



"Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible"

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

## Trabajo de Graduación

Estandarización de prueba rápida para detectar  
Leptospirosis en bovinos realizado en el centro  
nacional de diagnóstico y referencia del ministerio  
de salud (MINSA)

### **Autora:**

Br. Andrea Lorieth Silva Colomer

### **Asesores:**

Deleana Del Carmen Vanegas M.Sc.

Alberto Montoya Pérez M.Sc.

Lester Rocha Molina PhD.

**Managua, Nicaragua**

**Septiembre, 2022**

Este trabajo de graduación, de investigación, fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Ciencia Animal como requisito parcial para optar al título profesional de:

**Médico Veterinario**

En el grado de licenciatura

Miembros del Honorable Comité evaluador

---

M.V. Martha Rayo Rodríguez MSc.

Presidente

---

M. V Karla Marina Ríos Reyes

Secretaria

---

M. V Marbell López Brenes

Vocal

**Lugar y fecha:** Auditorio CECAP/ Managua 1 de Septiembre de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco este trabajo primeramente a Dios todo poderoso, por brindarme la oportunidad de vivir, de poder tener sueños y todavía más por concederme cumplirlos, a mis dos hijos Yoardin y Sofía por ser la fuerza y la alegría de mi vida, a mis padres Yoardin Silva y Patricia Colomer y a mi esposo David Cáceres.

A mis maestros por el apoyo brindado, al doctor Lester Rocha, al personal del laboratorio del ministerio de salud, en el cual se me brindó la oportunidad de realizar esta investigación, donde no escatimaron en gastos poniendo a mi disposición cualquier material que me fuese requerido y de manera destacada al director de parasitología MINSa, Alberto Montoya y a los encargados del área de referencia para Leptospirosis doctores Agustín Darce y Román Vallecillos, quienes me guiaron, supervisaron y contestaron con la mayor disposición y amabilidad mis inquietudes, dándome los mejores consejos.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma siempre tuvieron una palabra de aliento y que me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>SECCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>INDICE DE CONTENIDO</b>	ii
<b>INDICE DE CUADROS</b>	v
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	vi
<b>INDICE DE ANEXOS</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II OBJETIVOS</b>	3
2.1 General	3
2.2 Específicos	3
<b>III MARCO DE REFERENCIA</b>	4
3.1 Generalidades de la Leptospirosis	4
3.1.2 Definición	5
3.1.3 Sinonimias	5
3.1.4 Taxonomía y Clasificación	5
3.1.5 Reservorios	6
3.1.6 Transmisión	7
3.1.7 Síntomas Clínicos	7
3.1.8 Anatomía Patológica	8
3.1.9 Principales lesiones de los órganos más afectados	8
3.1.10 Patogenia	9
3.1.11 Epidemiología	9
3.1.12 Leptospirosis en Bovinos	10
3.1.13 Diagnóstico	10
3.1.14 Diagnóstico diferencial	11
3.1.15 Pruebas diagnósticas para Leptospirosis	11
3.1.16 Profilaxis y Tratamiento	12
<b>IV MATERIALES Y METODOS</b>	13

4.1	Diseño metodológico	13
4.2	Universo y Ubicación del área de estudio	14
4.3	Población de estudio	14
4.3.1	Criterios Intrínsecos	15
4.3.2	Criterios Extrínsecos	15
4.3.3	Factores de inclusión	16
4.3.4	Factores de exclusión	16
4.4	Fase de campo	17
4.5	Fase de Laboratorio	17
4.5.1	Obtención del antígeno	17
4.5.2	Análisis de muestras	18
4.5.3	Fundamento de las técnicas aplicadas	20
4.6	Selección de las muestras para el método de aglutinación en Látex	25
4.7	Recolección de datos	25
4.8	Variables a evaluar	25
4.8.1	Sensibilidad	26
4.8.2	Especificidad	26
4.8.3	Valor Predictivo Positivo	26
4.8.4	Valor Predictivo Negativo	26
4.8.5	Índice de kappa	27
4.9	Análisis de datos	28
4.10	Materiales y equipos	28
<b>V</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>30</b>
5.1	Procedimiento para prueba rápida de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de Leptospirosis bovina	30
5.2	Efectividad de la prueba rápida a través de los parámetros tradicionales de sensibilidad y especificidad.	31
5.3	Funcionabilidad de la prueba rápida	33
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>VII</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>36</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>37</b>



## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Cepas de referencia donadas por Holanda, Fuente: MINSA, 2017	19
2. Interpretación de porcentaje de aglutinación	21
3. Componentes del pbs	22
4. Componentes del buffer de Glicina	23
5. Componentes del buffer Coating	24
6. Componentes de BSA	24
7. Valores para prueba de referencia	26
8. Lista de materiales y equipos para muestreo	28
9. Lista de materiales para laboratorio	29
10. Lista de equipos para laboratorio	29
11. Resultados de antígenos en cromatografía	30
12. Resultado de las variables a evaluar para la prueba de látex	32
13. Resultados de las 3 pruebas	32

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Diseño de prueba rápida para detección de Leptospirosis	13
2. Estudio conjunto CNDR-MINSA, IPSA	14
3. Encharcamiento de caminos de acceso a las comunidades	15
4. Ríos contaminados y aguas compartidas con las actividades agrícolas	15
5. Crecida de los ríos	16
6. Aguas contaminadas utilizadas para consumo y recreación	16
7. Aguas anegadas entre factores que propician la propagación de la Leptospirosis	16
8. Control de cepas en el gabinete de flujo laminar	17
9. Fundamento de la reacción antígeno- anticuerpo aplicada a la técnica de aglutinación en látex	20
10. Calibración de los tubos según su peso	21
11. Centrifugación	21
12. Esquema para Microplaca MAT	22
13. Preparación de PBS	22
14. Preparación de soluciones y reactivos	23
15. Albumina Sérica bovina	24
16. Diferentes grados de aglutinación	31

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Morfología de las leptospiras	41
2. Microaglutinación de leptospiras vistas en microscopio de campo oscuro	41
3. Mapa de transmisión de leptospirosis en el territorio.	41
4. Rotulación de soluciones	42
5. Lavado de placas	42
6. Rotulación de cultivos de nuevas cepas	42
7. Procesamiento de muestras bovinas	43
8. Lavado de latex	43
9. Muestras en microplaca para ELISA	43
10. Cepas manejadas en Gabinete de flujo laminar	44
11. Preparación de soluciones y reactivos	44
12. Baño María	45
13. Vortex	45
14. Micro-pipetas multicanal	45
15. Micro pipetas	45
16. Centrifuga	45
17. Cuarto frío	46
18. Lector de ELISA	46
19. Rotulación de reactivos	46
20. Microscopio de campo oscuro	46
21. Medidor de PH (Corning)	46
22. Balanza Electrónica	46
23. Cristalería para soluciones	46
24. Formato para MAT	47
25. Glosario	48

