medio deben elaborarse planes directores según condiciones en que se ejecutará la lucha, así como guía de ejecución y metodología técnica de aplicación de los rodenticidas disponibles en forma de folletos. Deben resolverse los posibles factores que entorpezcan el trabajo como: falta de rodenticidas o suministro irregular, priorizando las zonas con alta incidencia, no utilización de productos rodenticidas en mal estado o vencidos, correcto mantenimiento de las medidas generales de saneamiento

(chapea, recogida de escombros, eliminación de basura y desechos de alimentos que sirvan de hábitat idónea para estos animales), buena coordinación en el tratamiento de áreas que eviten la reinfección de áreas tratadas a partir de vecinas, entre otros factores particulares de la zona en el tratamiento (Collazo, 1987).

b) Tratamiento de residuales pecuarios

Las residuales de las unidades pecuarias son una fuente de contaminación de las superficiales como: ríos, arroyos, presas, etc., con gérmenes del género leptospira. La solución definitiva y segura al problema de los residuales consiste en el diseño de la construcción de plantas de tratamiento en cada uno de los focos de contaminación para lo cual hay que contar con un gran respaldo financiero. La solución propuesta para las unidades bovinas consiste en 2 lagunas de oxidación a partir de la fosa o tanque séptico de la unidad, actuando ésta como retención de sólidos flotantes y sedimentales, y las aguas para la depuración como mínimo de los agentes patógenos presentes en los residuales líquidos ya que la leptospira y otros agentes se desvitalizan en este ambiente.

Los residuales de la especie porcina son mucho más agresivos que los de la especie bovina, tanto por su demandabioquímica de oxígeno como por los patógenos que transmite y su concentración. La solución por estos residuales es la misma que para los residuales bovinos aunque éstos deben ser priorizados (Vera, 1987).

c) Vacunación

Según Blood et al. (1982), una de las desventajas teóricas de la vacunación contra leptospirosis es el posible desarrollo de animales portadores renales que son suficientemente inmunes para resistir la infección sistémica pero no para la formación de colonias en el tejido renal, lo que da origen a que el animal se convierta en portador y sufra leptospirosis. Se conocen algunos casos humanos infectados por perros vacunados.

González y Machado (1989), recomiendan el uso de una vacuna en los rebaños bovinos de la provincia de Villa Clara, ya que su uso redujo los efectos clínicos y muertes por leptospirosis y no presentó ningún efecto perjudicial posterior a su aplicación. Esta vacuna polivalente cubana contiene leptospira de los grupos serológicos: *L. pomona*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. tarssovi*. Esta misma vacuna fue probada por González et al. (1989 a) contra la leptospirosis porcina no observando reacciones clínicas indeseables posteriores a su uso, el nivel de inmunidad conferido fue adecuado y los indicadores productivos posteriores a la vacunación fueron favorables.

Dhaliwal et al. (1994), utilizaron la vacunación con *L. hardjo* para señalar la proporción de preñez alrededor del día de apareamiento, en este no hubo mejoramiento en la proporción de preñez 30-60 días post vacunación.

Hubener (1996), plantea que determinado por su ecología cada región se caracteriza por los serovares que contienen, ya que la inmunidad es serovar específico y es necesario conocer los que actúan en un foco para poder inmunizar en forma correcta a los animales. Se ha demostrado que la vacunación con bacterinas estimula primero la producción de anticuerpos IgM, que desaparecen después de algunos meses para dar lugar a las IgG.

En Cuba se está produciendo una vacuna para humanos y una de uso veterinario. La vacuna para uso humano contiene los serogrupos *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *pomona*, es una bacterina adyuvada en hidróxido de aluminio y contiene timerosal como conservante. Las fase I y II se valoran de buenas y la III a finales de 1997 estaba en estudio de campo inmunizándose 250 mil personas en las provincias de Holguín, Las Tunas, Ciego de Ávila y Cienfuegos. La vacuna de uso veterinario se realizó con cepas autóctonas con características vacúnales del IMV siendo éstas muy virulentas, antigénicas y pertenecientes a los serogrupos *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *pomona*. Éstas confieren protección contra la infección renal a los 25 días de aplicada y protege contra abortos según pruebas en hámsters.

La vacuna cubana Vax Spiral tiene como principio la inmunorradiometría (IRMA) usándose en su producción la albúmina bovina fracción V (Bov. Alb. FV). Considerando este ensayo simple y sensible, recomendándose usar como el método de control para todas las vacunas humanas (Valdés, 1997).

En nuestro país más de un millón de ciudadanos está usando la vacuna Vax Spiral la cual es de producción nacional y su eficacia está comprobada. Aún no se exporta porque está en trámites de inscripciones; pero se usa en el país en masas. No obstante se han solicitado 40000 dosis en uno de los países afectados por el Mitch para contener así un poco de epidemia de leptospira.

Samira et al. (1997), obtuvieron una vacuna contra leptospira hardjo lográndose una notable respuesta inmune, dos veces más alta por vía intradérmica comparada con la vía subcutánea.

Se realizó un ensayo clínico en Brasil para evaluar la eficacia de la doxyciclina oral (200mg, dosis única) para prevenir leptospirosis después de la exposición con aguas contaminadas. A pesar que en este estudio no se encontró asociación estadísticamente importante a causa de un pequeño número de individuos (40), se observó que el 25% de los voluntarios al primer muestreo tuvieron ya IgM (González et al., 1998).

Carmichael (1999), informa que las vacunas contra leptospira son causa usualmente de anafilaxis ya que éstas no contienen los serovares frecuentes en la mayoría de las regiones. En el laboratorio de New York, estado Cornell, la mayoría de los casos diagnosticados presentaban como serovares más frecuentes grippothyphosa y pomona y ninguno de los casos recientes fue ocasionado por los serovares canícola o icterohaemorrhagiae presentes en la vacuna. Porque la leptospirosis es una enfermedad importante en perros, es que hay una necesidad urgente de desarrollar e investigar vacunas más seguras que contengan los serovares frecuentes de cada región.

2.4.1.2 Medidas recuperativas

Las leptospirosis son sensibles a muchos antibióticos, aquí hacemos un recuento de los más utilizados (Bofill, 1988; González, 1990; Hubener, 1996; Magil, 1998).

Cuadro 1. Antibióticos más utilizados para combatir la Leptospirosis.

Antibióticos	Dosis	Especies
Penicilina	Mínima de 11000 UI/Kg. PV diario IM, en casos graves aplicar la dosis por cinco días	General
Estreptomina	Mínima de 11 mg/Kg. PV. Por la misma duración de la penicilina	General

En la Leptospirosis canina se recomienda la Tetraciclina o la Estreptomina para las infecciones agudas y la Dihidroestreptomina en altas dosis se recomienda para eliminar la etapa portador excretor.

En humanos se ha generalizado el uso de la Penicilina a altas dosis durante las primeras 48 a 72 horas post-infección, 10 millones de UI de Penicilina G cristalina, sódica o potásica diluida en 1000 ml de dextrosa al 5% o solución salina fisiológica, por vía endovenosa a razón de 30 a 40 gotas por minuto durante las primeras 48 a 72 horas. Pasadas las 72 horas se continuará con un millón de UI cada 6 horas IM durante los 3 a 5 días posteriores. Si se presenta alergia a la Penicilina se aplicará Ceforán, 1g c/6 horas IM o IV (González et al., 1990).

Benenson (1992), aduce que las Cefalosporinas, Sincominas, Eritromicina y Doxiciclina son eficaces en el tratamiento de la leptospirosis humana. Se ha demostrado que la Penicilina G y la Amoxiciclina fueron eficaces incluso después de haber transcurridos 7 días de enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Lugar de la investigación

La investigación se desarrolló en la ciudad de Santo Domingo, capital de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, recolectándose durante el mes de agosto del año 2010, un número de 91 muestras de sangre de pacientes febriles indeterminados que acuden normalmente y en mayor cantidad a los centros de Malaria y al Izquierda Pérez, de la ciudad, conforme a una frecuencia de recolección de 22 muestras por semana, como promedio: (22, 22, 22 y 25=91), ajustándonos a un marco aleatorio que permita muestrear adecuadamente la población comprometida.

3.1.2 Periodo de la investigación

Desde Octubre del 2009 a octubre del 2010, cubrió todo el marco de la investigación, pero los estudios de laboratorio se realizó en el Instituto Izquierda Pérez, Regional Santo Domingo, en la sección de Virología, donde labora personal muy capacitado para esta prueba seleccionada, recolectándose las 91 muestras en el mes agosto, para procesarse en la primera semana del mes de septiembre.