## RESUMEN

Este trabajo es un estudio experimental con el objetivo de estandarizar una prueba rápida de aglutinación en látex para detección de Leptospirosis bovina. La prueba fue previamente sensibilizada para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* en muestras de sueros bovinos tomados en comunidades donde se han presentado casos positivos en humanos. Para la selección de la muestra se tomaron en cuenta criterios intrínsecos e extrínsecos y factores de exclusión e inclusión. Procesándose un total de 64 muestras. Estas se tamizaron de forma simultánea por dos técnicas de diagnóstico para Leptospirosis (Microaglutinación en látex, ELISA) y la confirmación de los casos positivos se realizó por Microaglutinación con antígenos vivos (MAT). Los parámetros evaluados fueron sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice Kappa ponderado. Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R. El procedimiento del diseño de la prueba rápida para el diagnóstico de leptospirosis en la especie bovina se llevó a cabo en seis etapas: 1. Preparación del antígeno, 2. Lectura a través del método de Lowry, 3. Sensibilización de las perlas de látex, 4. Acoplamiento de las partículas de látex al antígeno, 5. Procedimiento para prueba rápida de aglutinación con partículas de látex para diagnóstico de Leptospirosis bovina, y 6. Interpretación de los resultados. En cuanto a su efectividad los resultados son satisfactorios ya que se encuentran dentro de los valores de aceptación: La prueba de Microaglutinación en látex resultó con la mejor concordancia (índice de Kappa ponderado = 0.74) con la prueba de referencia MAT, considerándose como una técnica BUENA y cuyo valor se ubica dentro del rango de referencia del nivel número 4 con valores de 0,61-0,80 (Fleiss, 1985). Esta prueba presentó valores de sensibilidad de 90%, especificidad de 85%, valor predictivo positivo 92% y valor predictivo negativo de 81%. La técnica de aglutinación en látex demostró su efectividad ante la sospecha de leptospirosis bovina al ser, rápida y simple, convirtiéndola en una prueba que podría constituir un diagnóstico presuntivo a la brevedad y proveer la posibilidad de una terapéutica inmediata.

Palabras claves: Microaglutinacion, latex, deteccion, leptospiras.

## ABSTRACT

The present work is an experimental study with the objective of standardizing a rapid latex agglutination test for the detection of bovine Leptospirosis. The test was previously sensitized for the detection of antibodies anti-*Leptospira* in samples of bovine sera taken in communities where positive cases have been presented in humans. For the selection of the sample, intrinsic and extrinsic criteria and exclusion and inclusion factors were taken into account. Processing a total of 64 samples. The samples were simultaneously sieved by two diagnostic techniques for Leptospirosis (latex microagglutination, ELISA) and the confirmation of positive cases was performed by live antigen microagglutination (MAT). The parameters evaluated were prevalence, sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and weighted Kappa index. All analyzes were performed with the statistical software R. The design procedure of the rapid test for the diagnosis of leptospirosis in bovine species was carried out in six stages: 1. Preparation of the antigen, 2. Reading through the method of Lowry, 3. Sensitization of latex beads, 4. Coupling of latex particles to antigen, 5. Procedure for rapid agglutination test with latex particles for the diagnosis of Bovine Leptospirosis, and 6. Interpretation of results. Regarding its effectiveness, the results are satisfactory since they are within the acceptance values: The microagglutination test in latex resulted in the best agreement (weighted Kappa index = 0.74) with the MAT reference test, considering it as a technique GOOD and whose value is located within the reference range of level number 4 with values of 0.61-0.80 (Fleiss, 1985). This test presented values sensitivity of 90%, specificity of 85%, positive predictive value 92% and negative predictive value of 81%. The latex agglutination technique proved to be effective when suspected of bovine leptospirosis as it was quick and simple, making it a test that could constitute a presumptive diagnosis in the short term and provide the possibility of immediate therapy.

Key word: Microagglutination, latex, detection, leptospire.

## I. INTRODUCCIÓN

Este trabajo presenta el desarrollo de la técnica de aglutinación en látex para el diagnóstico de Leptospirosis bovina en sangre, como método indirecto, tomando en cuenta los criterios de validación para una prueba y comparándola con las pruebas estándar ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y MAT (Microagglutination Test).

Durante la presentación del Boletín epidemiológico (2006) Análisis de Situación de Salud y Recomendaciones para el Desarrollo Sanitario de Nicaragua.) El ministerio de salud MINSA informo:

La Leptospirosis es una zoonosis de gran relevancia en nuestro país. Desde octubre de 1995, en Achuapa, Nicaragua, se registraron 2000 casos y 40 defunciones en humanos que presentaban una enfermedad febril hemorrágica a la que inicialmente se le estableció un diagnóstico de dengue hemorrágico, pero las pruebas serológicas fueron negativas para esta enfermedad y posteriormente se confirmó el diagnóstico de Leptospirosis en los humanos. El brote de lo que se conoció como la fiebre de Achuapa, ha venido comportándose de forma endémica en la región.

“La Leptospirosis es una enfermedad provocada por una bacteria de tipo helicoidal, flexible, espirilada y móvil, denominada *Leptospira* que afecta a varias especies de mamíferos (domésticos, silvestres) además de transmitirse al humano, por lo que se le considera una zoonosis” Norma Técnica Nicaragüense 25 001 – 05(2005).

“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 su transmisión” OPS (2009)

El ministerio de salud de Nicaragua 2006 expresaron que:

Nicaragua presenta un clima que propicia el desarrollo de esta enfermedad, por poseer 2 estaciones climáticas bien marcadas (invierno y verano) en períodos de 6 meses cada una, manteniéndose la estación lluviosa de mayo a octubre, siendo estos meses el tiempo de mayor prevalencia de la enfermedad en la población susceptible.

La revista cubana de medicina militar en 2015 determina en su actualización en el diagnóstico de leptospirosis que:

La leptospirosis debe distinguirse de otras enfermedades, ya que la gran similitud en la presentación epidemiológica y clínica no puede ser detectada ni demostrada con seguridad exclusivamente sobre la base de síntomas o signos, el diagnóstico solo puede establecerse con certeza en el laboratorio mediante la comprobación de la presencia del agente etiológico, o por procedimientos serológicos.

“Es por esto que el diagnóstico serológico dentro de los métodos de diagnósticos epizoóticos, constituye el más confiable respaldo para el investigador sobre la detección de enfermedades infectocontagiosas “(Pardo, 2001, p. 61).

Actualmente no se encontró reportes de literatura científica en nuestro país de la existencia de pruebas rápidas para la detección de *Leptospiras* en bovinos, solo las aplicadas en humanos, la cual fue desarrollada en nuestro país mediante cooperación holandesa y especialistas del centro de referencia logrando avances importantes en el diagnóstico de la Leptospirosis humana, la prueba fue denominada Kit “Látex Lepto-CNDR/MINSA”, esta consiste en la detección de anticuerpos IgM específicos anti-*Leptospira* en menos de 1 minuto, dicha prueba se introdujo en 12 municipios endémicos del país en el año 2008.

Este estudio servirá para estandarizar una prueba rápida, la cual puede ser utilizada como herramienta básica para la identificación de la enfermedad y la prevención de la infección por *Leptospira sp.* El kit Látex Lepto constituye la primera experiencia del país en el desarrollo de tecnología de pruebas rápidas.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Estandarizar una prueba rápida de aglutinación en látex para la detección de Leptospirosis bovina.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Diseñar una prueba rápida para el diagnóstico de Leptospirosis en la especie bovina basados en las técnicas de aglutinación antígeno - anticuerpo.

Comprobar la efectividad de la prueba rápida a través de los parámetros tradicionales de sensibilidad y especificidad ante las técnicas de referencias (MAT y ELISA).

Valorar la funcionalidad de la prueba rápida considerando como criterios la utilidad y practicidad del mismo.

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 Generalidades de la Leptospirosis

El ministerio de salud de Perú (2000) en su módulo técnico de vigilancia epidemiológica describe:

El descubrimiento de la leptospirosis tiene sus inicios a partir de la descripción de Weil (1886) como una enfermedad que transcurría de forma aguda en personas en las que se manifestaba con un aumento del bazo, ictericia y nefritis y diferenciada sustancialmente por una ictericia diferente a todas las ictericias conocidas anteriormente. Sin información sobre su agente en esa época.

En 1887 Goldschmidt y Fidler, se refirieron a estas infecciones ictericas y proponen el nombre de “Enfermedad de Weil” en honor al principal investigador de esta, además de dar la primera descripción abierta de la clínica de la Leptospirosis, la cual fue presentada de la forma siguiente:

Enfermedad muy diseminada en forma de acceso febril, que se desarrolla en la mayoría de los casos sin antecedentes, directamente con escalofríos, fiebre alta, con frecuencia de 40°C, con dolor de cabeza, cansancio en el cuerpo, con la lengua cubierta por una masa blanco amarillenta y aumento del bazo y el hígado.

Posteriormente Eodsworth informó del primer caso en seres humanos, adecuadamente documentado con aislamiento del agente en 1922. Desde entonces, se han venido identificando nuevos serotipos de *Leptospiras* (actualmente alrededor de 180) patógenas para animales y el hombre, que comprometen no sólo la salud sino la economía de las regiones afectadas.

OPS (2012) en el foro nacional de Leptospirosis Nicaragua se expuso la situación epidemiológica en el país dándose a conocer los siguientes datos:

Del 9 al 29 de Octubre de 1995, pacientes de Achuapa, Nicaragua fueron hospitalizados con un diagnóstico de “Fiebre Hemorrágica” y los estudios realizados después del brote, reportan a la Leptospirosis como una enfermedad infecciosa emergente en nuestro país con 2,254 casos y 48 defunciones (por distres respiratorio y hemorragia pulmonar, sin ictericia).

Después de dicha emergencia, se han creado planes de control por el MINSA para reducir las infestaciones, registrándose los brotes más fuertes en 1998, en los departamentos de Estelí y Chinandega, posteriores al paso por el territorio del huracán Mitch, en 2004 según el reporte de la OIE, se detectaron en Nicaragua: 5 focos en bovinos, con 5 muertos; 1 foco en equinos con 2 muertos y 1 foco en porcinos con 7 muertos, por la enfermedad y en el año 2007 otro brote en Chinandega y León, durante los meses de octubre- noviembre.

### **3.1.2 Definición**

“La leptospirosis es una enfermedad transmisible adquirida por los animales y el hombre, producida por la infección con la espiroqueta *Leptospira*. Todas las *Leptospiras* patógenas se clasificaron anteriormente como miembros de la especie *Leptospira interrogans*” (OIE, 2010, p. 29)

### **3.1.3 Sinonimias**

Enfermedad de Weil

Fiebre de los arrozales

Fiebre de los cañaverales

### **3.1.4 Taxonomía y Clasificación**

#### *etiología*

Clasificación taxonómica

- División: Procariotes
- Clase: Schizomicetes
- Orden: Spirochaetales
- Familia: Leptospiraceae
- Género: *Leptospira*
- Especies: *L. interrogans*, *L. biflexa* (Sánchez, 2014 p. 2).

Castro, 2016 en la revista médica del seguro social de México describe las leptospiras como:

Bacterias aeróbicas estrictas miembros del Orden Spirochaetales, con forma de espiral, su diámetro es de aproximadamente 0.25 µm y su longitud oscila entre 6-25 µm. Tienden a formar un gancho aerobio que se ha diferenciado de otras espiroquetas patógenas y se pueden cultivar en medios artificiales (p. 621).

McDonough (2001) agrega en su actualización de leptospirosis en caninos que:

La temperatura óptima de crecimiento es 30°C y el tiempo para obtener una nueva generación es de 7 a 10 días para nuevas colonias aisladas, pero son difíciles de recuperar mediante cultivos in vitro

El método tradicional de clasificación dividió a las *leptospiras* en aproximadamente 200 serovares basados en las diferencias antigénicas (serológicas) y todas las *Leptospiras* patógenas fueron clasificadas como una especie, *L. interrogans* mientras que los serovares de vida libre no patógenos fueron incluidas en la especie *L. biflexa*.

El complejo *interrogans* con base en propiedades antigénicas, se subdivide a su vez en aproximadamente 180 serotipos.

Estos 180 serotipos, por su comportamiento inmunológico, se han dividido en 18 subgrupos. Entre los más comunes se encuentran: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. canicola*, *L. pomona*, *L. australis* y *L. Grippotyphosa* (p.4-6)

### **3.1.5 Reservorios**

La asociación de médicos AMSE en 2012 describen:

Los principales reservorios de la *Leptospira* en ambiente urbano son los perros y las ratas, mientras que en el campo son los bovinos, porcinos y equinos, pero cada serovariedad tiene reservorios preferentes como son las ratas para *L. icterohaemorrhagiae*, los cerdos para *L. pomona*, el ganado bovino para *L. hardjo* y los perros para *L. canicola*. Muchos otros mamíferos son capaces de mantener estados de portador breves.

En los animales portadores aparece la infección de forma grave, leve o asintomática, pero incluso los portadores asintomáticos albergan el agente en los túbulos renales, donde la *Leptospira* puede persistir durante años e incluso toda la vida.

### **3.1.6 Transmisión**

Según lo descrito por Castro en 2016:

El ciclo de transmisión de leptospirosis inicia con la presencia de reservorios y hospederos portadores de bacterias en sus túbulos renales de donde son excretadas por la orina (leptospiuria) contaminando agua, suelo, instalaciones, pasturas, alimentos, etc., medios donde permanecen viables hasta infectar nuevos hospederos susceptibles.

La infección en seres humanos aparece generalmente por la exposición accidental a orina conteniendo espiroquetas o por contacto con algún medio contaminado, ingesta de alimentos antihigiénicos y por la mordida de animales positivos.

La leptospirosis en seres humanos también puede ser adquirida a través de actividades ocupacionales, recreativas o exposiciones en laboratorios. Por ello, la ocupación es un factor de riesgo importante debido a que suele presentarse en trabajadores en contacto con animales, sus productos y/o subproductos, o que laboran en terrenos húmedos y/o zonas semi inundadas (p. 5)

### **3.1.7 Síntomas Clínicos**

La OPS (2009) describe:

Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias; Meningitis/meningo encefalitis; Hemorragia pulmonar con falla respiratoria.