3.1.3 Recursos empleados

- Jeringas descartables
- Alcohol
- Algodón
- Tubos de ensayo

- Gradillas
- Pipetas
- Equipo ELISA
- Computador
- Programas de computación

3.1.4 Universo y muestra

El universo de trabajo lo constituyeron los pacientes con fiebre indeterminada que acudieron diariamente a los diferentes sitios de apoyo médico existentes en la ciudad, de los cuales se seleccionó los más representativos y que por su naturaleza de atención, reciben a estos pacientes en mayor volumen. A estos sitios acude un promedio diario de 60 pacientes, lo cual significa que en la semana la cifra de atención asciende, en su rango mínimo, 485 pacientes, cifra ésta que nos sirve para identificar el número de muestras a tomar semanalmente y mensual, siendo éstas un promedio de 22 cada semana, dando un total de 91 muestras que en el mes de agosto del 2010 se recolectaron de los dos centros asistenciales.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Tipo de investigación

Estudio transversal exploratorio que busca encontrar diferencias en una población susceptible a través de una hipótesis planteada.

3.2.2 Diseño y determinación de la muestra

En el presente estudio se planificó recolectar y analizar en el mes de julio del año 2010, 91 muestras de sangre, recogidas en 2 sitios de la ciudad:

Malaria e Izquieta Pérez, provenientes de pacientes que presentan cuadros febriles indeterminados y que acuden normalmente a estos centros en busca de ayuda médica.

El tamaño de la muestra se determinó considerando el método de muestreo probabilístico que pertenece el estudio y dentro de su clasificación, el muestreo simple, que para el caso de poblaciones conocidas (N), se aplicará la fórmula descrita por Weiers Ronald (2008), que expresa:

$$n = \frac{(S)^2}{\frac{(\epsilon)^2}{(Z)^2} + \frac{(S)^2}{(N)}}$$

Donde:

n = Tamaño necesario de la muestra

Z = Margen de confiabilidad, que en este caso es el 95% = 1.96

S = Desviación estándar de la población = 0.4 obtenida como promedio de la verificación realizada de pruebas comprobatorias.

E = Error entre la media muestral y la media de la población = 0.05

N = Tamaño de la población conocida = 485 personas que acuden a la semana a los diferentes sitios seleccionados: Malaria 250; Hospital regional 100; Izquieta Pérez 75, Clínica Santiago 25; Clínica Bermúdez 25 y Clínica Loja 10.

Aplicando la fórmula descrita tenemos:

$$n = \frac{(0.4)^2}{\frac{(0.05)^2}{(1.96)^2} + \frac{(0.4)^2}{485}} = 22$$

En consecuencia:

n = 22 muestras/semana; 90/mes.

En este estudio se muestrearon semanalmente 22 muestras (última semana 24), dando un total de 90 muestras en el mes de julio. De acuerdo al siguiente esquema:

Primera semana	22 muestras
Segunda semana	22 muestras
Tercera semana	22 muestras
Cuarta semana	24 muestras

Total de muestras mensual 90

3.2.3 Manejo del estudio

Las muestras se tomaron de conformidad al esquema descrito anteriormente. La cantidad de muestra de sangre fue de 5 recogidas en un tubo al vacío sin anticoagulantes, para luego extraer el suero y ser guardado en congelación en el laboratorio Izquierda Pérez de Santo Domingo, hasta completar el tamaño previsto de 91 muestras.

a.- Preparación del antígeno:

- Se usó un cultivo de *L. Biflexa* serovar Patoc a una densidad de 10(8) – 10(9) leptospira por ml determinada por microscopio de campo oscuro. Se agregó formaldehído a una concentración final de 0.2% y se dejó en la mesa del laboratorio por 2 a 3 horas.
- Se colocó en baño maría a 100° por 30 minutos
- Se guardó el sobrenadante, que constituye la fuente de antígeno.

b.- Cubrimiento de placas:

- Se procedió a dispensar 150 ul de antígeno en cada pocillo
- Se guardó a 37° C de 3 a 5 días hasta que se evapore.

c.- Saturando sitios no específicos:

- Se lavó las placas tres veces con PBS-leche inmediatamente antes de ser usada
- Se dejó los pocillos en contacto con PBS-leche, toda la noche a 4°C por 1 hora a 37°C.
- Inmediatamente se procedió a desocupar los pocillos por inversión y secar las placas golpeándolas contra papel filtro.

d.- Distribución de sueros problema

- Cada suero se analizó en duplicado a una dilución de 1/400 en PBS-leche. Para cada serie a estudiar se reservará:
- 8 pozos para rango de dilución de la mezcla positiva, de 1/400 a 1/51200
- 2 pozos para el umbral del suero control
- 1 pozo para el control del antígeno
- 1 pozo para el control del conjugado
- Incubación de las placas a 37° C por 1 hora.

e.- Agregado del conjugado

- Se procedió al vaciamiento de los pozos y lavado (3 veces) con PBS 1
- Se preparar el sustrato antes de ser usado
- Se dispensó 150 ul de conjugado diluido en cada pocillo
- Agitar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
- La reacción se detiene por el agregado de 50 ul de 10% de sodio duodecil sulfato (SDS) en cada pozo.

3.2.4 Análisis de los Datos

El análisis de los datos se realizó mediante la aplicación de la estadística descriptiva y determinación de porcentajes para cada grupo de muestras obtenidos, para lo cual se utilizó la hoja electrónica Excel, 2007.

Para determinar si existe efecto del género, edad y área de residencia sobre la manifestación de la enfermedad (número de muestras reactivas) se analizó mediante una regresión logística múltiple, tomando como variables independientes el género, la edad y el área de residencia que se consideraron para este estudio. Se aplicó el análisis de regresión logística múltiple por ser recomendado para modelar respuestas dicotómicas y es muy utilizado en el campo de la salud (López *et al.*, 2000). El modelo de la ecuación de regresión logística múltiple fue la siguiente:

$$Y = a + X_1 + X_2 + X_3 + E_j; \text{ donde:}$$

Y = manifestación de la enfermedad (número de muestras reactivas)

a = intercepto

X₁ = género

X₂ = edad

X₃ = Área de residencia

E_j = error experimental

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Teniendo presente que la prueba es específica para detectar pacientes con síntomas clínicos iniciales de la enfermedad (anticuerpos IgM), el estudio se enmarcó en la necesidad de demostrar al área médica y de Salud Pública del país, que la Leptospirosis es una patología que debe ser incluida como de **“Diagnóstico obligatorio”** a los pacientes que diariamente acuden a los diferentes centros de salud del país, basados en los resultados obtenidos en el presente estudio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos demuestran que un porcentaje considerable de las muestras resultaron reactivas. De 90 muestras analizadas en 60 días de prueba, **21 son reactivas o positivas que corresponde al 23%**, 5 indeterminados y 64 sueros no reactivos o negativos (Figuras 1 y 2).

Estos valores de interpretación diagnóstica se determinan de acuerdo a la Tabla 1, según el Test Leptospira IgM ELISA, utilizado para el presente estudio, de la Inverness medical Australia Pty Ltd., basados en niveles de refracción de luz: Negativos, Indeterminados y Reaccionantes o positivos.

Los sueros negativos son aquellos que no aglutinan y en consecuencia no se detecta anticuerpos IgM, lo cual nos demuestra que los pacientes no presentan infección reciente de Leptospira (3 a 5 días)

Los indeterminados se caracterizan porque carecen de densidad óptica que pueda medirse visualmente.

Los sueros positivos son aquellos que presentan clara aglutinación de anticuerpos IgM antileptospira, de conformidad a las concentraciones expuestas en el Cuadro 2.

Los pacientes cuyas muestras resultaron reactivas pertenecen tanto al área urbana (15 muestras) como al área rural (6) (Figura 7).

Según en el género, el número de muestras reactivas fue similar entre hombres y mujeres con 11 y 10 muestras, respectivamente.

La edad más vulnerable en el estudio correspondió a los adultos, cuyo número ascendió a 16 muestras reactivas frente a 5 muestras reactivas perteneciente a niños.

Cuadro 2. Interpretación de resultados. Test Leptospira Igm Elisa of the Inverness Medical Australian Pty Ltd. 2010.

Index	Pambio Units	Result
0 a <0.9	<9	Negative
0.9 – 1.1	9 – 11	Indeterminado
>1.1	> 11	Positive

4.1.1 Manifestación de la Enfermedad

De las 90 muestras tomadas al azar, 64 resultaron no reactivas, 21 reactivas y 5 indeterminados (Figura 4). El mayor porcentaje de muestras fueron no reactivas y el más bajo porcentaje de muestras fue indeterminado (Figura 5).

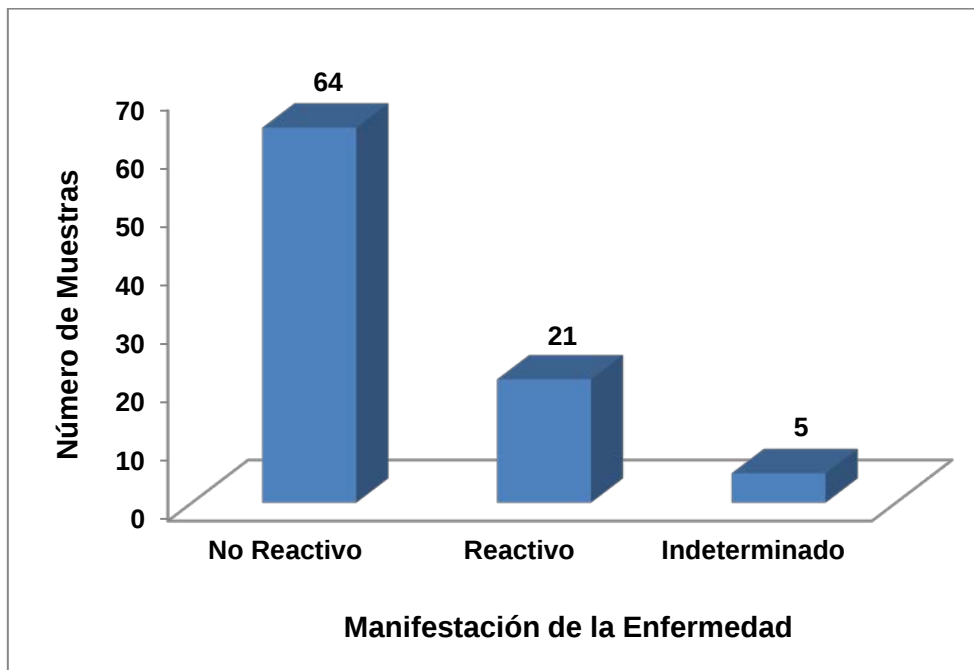


Figura 4. Número de muestras según manifestación de la enfermedad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

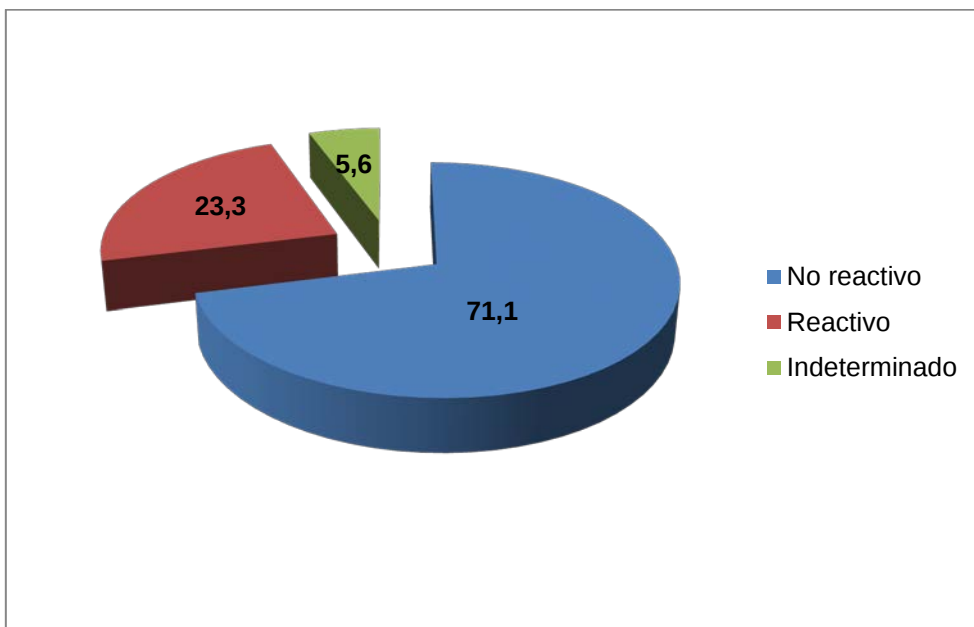


Figura 5. Porcentaje de muestras según manifestación de la enfermedad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

4.1.2 Muestras Reactivas por Área de Residencia

De las 21 muestras reactivas, 15 corresponden al área urbana y 6 al área periurbana (Figura 6) o periurbana. El mayor porcentaje muestras reactivas fue para el área urbana Figura (Figura 7).

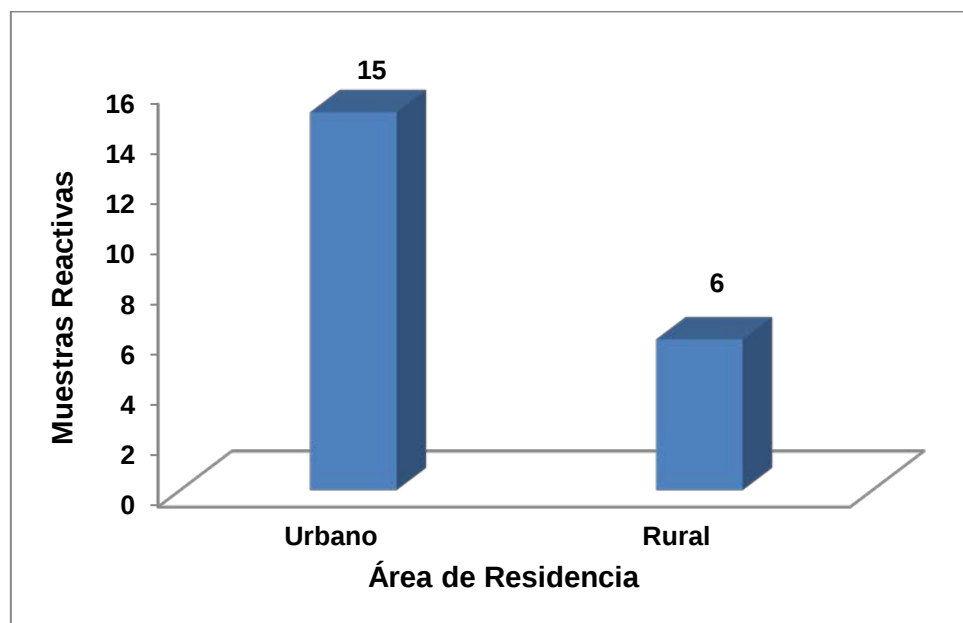


Figura 6. Número de muestras reactivas por área de residencia, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

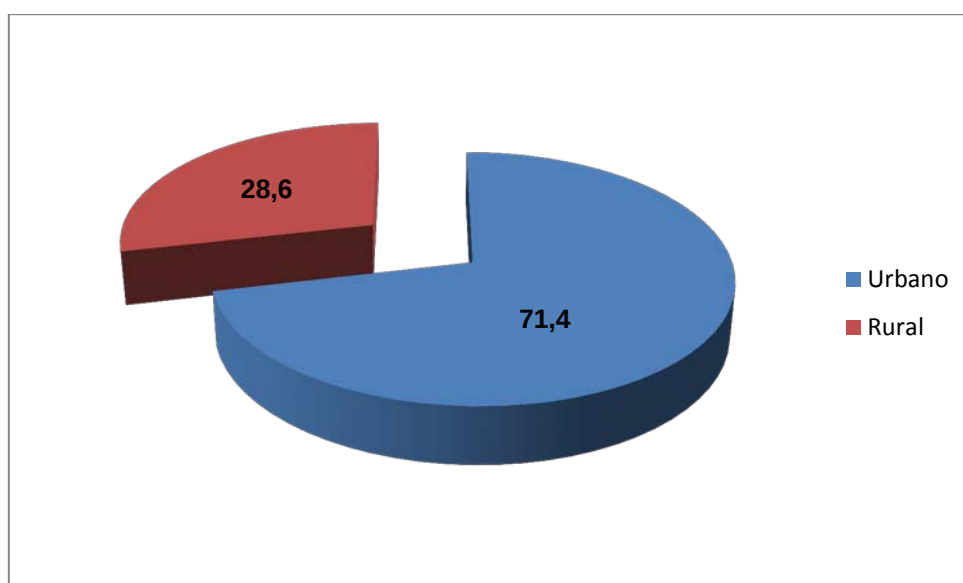


Figura 7. Porcentaje de muestras reactivas por área de residencia, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

4.1.3 Muestras reactivas según el Género

De las 21 muestras reactivas, 11 corresponden a hombres y 10 a mujeres (Figura 8). El porcentaje de muestras reactivas fue casi similar tanto en hombre como en mujeres (Figura 9).