Características clínicas más frecuentes: Fiebre; dolor de cabeza, mialgia (en particular en el músculo de la pantorrilla), infección conjuntival, ictericia; mal estar general entre otros síntomas/signos.

Período de incubación: 5-14 días, con un rango de 2-30 días.

### **3.1.8 Anatomía Patológica**

La organización mundial de la salud en 2003 promueve la guía para el diagnóstico, vigilancia y control de la leptospirosis en la cual describe ampliamente las principales afectaciones:

La lesión histopatológica básica en la leptospirosis es una vasculitis con compromiso multisistémico, donde el riñón y el hígado son los órganos que sufren con más frecuencia. En los casos severos (síndrome de Weil) se encuentra hemorragia generalizada que compromete principalmente músculos esqueléticos, riñón, pulmones, piel, tubo digestivo y bazo. Entre los factores que explican la tendencia hemorrágica están la vasculitis y la trombocitopenia (p.109).

### **3.1.9 Principales lesiones de los órganos más afectados**

Campos (2014) en su publicación de septiembre a diciembre en la revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana enuncia los siguientes órganos como lo principalmente afectados por la leptospirosis bovina:

**Hígado:** Se debe sobre todo a una disfunción hepatocelular usualmente sin necrosis o con ataque estructural leve, lo que explica en buena parte la ictericia en algunos pacientes.

**Riñón:** La falla renal es principalmente consecuencia de lesiones tubulares. Este daño parece ser originado en isquemia renal por hipovolemia e hipotensión por pérdida del volumen intravascular, debido al compromiso endotelial o por algún efecto tóxico directo de la *Leptospira*.

**Ojos:** Durante la fase aguda de la enfermedad, la congestión conjuntival es un hallazgo clínico común.

**Corazón:** 70% de los pacientes tiene anomalías electrocardiográficas, también se han encontrado bloqueos, miocarditis, aortitis, pericarditis y endocarditis.

### **3.1.10 Patogenia**

Zunino (2007) en la Revista chilena de infectología describe:

La leptospirosis puede presentarse con diferentes formas y grados de compromiso orgánico, ya sea como un cuadro febril inespecífico, o como una enfermedad grave con compromiso multiorgánico y alta letalidad. Clásicamente, se describe como una enfermedad febril bifásica, cuyas manifestaciones clínicas se observan durante la primera semana de evolución.

### **3.1.11 Epidemiología**

La asociación de médicos de sanidad exterior AMSE en 2016 muestra los siguientes datos:

La distribución de la leptospirosis es mundial, a excepción de las regiones polares. Es la zoonosis más extensa del mundo y se presenta en países desarrollados y en desarrollo, tanto en zonas rurales como urbanas, aunque está más extendida en países de clima tropical, debido a la mayor supervivencia del microorganismo en ambientes cálidos y húmedos.

Así mismo, la enfermedad presenta una cierta estacionalidad, presentándose más casos en verano y otoño en los países templados y durante las épocas de lluvia en países cálidos. Es difícil estimar la prevalencia de la enfermedad, debido a la falta de datos en general.

Según los datos de la PAHO, la Región de las Américas es la que más alertas de esta enfermedad presenta a nivel mundial. En el total de las 568 alertas de leptospirosis publicadas en la base de datos “Health Map” entre 2007 y 2011, más de la mitad correspondían a las Américas, principalmente afectando a Brasil (140 alertas), Nicaragua (53), República Dominicana (28) y Honduras (19).

### **3.1.12 Leptospirosis en Bovinos**

Sánchez, 2014 manifiesta:

La leptospirosis bovina produce pérdidas económicas de manera primaria por sus efectos sobre la producción, pudiendo aparecer mortinatos, abortos o nacimientos de animales débiles, e infertilidad y Se consideran como pérdidas secundarias al síndrome de la caída de la leche o agalactia transitoria. Por efectos en la producción del rebaño y el hecho de ser catalogada como una zoonosis.

El bovino actúa como hospedero de mantenimiento de esta bacteria. En los animales enfermos crónicos, las leptospiras persisten en el riñón y en el tracto genital tanto del macho como de la hembra, por lo que de estos sitios se excreta la bacteria a través de la orina, productos abortados y posiblemente semen.

Se ha considerado la serovariedad hardjo como la más importante en bovinos, por ser una serovariedad adaptada a ésta especie.

### **3.1.13 Diagnóstico**

La OIE en 2010 publica el Manual de recolección de muestras:

Identificación del agente: El aislamiento y la detección de las leptospira en los órganos internos como (el hígado, pulmón, cerebro y el riñón) y en los fluidos corporales (leche, sangre, etc.) de los animales infectados clínicamente proporciona un diagnóstico definitivo de la enfermedad clínica aguda.

Demostración de anticuerpos: Las pruebas serológicas constituyen el medio más ampliamente utilizado para el diagnóstico de la Leptospirosis y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) es la prueba serológica estándar. Esta prueba se emplea para detectar anticuerpos antileptospira en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y servir de base para evaluar otros métodos serológicos (p. 29).

### 3.1.14 Diagnóstico diferencial

La OPS (2009) considera las siguientes enfermedades como diferenciales de leptospirosis: Influenza, dengue y fiebre hemorrágica del dengue, infección por Hantavirus, fiebre amarilla y otras fiebres hemorrágicas virales, rickettsiosis, borreliosis, brucelosis, malaria, pielonefritis, meningitis aséptica, intoxicación por sustancias químicas, intoxicación alimentaria, fiebre tifoidea y otras fiebres entéricas, hepatitis virales, fiebre de origen desconocido, toxoplasmosis y la faringitis.

### 3.1.15 Pruebas diagnósticas para Leptospirosis

Pérez, et. al (2015) en la revista cubana de medicina militar denotan los siguientes métodos diagnósticos descritos brevemente:

**Cultivo.** Las muestras para cultivo deben ser múltiples y tomadas según el estadio de la enfermedad; en la primera semana, de sangre y de LCR, y de la segunda semana en adelante, de orina. La *Leptospira* puede permanecer en la orina hasta 11 meses después de iniciada la enfermedad. Las muestras se deben inocular en medios de cultivo semisólidos, como el medio de Fletcher enriquecido con suero de conejo.

**Pruebas serológicas.** Las pruebas serológicas son aplicables en la segunda fase; los anticuerpos aparecen de los días 6 a 12 de la enfermedad y el título máximo se alcanza en la tercera o cuarta semana. Se usan 2 sistemas tradicionales:

**Aglutinación macroscópica:** Es un método fácil de realizar; utiliza una mezcla ("pool") de antígenos de serotipos diferentes. Como tiene poca sensibilidad y especificidad, se emplea usualmente como prueba filtro.

**Aglutinación microscópica (MAT).** Es la técnica de más uso y en general se acepta como método de referencia para demostrar anticuerpos contra *Leptospiras*. Es el estándar de oro para la serología en el diagnóstico de la enfermedad de la leptospirosis. Al aplicar esta técnica, MAT (prueba de microaglutinación de grupos) diluciones seriadas de los sueros se ponen en contacto con iguales volúmenes de un buen crecimiento de antígenos de *Leptospiras* vivas de diferentes serovariedades.

**Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima: (ELISA).** Los avances en las técnicas de laboratorio y en el campo de la inmunología han permitido desarrollar nuevos métodos de diagnóstico con mayor sensibilidad y especificidad como ELISA y DOT-ELISA, técnicas para demostrar anticuerpos IgM específicos contra *Leptospira*.

**Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Donde es posible la detección rápida de género y serovar específico de *Leptospiras* a partir de especímenes clínicos. Este método está siendo cada vez más utilizado en laboratorios de diagnóstico y permite una identificación precisa y rápida.

**Aglutinación en Látex:** Obregón A. (2011) reconoce en la revista cubana los principales sistemas serológicos de diagnóstico rápido utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba como:

Una técnica novedosa que se está implementado en la búsqueda del diagnóstico, es la de aglutinación en Látex para la detección de anticuerpos género específicos de *Leptospira*, es el método de laboratorio más rápido reportado internacionalmente, con amplio uso en la confirmación microbiológica de casos sospechosos de leptospirosis humana.

### **3.1.16 Profilaxis y Tratamiento**

García F. (2002) aporta:

El tratamiento más utilizado es la dihidroestreptomicina a dosis más altas. Otros antibióticos que pueden utilizarse son la amoxicilina, la oxitetraciclina y el ceftiofur. El principal efecto de los antibióticos que justifica sus usos en los programas de control es que eliminan el estado de portador renal y, por tanto, detienen la leptospiuria. Sin embargo, presentan inconvenientes como son las posibles pérdidas producidas por tener que respetar los periodos de supresión.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Diseño metodológico

El presente trabajo es un estudio de tipo experimental sobre la creación de una prueba de aglutinación de partículas de látex previamente sensibilizadas para la detección de anticuerpos anti-*Leptospira* en muestras de sueros bovinos, tomados en diferentes comunidades donde se han presentado casos positivos en humanos y algunos facilitados por la Universidad Nacional Autónoma de León.

Estas técnicas se fueron desarrollando basados en la literatura encontrada para desarrollar pruebas rápidas y las técnicas aplicadas para detección de *Leptospiras* en humanos, además de las teorías de microaglutinación a través de la sensibilización de partículas de látex. Para esto se realizaron numerosos ensayos de manera conjunta y en colaboración con un equipo de bioanalistas en los cuales se iban descartando o aprobando procedimientos hasta llegar a resultados satisfactorios.

En total se procesaron 64 muestras las cuales se seleccionaron tomando en cuenta criterios intrínsecos y extrínsecos como la condición corporal de los animales y el tipo de crianza de estos, además de factores de inclusión como la presencia de casos positivos en el área y factores de exclusión como la negación de los propietarios a dichos análisis o la ausencia de los bovinos por cuestiones de pastoreo.



Figura 1. Diseño de prueba rápida para detección de Leptospirosis.

Fuente: MINSa, Nicaragua 2015

#### 4.2 Universo y Ubicación del área de estudio

Los ensayos para la creación de la prueba rápida de aglutinación en látex para el diagnóstico de Leptospirosis bovina se llevaron a cabo en el Complejo Nacional de Salud Dra. Concepción Palacios, Laboratorio de referencia para *Leptospira*, en la división del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia MINSA, Nicaragua. Ubicado en Managua en el costado Oeste de la colonia primero de mayo.

La procedencia de los sueros varía entre los tomados en diferentes comunidades donde se han presentado casos positivos en humanos y algunos facilitados por la Universidad Nacional Autónoma de León.

#### 4.3 Población de estudio

Bovinos que pertenecen a los municipios o comarcas donde se han dado casos positivos a Leptospirosis.

En Nicaragua la especie bovina es el principal vector de la enfermedad hacia el humano, según un estudio de la Leptospirosis en animales domésticos y silvestres en los municipios de El sauce, Achuapa y rastro municipal de León, durante el periodo de agosto - noviembre 2006, realizado por diferentes instituciones y publicado en el boletín Epidemiológico de 2008 por el Ministerio de salud. (CNDR – MINSA; MAGFOR, UNAN León veterinaria, DANIDA-El sauce).

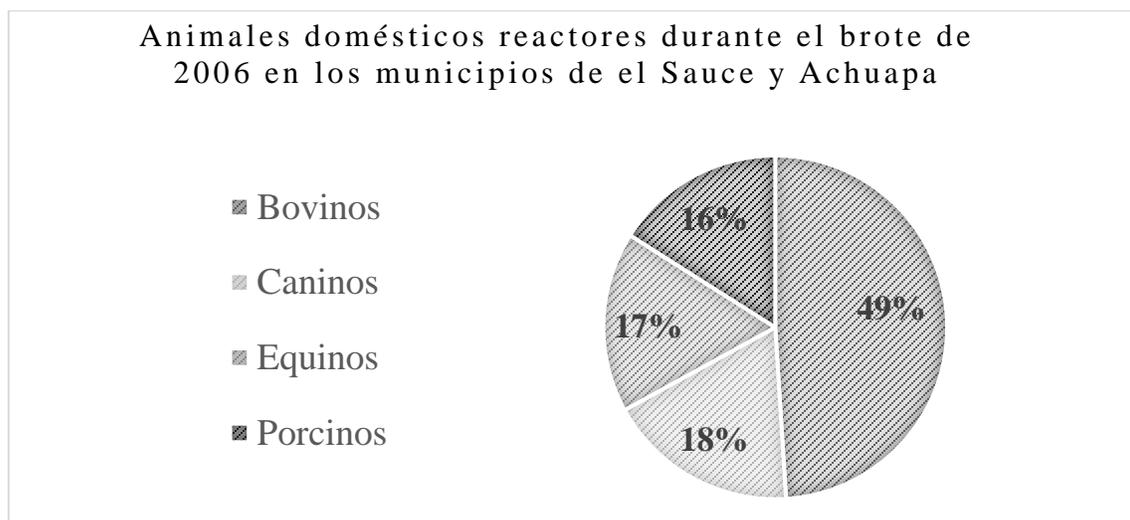


Figura 2. Estudio conjunto CNDR-MINSA, IPSA, Facultad de veterinaria UNAN-León.  
Fuente: MINSA, Nicaragua.2006

### 4.3.1 Criterios Intrínsecos

La mayoría de los bovinos en el estudio eran de raza criolla, y poseían una condición corporal de entre 2 y 3 lo que podría incrementar su susceptibilidad ante la enfermedad (Revista en línea Grass fed solution, 2020)

### 4.3.2 Criterios Extrínsecos

En las comunidades la crianza de estos animales de consumo es, en el mayor de los casos artesanal, tanto las condiciones infraestructurales como los registros sanitarios son deficientes o inexistentes. El pastoreo es al aire libre y las principales fuentes de agua son de ríos y en algunos casos estas son compartidas con las aguas de las actividades de la población.



Figura 3. Encharcamiento de caminos de acceso a las comunidades, 2006.  
Fuente: MINSa, Nicaragua



Figura 4. Ríos contaminados y aguas compartidas con las actividades agrícolas, 2006.  
Fuente: MINSa, Nicaragua



Figura 5. Crecida de los ríos  
Fuente: MINSA, Nicaragua 2004



Figura 6. Aguas contaminadas  
utilizadas para consumo y recreación.  
Fuente: MINSA, Nicaragua 2004

#### 4.3.3 Factores de inclusión

Bovinos mayores de un mes, de comunidades con casos positivos de Leptospirosis en humanos.