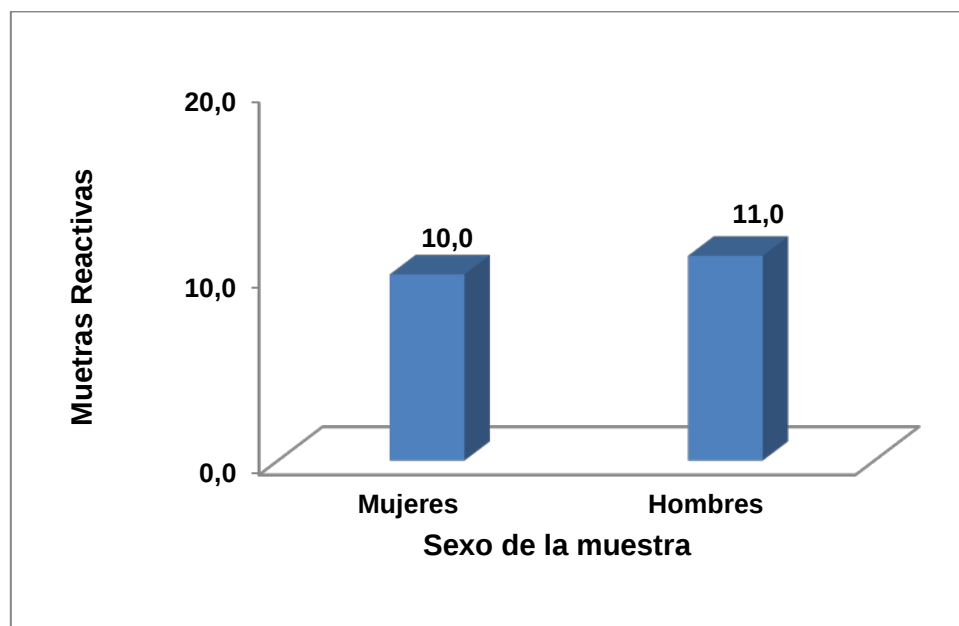


Figura 8. Número de muestras reactivas por género, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

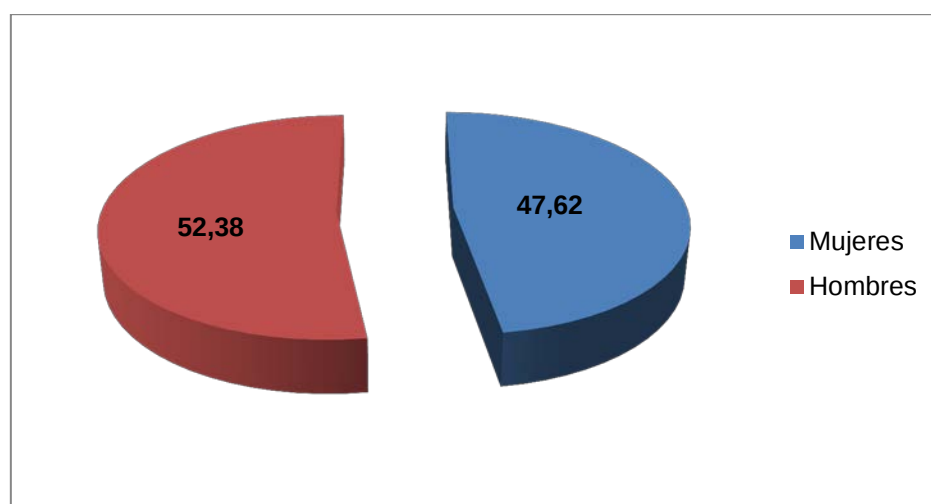


Figura 9. Porcentaje de muestras reactivas por género, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

4.1.4 Muestras Reactivas por Edad

De las 21 muestras reactivas, 16 corresponden a adultos y 5 a niños (Figura 10). El porcentaje de muestras reactivas fue más alto para el grupo de adultos (Figura 11).

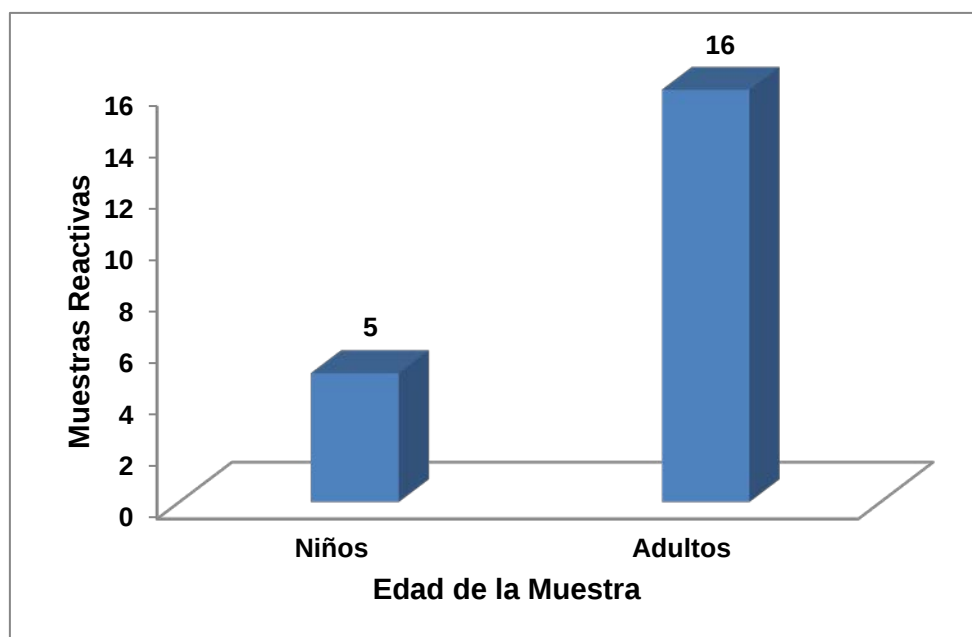


Figura 10. Número de muestras reactivas por edad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

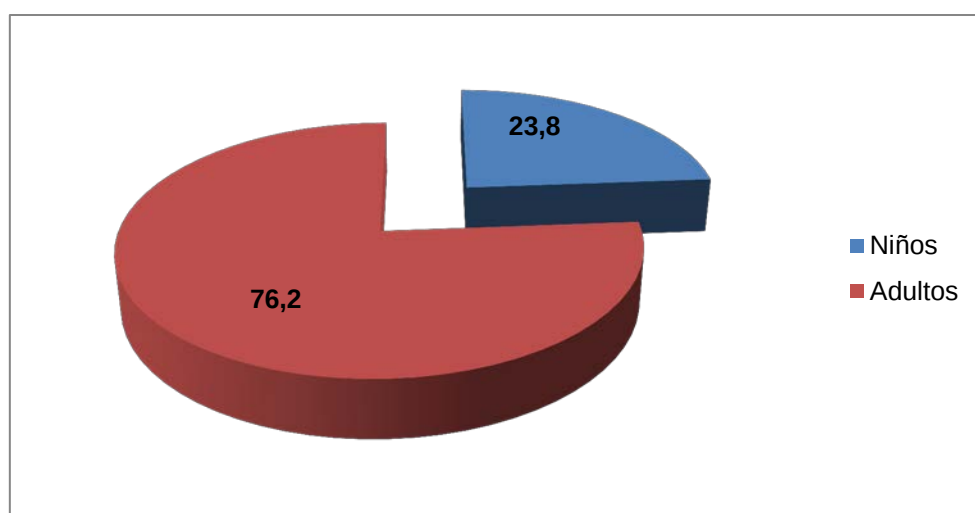


Figura 11. Porcentaje de muestras reactivas por edad, en el serodiagnóstico a pacientes sospechosos de Leptospirosis aguda.

4.2 DISCUSIÓN

Un método rápido e inicial en el diagnóstico de Leptospirosis humana es fundamental en la práctica rutinaria del médico inserto en los centros de salud, públicos y privados del país, en especial de la costa ecuatoriana donde particularmente tiene incidencia este estudio, pudiendo disponer de recursos de laboratorio de análisis, para una confirmación diagnóstica oportuna y efectiva.

Existen según Céspedes, M. y col. (2002), diferentes métodos de diagnóstico para Leptospirosis, como por ejemplo, fijación de complemento, test de latex y reacción de hemaglutinación, pero cuya desventaja es que no son muy sensibles ni específicas. Otros métodos como la inmunofluorescencia, contrainmunolectroforesis y radioinmunoensayo, requieren de equipos sofisticados (Myres D. 1987 y Ribero, A. y col. 1981); a diferencia de los métodos de ellos, **la técnica de ELISA tiene la gran ventaja por su simplicidad, sensibilidad y especificidad** (Céspedes, M. y col. 2002).

Este mismo autor sostiene que la estandarización y validación de la prueba de ELISA IgM Test para diagnóstico serológico de Leptospirosis humana fue realizada con la tentativa de obtener una prueba altamente sensible y específica de aplicación práctica para muchos laboratorios de El Perú. En nuestro país considero, a partir del presente estudio, que su afirmación es válida, debiendo los laboratorios de apoyo, en especial del Izquierda Pérez y los centros asistenciales mayores, disponer de esta prueba para diagnóstico rápido de la enfermedad, siendo opción del médico acudir a pruebas complementarias, como MAT u otras, para esclarecer, confirmar y/o profundizar su diagnóstico, cuando desea identificar con precisión la clase de *Leptospira* actuante en casos específicos.

En nuestro caso utilizando concentraciones de antígeno entre 0.5 -5.0 ug/ml. Se detectó la reacción en los sueros, demostrando una mayor sensibilidad de la prueba, por lo que será capaz de detectar bajos niveles de

anticuerpos antileptospira circulantes. El antígeno utilizado para esta prueba, fue de fácil ejecución y de buen rendimiento, en tanto que los procedimientos de preparación de antígenos tratados por sonicación presentaron resultados satisfactorios, coincidente con los reportado por Silva, V y col 1988; Silva, V. y col 1990; Cumberland, P. y col 1999; Mailloux, A. y col 1999.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con los reportados por Céspedes y col. 2002 y Cumberland, P. y col 1999, en relación a una buena sensibilidad (97,5%) y alta especificidad (98,75%) en el diagnóstico de la infección aguda o inicial de la enfermedad. En nuestro estudio la Prueba de Elisa IgM detectó todos los casos producidos por *Leptospira interrogans*, sergrupos Australis, Autumnalis; Ballum, Canicola, Pomona, Cynopteri; Djasiman; Mini, Hebdomadis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y otros (Panbio. Inverness Mediacol 2010). Consecuentemente, el ELISA descrito en el presente trabajo podría particularmente servir como prueba para seguimiento de rutina en el diagnóstico de Leptospirosis en el Laboratorio de Análisis de rutina de la práctica médica ecuatoriana y de Salud Pública, siendo rezago del pasado la desestimación que sobre esta enfermedad ha recaído en la atención normal del médico humano.

Por su rapidez, la prueba ELISA permite una confirmación diagnóstica rápida y segura, siendo útil en situaciones de epidemia o brotes, como las que regularmente se detecta en el litoral ecuatoriano y además en ciertas regiones de la sierra donde las condiciones de vida rural permite la proliferación de vectores, siendo la **rata y el perro doméstico**, los animales donde recae la mayor responsabilidad de transmisión al humano (Acha y col 2005; Villamil, J. 2000).

Los resultados obtenidos enriquecen de datos la difícil epidemiología de esta enfermedad zoonótica. Si valoramos los sitios de la ciudad de Santo Domingo donde viven la mayoría de los 23 pacientes reactivos o positivos, 16 de ellos residen según los datos obtenidos en las encuestas, en la zona periférica urbana, precisamente donde las condiciones de vida no son

adecuadas para el ser humano, existiendo visiblemente ratas y perros como los principales responsables de esta transmisión; mientras que los 7 restantes residen en zonas o Cooperativas periféricas al anillo interno de la ciudad, áreas también desprotegidas de servicios básicos y afectadas de estos transmisores, datos coincidentes con la mayoría de autores que demuestran esta realidad (Villamil, JC. 2000; Acha y col 2005; Herrero, A. 1960). En conclusión podemos afirmar coincidentes con Céspedes, M. y col. 2002 que ELISA IgM es un método rápido e inicial en el diagnóstico de Leptospirosis humana, útil para poder auxiliar al médico, el cual puede disponer éste recurso del laboratorio para una confirmación diagnóstica oportuna.

La tasa de reactivos por ELISA IgM en este estudio (23%) es alta, igual a la reportada por Ferro, BE. y col (2006) para la ciudad de Cali, Colombia en el año 2006, al utilizar la prueba de MAT que nos sirve en este caso de referencia y en otro estudio en varias regiones del Perú, reportado por la Oficina General de Epidemiología-Instituto Nacional de Salud (2000), sobre la enfermedad utilizando ELISA rápida, que alcanzó una tasa del 19%. En un estudio realizado en este último país por el mismo Instituto Nacional de Salud en el año 2002, al comparar las pruebas MAT y ELISA Test, demostraron una alta sensibilidad del 97.5% para MAT y especificidad del 98.75%, para ELISA test rápida, al evaluar 40 pacientes sospechosos de la enfermedad por la primera y 80 sueros de pacientes que presentaban otras patologías, para la segunda, no obteniéndose reacción cruzada con las enfermedades que afectaban al grupo en estudio.

Este estudio concuerda con nuestros datos tanto en sensibilidad como especificidad para ELISA Test utilizada por nosotros, lo cual reafirma que ésta prueba debe ser utilizada, en lo posible, siempre con MAT, para confirmar la presencia de la enfermedad en un paciente determinado. La detección rápida de la enfermedad en poblaciones grandes como la nuestra se debe utilizar ELISA Test, pero para individualizar el diagnóstico en un paciente la exposición a MAT debe ser usual para confirmar su presencia, determinándose hasta el género actuante del germen.

Por su parte Vado Solis, I. y col (2002) al estudiar la prevalencia de la leptospira en el Estado de Yucatán, México, encontraron tasas superiores al 37%, igual que Leal Castellanos CB. Y col (2003) en Chiapas, cifras que corroboran en otras latitudes la seriedad epidemiológica del problema en la salud pública de América, igual como nuestro estudio revela en un segmento de la costa ecuatoriana cifras verdaderamente preocupantes, que debe llamar la atención de las autoridades sanitarias, siendo ése nuestro principal objetivo.

En relación al género nuestro estudio revela cifras no coincidentes con la mayoría de autores consultados, que sesgan la mayor presencia al sexo masculino. En nuestro caso, 11 muestras reactivas (48%) correspondieron a hombres; mientras que 10 reactivas (42%) fue de mujeres, siendo casi igual el riesgo de exposición y respuesta del huésped, explicado porque el individuo adulto, independiente del género, está expuesto a infectarse en su domicilio o áreas cercanas, compartiendo el mismo medio contaminado por roedores y perros callejeros y domiciliarios, especialmente, en los cuales no ha sido diagnosticada la enfermedad.

Este hecho es confirmado, cuando la autora en compañía del Director del estudio, visitamos los sitios afectados, encontrando la alarma de las amas de casa, ante la presencia visible de roedores de alcantarilla y por ende en sus casas, además de la elevada circulación de perros callejeros y por ende de la existencia de perros en sus domicilios, que carecen de programas de salud veterinaria ni atención por parte de las autoridades, constituyendo las zonas afectadas como zonas visibles donde la leptospira encuentra las mejores condiciones de supervivencia y afectación, tanto a los mismos animales como a los humanos.

La presencia demostrada de la enfermedad en cinco niños en nuestro estudio (22%) demuestra que en la zona de estudio la enfermedad puede adquirirse en temprana edad, coligiéndose que el grado de exposición al riesgo de infectarse lo determina la convivencia con animales domésticos y la relación indirecta con excretas líquidas de roedores caseros, lo cual coincide con el

estudio realizado por J, Navarrete. y col. 2010 en Veracruz, México y la información que nos ofrece de alto contenido científico, Acha, PN. Cifres, B. (1992) en su Boletín de información en Zoonosis.

Un aspecto importante a considerar en posteriores estudios es la alta proporción de personas con anticuerpos a Dengue, afección por la cual acuden como única razón a los centros de salud de la ciudad, lo que nos lleva a deducir que puede existir una coexistencia de ambas infecciones en el mismo nicho ecológico, aspecto de alguna manera demostrado por nosotros pero que merece sea considerado en forma profunda.