#### 4.3.4 Factores de exclusión

Bovinos que no estaban presentes en las fincas al momento de la toma de muestra y bovinos de productores que no dieron la autorización para que se les tomaran muestras en los animales.



Figura 7. Aguas anegadas entre factores que propician la  
propagación de la Leptospirosis.  
Fuente: MINSA, Nicaragua 2004

#### 4.4 Fase de campo

El material biológico se obtuvo de bovinos, como seguimiento y control de foco de lugares donde existen antecedentes de Leptospirosis humana, el cual consistió en extraer sangre venosa de la yugular, sin anticoagulante a través del método gota a gota, en tubos al vacío para extraer el suero sanguíneo.

Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Centro Nacional de Referencia (CNDR) para separar el suero del paquete globular.

#### 4.5 Fase de Laboratorio

Para realizar el presente estudio, se trabajó por etapas. Estandarizándose cada una de ellas, las cuales se describen detalladamente a continuación:

##### 4.5.1 Obtención del antígeno

Para la obtención del antígeno como en todo el desarrollo del estudio se llevaron a cabo múltiples y repetidos procesos para calcular y escoger los materiales, métodos, tiempos incluso equipos para garantizar el crecimiento de las cepas.

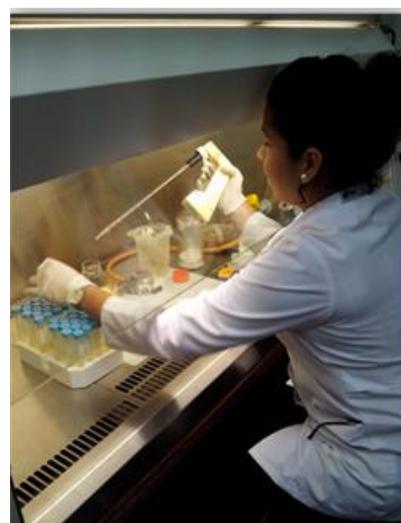


Figura 8. Control de cepas en el gabinete de flujo laminar.  
Fuente: Propia

Se utilizó la cepa de referencia *wijnberg* número 14, serovariedad *copenhageni*, grupo serológico *Icterohaemorrhagiae* de la especie de *Leptospira interrogans*, debidamente tipificada, la cual fue amablemente cedida por el Laboratorio de parasitología del CNDR/MINSA, para fines de nuestro trabajo.

Posterior a la observación en el microscopio de campo oscuro, de la cepa *wijnberg* donde se comprueba que su cultivo es óptimo mostrando su viabilidad, capacidad de crecimiento y que está exenta de contaminantes, se procedió a rotular un tubo y verter 20 ml de medio EMJH (medio para el cultivo de *Leptospiras*) y adicionar unas gotas con una pipeta Pasteur del cultivo de la cepa, dejándose en incubación durante 7 días a 30° C.

#### **4.5.2 Análisis de muestras**

Las muestras se tamizaron de forma simultánea por dos técnicas de diagnóstico para Leptospirosis (Microaglutinación en látex, ELISA IgM) y la confirmación de los casos positivos se realizó por Microaglutinación con antígenos vivos (MAT), que utiliza 30 cepas para identificar igual número de serovariedades de *Leptospiras*.

Cuadro 1. Cepas de referencia donadas por Holanda

	<b>Especie</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Serovar</b>	<b>Cepa</b>
1	<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i>	<i>Australis</i>	<i>Ballico</i>
2	<i>L. noguchii</i>	<i>Australis</i>	<i>Nicaragua</i>	<i>1011</i>
3	<i>L. interrogans</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>	<i>Akiyami A</i>
4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Ballum</i>	<i>Castellonis</i>	<i>Castellón 3</i>
5	<i>L. interrogans</i>	<i>Bataviae</i>	<i>Bataviae</i>	<i>Swart</i>
6	<i>L. interrogans</i>	<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	<i>Hond Utrecht IV</i>
7	<i>L. weilii</i>	<i>Celledoni</i>	<i>Celledoni</i>	<i>Celledoni</i>
8	<i>L. kirschneri</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>Cynopteri</i>	<i>3522 C</i>
9	<i>L. interrogans</i>	<i>Djasiman</i>	<i>Djasiman</i>	<i>Djasiman</i>
10	<i>L. kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Grippotyphosa</i>	<i>Moskva V</i>
11	<i>L. interrogans</i>	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>	<i>Hebdomadis</i>
12	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>RGa</i>
13	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Copenhageni</i>	<i>M20</i>
14	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Copenhageni</i>	<i>Wijnberg</i>
15	<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Icterohaemorrhagia</i>	<i>Kantorowic</i>
16	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Javanica</i>	<i>Javamca</i>	<i>Veldrat Batavia</i>
17	<i>L. noguchii</i>	<i>Louisiana</i>	<i>Louisiana</i>	<i>LSU 1945</i>
18	<i>L. weilii</i>	<i>Manhao</i>	<i>Qingshui</i>	<i>L 105</i>
19	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Mini</i>	<i>Mini</i>	<i>Sari</i>
20	<i>L. noguchii</i>	<i>Panamá</i>	<i>Panamá</i>	<i>CZ 214</i>
21	<i>L. interrogans</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>	<i>Pomona</i>
22	<i>L. interrogans</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Pyrogenes</i>	<i>Salinem</i>
23	<i>L. meyeri</i>	<i>Ranarum</i>	<i>Ranarum</i>	<i>ICF</i>
24	<i>L. weilii</i>	<i>Sarmin</i>	<i>Sarm 111</i>	<i>Sarmin</i>
25	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Sejroe</i>	<i>Sejroe</i>	<i>M84</i>
26	<i>L. interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	<i>Hardjo</i>	<i>Hardjoprajitno</i>
27	<i>L. interrogans</i>	<i>Sejroe</i>	<i>Wolffi</i>	<i>3705</i>
28	<i>L. biflexa</i>	<i>Semaranga</i>	<i>Patoc</i>	<i>Patoc 1</i>
29	<i>L. santarosai</i>	<i>Shermani</i>	<i>Shermani</i>	<i>1342 K</i>
30	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>Tarassovi</i>	<i>Perepelitsin</i>

Fuente: MINSA, 2017

### 4.5.3 Fundamento de las técnicas aplicadas

Alonso et al. (2005) Detalla las principales técnicas de detección de antígenos:

**Técnica ELISA.** Es un ensayo inmunoenzimático cuantitativo y cualitativo, para el diagnóstico *in vitro* de la Leptospirosis humana. Se basa en la detección de anticuerpos anti-*Leptospiras sp.* en sueros de pacientes, empleando como antígeno un extracto somático de bacterias de *Leptospiras* en fase exponencial, el cual es fijado sobre una base sólida de polipropileno (Microplacas en tiras de 8 pozos), el que se une a los anticuerpos presentes en sueros del paciente (Reacción Ag-Ac).

Esta reacción antígeno - anticuerpo es observada después de agregar un anticuerpo especie específico marcado con una enzima (Peroxidasa de rábano *albicans*) y después de agregar el sustrato específico, la intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero del paciente.

**Técnica de aglutinación en látex.** Se basa en la detección de antígenos bacterianos específicos, generalmente polisacáridos de superficie (capsula o capa externa de la pared) liberados por las bacterias durante su desarrollo, que persisten en los líquidos biológicos, aun cuando las bacterias no son detectables.

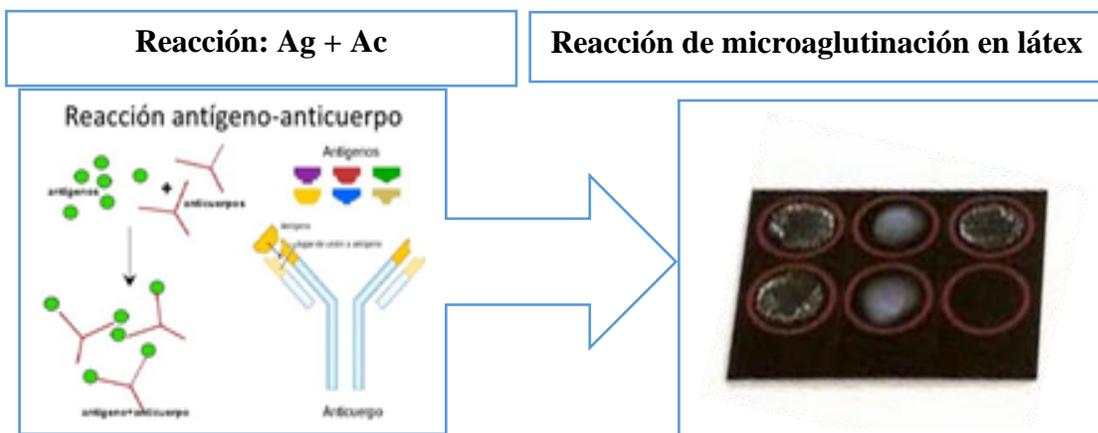


Figura 9. Fundamento de la reacción antígeno- anticuerpo aplicada a la técnica de aglutinación en látex.

Fuente: García et al (2019)

**Técnica de Micro Aglutinación con Antígenos Vivos (MAT):** En el MAT, diluciones seriadas de los sueros son puestas en contacto con antígenos de *Leptospiras* vivas de diferentes serovariedades. Los resultados se obtienen colocando pequeñas gotas de la mezcla en un portaobjetos y leyendo la aglutinación en un microscopio de campo oscuro.

Los resultados de la MAT se pueden realizar de forma cuantitativa y cualitativa. En la presente



Figura 10. Calibración de los tubos según su peso.

Fuente: Propia. 2014



Figura 11. Centrifugación

Fuente: Propia, 2014

investigación únicamente se tomaron de forma cualitativa debido a varios factores, como que los sueros donados por la unan- león no poseían los ml necesarios para dicho análisis y que tienen un mayor costo de material y cantidad de cepas vivas.

Cuadro 2. Interpretación de porcentaje de aglutinación

<b>Simbología</b>	<b>Aglutinación</b>
(negativa)	Proporcion de bacterias libres entre 50 y 100%
(positiva)	Proporcion de bacterias libres es menos del 50%

Fuente: (OMS 2003)

Céspedes (2013) refiere:

Para tener éxito en el cultivo de este microorganismo, se requieren condiciones especiales para su realización, como sembrar la muestra en el menor tiempo posible después de su obtención. En el caso de remitir las muestras para que se cultiven en otro laboratorio debe hacerse a temperatura ambiente pues las bajas temperaturas son deletéreas para las especies patógenas. Es necesario tener en cuenta estas condiciones si se desea tener éxito en el aislamiento de la bacteria.

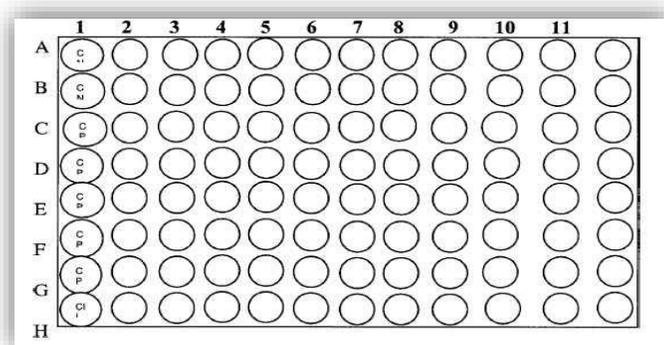


Figura 12. Esquema para Microplaca MAT. La hilera inicial del al 12 corresponde a los antígenos (cepas vivas de leptospiras) y las marcadas de la B-H a los controles  
Fuente: DocSlide, 2018

### Preparación de soluciones

#### PBS

Cuadro 3. Componentes del PBS

Químicos	1 X	10 X	20 X
NaCl	8 gr	160 gr	320 gr
KCl	0.20 gr	4 gr	8 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.91 gr	28.8 gr	57.60 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12 gr	4.8 gr	9.60 gr

Fuente: propia



Figura 13. Preparación de PBS  
Fuente: Propia

### Metodología PBS:

Todo se agrega a temperatura ambiente en un Beakers de 1,000 ml de agua destilada y se deja en Vortex para su mezcla durante 1 hora. Se rotula y se mide el PH (Sciquest org. 2003).

### Solución STOP de PMSF 100Mm

Reactivo: PMSF ( $C_7H_7FO_2S$ ), PM= 174,2 SIGMA No 7626, Isopropanol anidro - SIGMA No 705,7

### Materiales y Reactivos:

Balanza analítica

Papel para pesar

Pipeta graduada de 10ml

Beaker de 50ml

Ependorf de 4.5 ml

### Metodología STOP:

1. Pesar 0.174g de PMSF y disolver en 10ml de Alcohol isopropílico anidro, para obtener una solución stop de 100mM (100 veces Concentrado).
2. Almacenar la solución a 4 °C o en freezer a -20°C.
3. La solución es estable por 9 meses.

Observación: Esta solución no es estable cuando es disuelta en agua.

### Buffer de Glicina

#### Cuadro 4. Componentes del buffer de Glicina

Químicos	Cantidades
Glycine	20,25 gr
NaOH	6.75 gr
NaCl	9 gr



Figura 14. Preparación de soluciones y reactivos  
Fuente: Propia, 2014

Fuente: Propia

Metodología Glicina:

Todo se agrega a temperatura ambiente en un Beackers de 1,000 ml de agua destilada y se deja en Vortex para su mezcla durante 1 hora. Se rotula y se mide el PH.

Cuadro 5. Componentes del buffer Coating (PH 9.6)

Químicos	Cantidades
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20,25 gr
NaHCO <sub>3</sub>	6.75 gr

Fuente: Propia

Metodología Coating:

Todo se agrega a temperatura ambiente en un Beackers de 1,000 ml de agua destilada y se deja en vortex para su mezcla durante 1 hora. Se rotula y se mide el PH.