En consideración a la regresión logística, la relación entre la manifestación de la enfermedad y las variables independiente fue bajo (38,22% de la variación en el número de muestras reactivas es explicada por el modelo). Ninguna de las variables independientes, consideradas en este estudio, tuvo efecto significativo sobre el número de muestras reactivas. Esto sugiere que existen otros factores que afectan a la manifestación de la enfermedad y que no se consideraron en este estudio. Además estos resultados indican que la enfermedad puede presentarse tanto en hombres como en mujeres, niños y adultos, y en cualquier área donde residen, siempre que existan los medios epidemiológicos, en especial animales receptores, que la transmitan.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- El método ELISA Indirecto descrita en la presente investigación, resulta de gran utilidad en el pesquisaje ante focos de Leptospirosis por sus ventajas en cuanto a sensibilidad, posibilidad de automatización y de procesamiento de gran número de muestras en corto tiempo. Consecuentemente el método podría particularmente servir como prueba para seguimiento de rutina de la enfermedad en la población humana, aunque es necesario la confirmación del diagnóstico por MAT como prueba de referencia.
- La prueba permite una confirmación diagnóstica rápida y segura, útil también en situaciones epidémicas o brotes, posibilitando dirigir medidas de vigilancia epidemiológica y control epidemiológico.
- Se concluye que el serodiagnóstico realizado en la población que asiste a verificar su posible padecimiento de dengue en varios sitios de la ciudad de Santo Domingo, responden a la prueba de ELISA Indirecta o Test rápido con tasas de anticuerpos específicos calificados como ALTA, (23%), lo cual se abre en el país y en el litoral en especial, una nueva posibilidad nosológica a la población humana de serias consecuencias individuales y catastróficas repercusiones a la salud pública en general.
- El análisis de los resultados obtenidos con ELISA Indirecta (23%) nos demuestra que los reactores a la prueba cursan la enfermedad en los picos altos de infección inicial; es decir entre 4 a 7 días post infección (Hathaway, S. Blackmore, D. 1981), donde la presencia de anticuerpos son IgM, siendo esos los detectados por la prueba. Posteriormente aparecen en forma normal anticuerpos IgG neutralizantes los cuales aumentan en forma progresiva hasta el día 15 post infección perdurando hasta los dos meses, cuando inician un lento descenso a niveles basales que pueden persistir por dos años (Tizar, IR. 2002), los cuales son detectados por MAT, demostrándose la necesaria dualización de las pruebas ELISA Indirecta y

MAT, ya indicada, si el médico desea precisión en su diagnóstico exigido por la realidad y su paciente.

- Revisados los resultados de infección según sexo, la rutina encontrada en otros estudios no se repite en nuestro caso, al deducirse que la fuente de infección es independiente a ese factor, teniendo tanto los hombres como las mujeres la misma posibilidad de infección.
- La frecuencia mayor de la infección en el grupo de riesgo fue en la zona urbana que periférica o rural denominada por nosotros, debido a la concentración elevada de roedores, perros callejeros y de domicilio, desprotegidos de control veterinario, que caracteriza a la ciudad, centro de preocupación sanitaria, donde la bacteria encuentra en el hacinamiento, desorden, concentración de desechos, malos hábitos poblacionales y un medio ambiente húmedo las condiciones ideales de multiplicación y transmisión, tornando a la ciudad como foco endémico de esta y otras patologías de difusión y contacto.
- El estudio igual que otros realizados en otras latitudes de América, demuestran que los niños igualmente pueden infectarse de la bacteria, en menor proporción de los adultos, debido según nuestra observación al contacto directo con transmisores domésticos como el perro e indirectos como la contaminación de orina de roedores, especialmente.
- El estudio demuestra que la enfermedad es desestimada tanto por los organismos sanitarios de control del MSP como por la clase médica humana que no incluye en su rutinario diagnóstico su presencia en la población, lo cual agrega un elemento de comportamiento médico negativo a la presencia de ésta u otras patologías que ocultamente causan serios estragos a la salud humana en general.
- Se concluye de manera enfática y directa que la Leptospirosis es una nueva patología zoonosica de seria preocupación en la salud de los habitantes de la ciudad y deducible del trópico ecuatoriano, con características de presencia alta, que obliga a las autoridades sanitarias a tomar muy en cuenta el presente estudio y agregar a la vigilancia sanitaria adecuada a fin de controlarla y disminuir su impacto.

- Los resultados obtenidos corroboran el peligro de la aparición, reemergencia y diseminación de una gran variedad de elementos infecciosos, que obliga al Estado con sus organismos de salud a desarrollar estrategias integrales de vigilancia epidemiológica, prevención y control de estas patologías, entre ellas la Leptospirosis, que se base en la participación conjunta del personal de salud, autoridades y comunidad.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda a las autoridades de salud de la provincia, divulguen los resultados obtenidos en el presente estudio, a través de sendas conferencias técnicas dirigidas a los médicos humanos y veterinarios, con miras a elevar el grado de conciencia e importancia sanitaria e informar al Ministerio respectivo la necesidad de incluir a esta patología en la lista de enfermedades de información obligatoria, agregando en las zonas y regiones vulnerables la pesquisa normal de ella en la población susceptible, a través del uso rutinario de la Prueba ELISA Indirecta que ha demostrado aquí y en el mundo su efectividad, por su especificidad y sensibilidad, que la tornan en la prueba inicial de rutina en el diagnóstico de esta patología en la población humana.
- Continuar los estudios que revelen nuevas situaciones de coexistencia entre los patógenos de presentación más usuales y nuevas formas de presentación, pesquisa, control y erradicación de estas enfermedades zoonóticas que se están tornando habituales en este medio de relación cada vez más estrecha entre el hombre y los animales.

6. BIBLIOGRAFIA

ABDULAKER, R., DAHER, E., CAMARGO, E., SPINOSA, C., DASILVA, M. (2002). Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo: 44 (2): 79-83.

AGUILAR, j. (2009). Comunicación personal. Proyecto a presentarse al SENACYT sobre prevalencia de tres enfermedades zoonóticas en la Provincia de Santo Domingo de los Tsachila. 28 pág.

AGUILAR, J. (2009). Comunicación personal. Informe sobre enfermedades zoonóticas en el trópico ecuatoriano a la Dirección del Instituto de Higiene Izquieta Pérez. 9 pág.

AGUILAR, J. (2009). Principales patologías de los animales domésticos en el trópico ecuatoriano. Rev. Centro Agrícola Santo Domingo. 4 pág.: 18-22. 42 pág.

ACHA, P. CIFRES, B. (1992). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 20 edición. Washington, DC. Organización panamericana de la Salud, 14-36.

ABUAUAD, M., OSORIO, J., et.al. (2005). Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de literatura. Rev. Chile de Infectología. Vol 22 N°1 pág. 93-97

AIDOREVICH, L., PINEDA, G., TOVAR, C. (2004). Diagnóstico de un caso de Leptospirosis humana. Revista Digital CENIAP HY Número especial 2004. Maracay. Venezuela.

ALCIDES, U. DOLOMBO, J., TRAMONTIN, V. (2002). Leptospirosis en la Provincia de Santa Fe: Descripción epidemiológica, clínica y socioeconómica.

Medicina Humana. Buenos Aires 62: 136: 140.

BERNAL, C. (2000). Metodología de la investigación para administración y economía. Prentice Hall Pearson. 259 pág.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO (2004). Oficina Sanitaria Panamericana. Boletín N° 22. 34 pág.

BROOKS, G. (2002). Microbiología médica. 17 edición. Ed. Manual Moderno. 58 pág.

BURGEL, J. ALMEIDA, A. PACELLO, F. (2002). XXX Congreso de Medicina Interna. Leptospirosis: a propósito de 14 casos diagnosticados en Payasandú. Departamento de Medicina del Hospital Escuela del Litoral y Corporación Médica de Paysandú. Uruguay. 59 pág.

BREILH, J., GRANDA, G. (2000). Investigación de la salud en la sociedad. Centro de estudios y asesoría en salud. POS. Quito, Ecuador. 47:51. 442 pág.

CASTELLANOS, L., GARCIA, R., GONZALEZ, E., FUENTES, J., ESCOBEDO, J. (2003). Risk factors and the prevalence of Leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, México. Epidemiol Infec. 131 (3): 1149-1156.

CONGRESO DE MEDICINA INTERNA (2002). Uruguay. Filippini M., del Monte A., Flores K., Parada D., Schelotto F., Hernández E., Soto R., Casales D., San Pedri L., Lobato L. Leptospirosis: epidemiología y diagnóstico. COMEF, Florida, CAAMEPA, Pando, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.

CESPEDES, Z. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD(2002). Prueba de ELISA Indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana. Perú. Rev. Med. Exp. Salud Pública, 19(1): 24-27.

DE AGUIRRE, L. (1999) Leptospirosis ocupacional en humanos. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Instituto de Investigaciones Veterinarias. Maracay. Venezuela.

DOUGLAS, B., MANDELL, G. (2002). Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. 78 pág.

ESTEVEZ, E. (2008). El arte de curar y enseñar. Publicación médica del SENACYT. 346: 348. 595 pág.

ESCOBAR, K. (2000). Investigación para médicos. Manual de Instrucciones. PUCE. Quito, Ecuador. 231 pág.

FARR, R. (2005). Leptospirosis. Clin. Infect. Dis. 21:1

FERNANDEZ, T. (2004). Medicina Tropical: Patologías tropicales, aspectos científicos, sociales y preventivos. Tercera Edición. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Guayaquil, Ecuador. 9-25. 472 pág.

FERRO, BE., RODRIGUEZ, A., PEREZ, M., TRAVI, B. (2006) Seroprevalencia de infección por leptospira en habitantes de barrios periféricos de Cali. Biomédica; 26:250-257.

FILIPINI, F., DEL MONTE, A., FLORES, K., PARADA, D., SCHELOTTO, F., HERNANDEZ, H., SOTO, R., CASALES, D., SAN PEDRI, L., LOBATO, L. (2002) XXX Congreso de Medicina Interna. Leptospirosis: epidemiología y diagnóstico. COMEF, Florida CAAMERA. Pando Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Uruguay.

HATHAWAY, S., BLACKMORE, D. (1981). Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospires of the Ballum serogroup in the black rat (*Rattus rattus*), and the brown rat (*Rattus norvegicus*) in the New Zealand.

Hyg. Camb. 87: 427-436.

HILL, D., LANGLE, M., MORROW, M. (1998) Occupational injuries and illnesses reported by zoo veterinarians in the United States. Journal of zoo and wildlife medicine. 29(4): 371-385.

HOSPITAL GENERAL "GUSTAVO DOMINGUEZ" (2009). Informe anual del año 2009 de la Dirección al MSP. Santo Domingo de los Tsachila, Ecuador. 45 pág.

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE IZQUIETA PEREZ (2009). Informe anual del Laboratorio Provincial de Santo Domingo de los Tsachila. 37 pág.

MARTINEZ, S., PEREZ, S., BARO, M. (2000). Evaluación de un grupo de pacientes en riesgo de Leptospirosis. Rev. Panam. Salud Pública. Pan Am. Journal. México.

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA DEL ECUADOR (2008). Informe del señor Ministro de Salud Pública a la OPS. Reunión Ministerial del Área Andina. 38 pág.

MURRIA, P., ROSENTHAL, K., KOBAYASHI, G., PFALLER, M. (2002). Microbiología Médica. Quinta edición. Ed. Mosby/Elsevier. 467 pág.

NAVARRETE, J., ACEBEDO, J., HUERTA, E., TORRES, D., GAVALDON, G. (2006). Prevalence of dengue and leptospira antibodies in the State of Veracruz, Mexico. Rev. Salud Pública de México. Vol. 48 N° 3, Junio 2006.

LIDNER C., SAVIO M. (2000). Vigilancia Epidemiológica. MSP. Situación de leptospirosis en Uruguay. El Diario Médico. Julio 2002.

LOMAR A., DIAMEN, D., TORRES J. (2005). Leptospirosis in Latin America. Emerging and re-emerging Diseases in Latin America. Infect Dis Clin N.A.: 14 (1); 23-38.

LOMAR, A., VERONESI R., BRITO, T. (1997). Diamant D. Leptospirases. Veronesi R., Focaccia R.1997. Tratado de Infectología. Ed. Atheneu.:987-1003.

LOPES, A., COSTA, E., BINA, J., SACRAMENTO, E.(2001). The association between serum potassium at hospital Admission and the case-fatality rate of leptospirosis in men. Rev Inst Med Trop. S. Paulo.:43(4):217-20.

PANBIO. (2010). Inverness Medical Innovation Australe Pty. Ltd. Instructivo ELISA Indirecta. 2 pág.

PUMAROLA, T., JIMENEZ, A. LOSADA M. (2002). Leptospirosis. Medicine.; 8(69): 3688-92.

PLAN DE DESARROLLO URBANO (2000-2010). Administración del Alcalde Holger Velastegui Dominguez. Municipio de Santo Domingo. 68 pág.

RODRIGUEZ, A., GOMEZ, H., PEREZ, B. (2001). Diagnóstico y tratamiento de la Leptospirosis humana. Rev. Cubana Me Gen Integr. 17 (1): 68-73.

SANCHEZ, M., MARMOLEJO, F., BRAVO, N. (2008) Microbiología: Aspectos generales. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Departamento de Ciencias Básicas. Colombia. 65:70. 260 pág.

SAMANIEGO, F. (2009). Comunicación personal. Elaboración de tesis doctoral. Datos consultados varias fuentes médicas humanas. Santo Domingo, Ecuador.

SERVICIO ERRADICACION MALARIA.(2009). Informes mensuales 2009. Ministerio de Salud Pública, Santo Domingo de los Tsachila, Ecuador.

SPELMAN, P. (1988). Leptospirosis in Harrison. Principles of internal medicine. Séptima edición. Capítulo 176.

SOLIS, V., MARRUFO, M., JIMENEZ, B., ALZINA, A., MOLINA, H., SUAREZ, V., ZABALA, J. (2002). Clinical epidemiological study of Leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán. México. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 44 (6): 335-340.

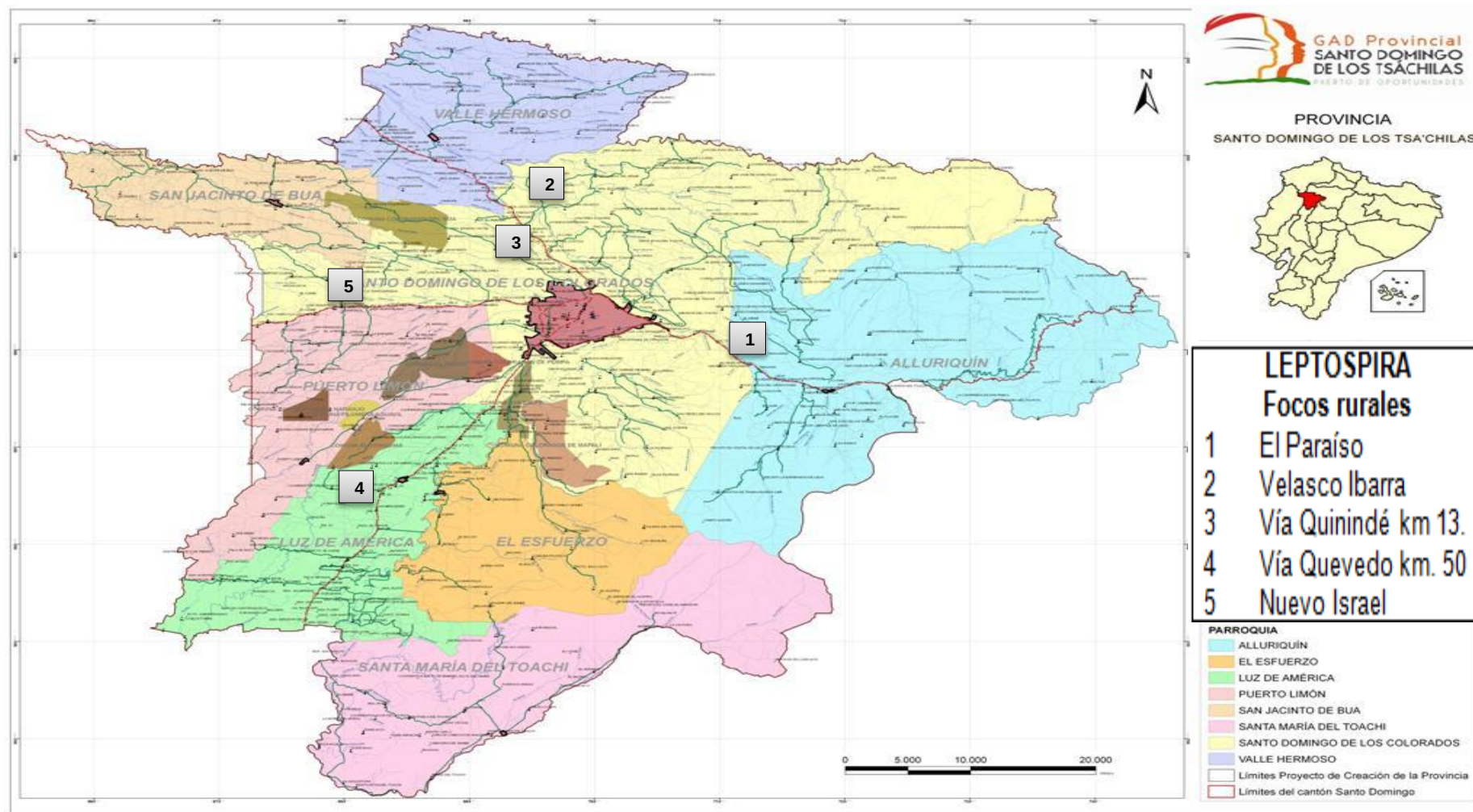
VILLAMIL, J., HERRERA, J. (2002). Hablemos de Zoonosis. Convenio SENA. Universidad Nacional de Colombia 85:88. 113 pág.

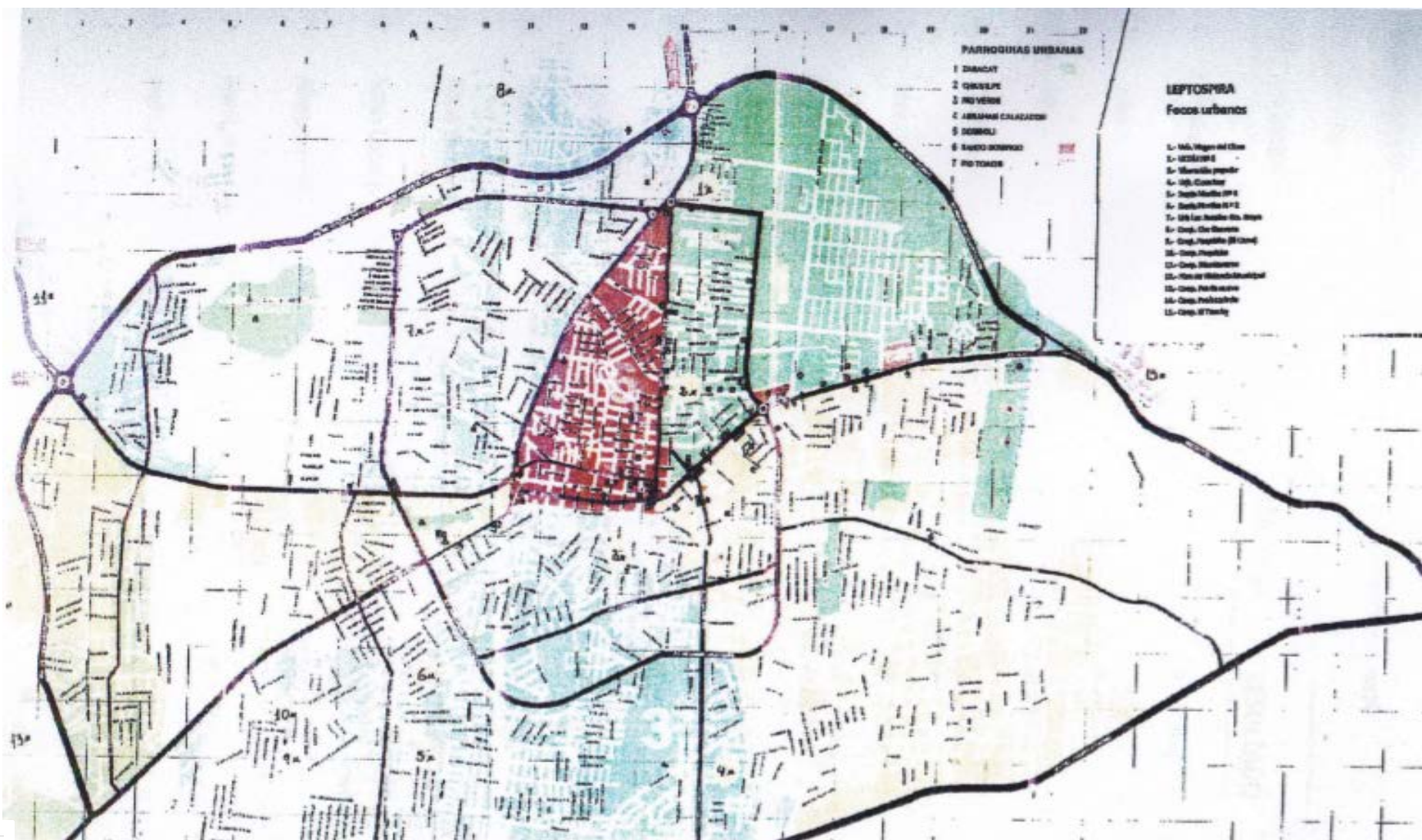
VILLAMIL, J. (2004). Epidemiología Básica. Convenio SENA. Universidad Nacional de Colombia 45:54. 110 pág.

VINETZ, J. (2001). Leptospirosis. Curr. Opin. Infect. Dis. 14:527-538.

ANEXOS

Anexo 1. Mapas de focos de frecuencia de la enfermedad en la ciudad: zona urbana, y espacio provincial, zona rural.





Anexo 2. Listado de reactores en las dos zonas.

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE
“LEOPOLDO IZUQUIETA PEREZ”
Laboratorio Santo Domingo

RESULTADOS REACTIVOS A LEPTOSPIRA: Agosto, 2010. Zonas Urbana y Rural.

Nº	NOMBRES	EDAD	DIRECCIÓN / ZONA	RESULTADO
1	Vilma Defáz	40	Urb. El Cisne/zu	REACTIVA
2	Manuel Cusme	18	Proletariado/zu	REACTIVA
3	María Duque	13	Los Rosales/zu	REACTIVA
4	Gabriel Arias	1	UCOM/zu	REACTIVA
5	José Chavez	28	Plan Vivienda/zu	REACTIVA
6	Washington Solórzano	36	Paquisha/zu	REACTIVA
7	Darío Véliz	14	E Toachi/zu	REACTIVA
8	José Sánchez	17	L.Popular/zu	REACTIVA
9	Disney Erazo	16	Patria Nueva/zu	REACTIVA
10	Tais Vera	9	Santa Matha/zu	REACTIVA
11	Alicia Zambrano	10	Paquisha/zu	REACTIVA
12	Sonia Lozano	25	Santa Martha/zu	REACTIVA
13	Alisson Jiménez	12	Montoneros/zu	REACTIVA
14	María Mendoza	48	Che Guevara/zu	REACTIVA
15	José Castro	69	Chanchay/zu	REACTIVA
16	Mayeri Hurtado	6	Las Mercedes/zr	REACTIVA
17	Royere Herrera	38	Nuevo Israel/zr	REACTIVA
18	Víctor Caluña	21	El Paraíso/zr	REACTIVA
19	Ramona Alcívar	59	Velasco Ibarra/zr	REACTIVA
20	Jorge Napa	57	Vía Quevedo km 50/zr	REACTIVA
21	Norma Fuentes	29	Vía Quinindé km 13/zr	REACTIVA

Anexo 3. Estimadores de máxima verosimilitud de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.

Parámetro	DF.	Estimador	Error estándar	Chi ² de Wald	Pr >Chi ²
Intercepto	1	-0.6120	1.2898	0.2252	0.6351
Género	1	-0.0352	0.5104	0.0048	0.9451
Edad	1	-0.5637	0.5901	0.9125	0.3395
Área de residencia	1	0.2167	0.5809	0.1392	0.7091

Anexo 4. Estimadores de los coeficientes de disparidad de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.

Efecto	Estimador del punto	Límites de confianza (Wald 95%)	
Género	0.965	0.355	2.625
Edad	0.569	0.179	1.809
Área de residencia	1.242	0.398	3.877

Anexo 5. Intervalos de confianza de verosimilitud de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.

Parámetro	Estimador	Límites de confianza (95%)	
Intercepto	-0.6120	-3.1642	1.9485
Género	-0.0352	-1.0487	0.9705
Edad	-0.5637	-1.8098	0.5424
Área de residencia	0.2167	-0.9722	1.3384

Anexo 6. Intervalos de confianza de Wald para coeficientes de disparidad ajustados de la regresión logística entre la enfermedad y la edad, género y área de residencia.

Efecto	Unidad	Estimador	Límites de confianza (95%)	
Género	1,00	0.965	0.355	2.625
Edad	1,00	0.569	0.179	1.809
Área de residencia	1,00	1.242	0.398	3.877