#### BSA (Albumina Sérica Bovina)

Pesar 100 gramos de BSA y transferir a un balón de 2 litros. Lentamente verter 500 ml de agua destilada estéril, la BSA subirá a flote y estará a flote de 1 a 2 horas con mezclador magnético. Cuando la BSA este disuelta agregar las siguientes cantidades en este orden.

Cuadro 6. Componentes de BSA

Químicos	Cantidades
Tiamina	10 ml
CaCl <sub>2</sub>	10 ml
MgCl <sub>2</sub>	10 ml
ZnSO <sub>4</sub>	10 ml
MnSO <sub>4</sub>	1 ml
FeSO <sub>4</sub>	100 ml
Vitamina B12	10 ml
Tween 80	90 ml
Tween 40	35ml



Figura 15. Albumina Sérica bovina  
Fuente: Propia, 2014

Metodología BSA: Mezclar por al menos 1 hora hasta que esté totalmente disuelto. Ajustar el pH a 7.4 usando NaOH al 10% y afórelo a 1 litro con agua. Pasar por filtro de 0.22 $\mu$ m.

#### 4.6 Selección de las muestras para el método de aglutinación en Látex

Se seleccionan para la prueba las muestras que hayan sido referidas con sospechas específicas de Leptospirosis o aquellas que, según los criterios clínicos-epidemiológicos definidos en el Protocolo Nacional de Vigilancia para Leptospirosis, podrían provenir de pacientes afectados por esta enfermedad. Bovinos que pertenezcan a los municipios o comarcas donde se presentaron casos positivos a Leptospirosis en personas.

Para ello, se deben revisar las boletas que acompañan las muestras y anotar los detalles requeridos en el cuaderno de trabajo para *Leptospiras* (número muestra, código del bovino, edad, establecimiento de referencia, días de evolución).

Las muestras no deben presentar contaminación o hemólisis.

#### 4.7 Recolección de datos

Inicialmente se utilizó tabla de campo en la que se van realizando todos los apuntes y como instrumento de recolección de la información primordial utilizado en el estudio, todos los datos fueron introducidos a una base de datos en el programa Microsoft-Word y EXCEL para mejor manejo de los datos obtenidos.

#### 4.8 Variables a evaluar

Las variables a evaluar son sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo que serán derivadas de la tabla de contingencia de 2x2 y de los programas para epidemiología epi R.

Cuadro 7. Valores para prueba de referencia

<b>Prueba en estudio</b>	<b>Enfermos</b>	<b>Sanos</b>	<b>Total</b>
Positivo	(a) número de enfermos positivos	(b) número de individuos sanos positivos	(a + b)total de positivos
Negativos	(c) número de individuos enfermos negativos	(d) número de individuos sanos y negativos	(c + d) total de negativos
Total	(a + c) total de individuos enfermos	(b + d) total de individuos sanos	(n) número de personas en Estudio

Fuente: Stevenson (2017).

#### 4.8.1 Sensibilidad

$$\frac{a}{a + c} \times 100$$

Proporción de individuos con la enfermedad según la prueba de oro e identificados como positivos por la prueba en estudio.

#### 4.8.2 Especificidad

$$\frac{d}{d + b} \times 100$$

Proporción de individuos sanos según la prueba de oro e identificados como negativos por la prueba en estudio.

#### 4.8.3 Valor Predictivo Positivo

Valor predictivo de una prueba positiva

$$\frac{a}{a + b} \times 100$$

Proporción de individuos con una prueba positiva que realmente tienen la enfermedad (medida por la prueba de oro)

#### 4.8.4 Valor Predictivo Negativo

Valor predictivo de una prueba negativa

$$\frac{d}{c + d} \times 100$$

Proporción de individuos con una prueba negativa que realmente no tienen la enfermedad (medida por la prueba de oro)

#### 4.8.5 Índice de kappa

El índice de Kappa es un test de concordancia que se basa en la comparación de índices de concordancia esperados (pe) con los índices de concordancia observados (po)

Se calcula de la siguiente manera:

$$k = \frac{po - pe}{1 - pe} \text{ donde } po = \frac{a + d}{n}$$

\* Concordancia en el caso de Positivos (P)

$$P = \left\{ \frac{(a + b)}{n} \times \frac{(a + c)}{n} \right\} \times n$$

\* Concordancia en caso de Negativos (N)

$$N = \{(c + d) - (a + c) - P\}$$

\* Concordancia en el caso (Pe)

$$Pe = \frac{P + N}{n}$$

\* Índice de Kappa (K)

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - pe}$$

El Índice de concordancia Kappa (K) de Fleiss puede clasificarse en 5 grupos distintos. (Torrez, 2009).

<u>Concordancia</u>	<u>Kappa</u>
1. deficiente	<0,20
2. Regular	0,21-0,40
3. Moderada	0,41-0,60
4. Buena	0,61-0,80
5. Muy Buena	0,81-1,0

#### 4.9 Análisis de datos

Todos análisis fueron realizados con el software estadístico R. (R. core team, 2017), de estadística avanzada para epidemiología, fueron utilizados los paquetes irr para Kappa y kappa ponderado (Gamer, M, 2012).

También fueron utilizados cuadros de protocolo, cálculos de desviación estándar, el programa epi R (Stevenson, 2017) para las variables de sensibilidad y especificidad.

#### 4.10 Materiales y Equipos

Materiales de laboratorio:

Reactivo de látex: suspensión de partículas de látex-poliestireno (Látex beads, Polystyrene 10%, lote MKBJ6718 SIGMA) sensibilizadas con proteínas antigénicas de cepas nacionales y de referencia de *leptospiras* patógenas.

Cuadro 8. Lista de materiales y equipos para muestreo

<b>Materiales para Muestreo</b>	<b>Equipos para Muestreo</b>
Tabla de campo	Gradillas
Libreta para apunte de datos	Cuerdas para Sujeción
Hojas blancas para registros	Descarte para agujas
Marcador indeleble	Termo descartable
Lapiceros	Refrigerantes
Pisetas para esterilizar (Alcohol, PBS, Agua destilada)	Centrifuga
Tubos al vacío de 8.5 ml	
Gabachas descartables, Agujas vacutainer	
Jeringas estériles de 3 y de 5 ml	
Material descartable (Algodón, Alcohol, Guantes de Látex, Bolsas plásticas negras, Masking tape, Jabón, Papel absorbente.	

Fuente: propia

Cuadro 9. Lista de materiales para laboratorio

---

**Materiales de laboratorio**

---

Tubos vacutainer 13x100 mm

Laminas para aglutinación

Pipeta automática multi canal Fisher brand de 50-300  $\mu$ l y de 400- 2000  $\mu$ l

Puntas para pipetas de 5-200  $\mu$ l,

Pipeta automática Human de 0.5-10  $\mu$ l, 5- 50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l

Porta y cubre objetos 25.4 x 76.2 mm SLIDES

Placas polysorp Fondo plano y fondo en U de 96 pocillos

Mechero, Espátula pequeña

Viales de 1.5 ml

Medios de cultivo EMJH

Tubos vacutainer 16x100 mm

Soluciones: PBS, BSA, Agua destilada

Láminas portaobjeto corning 75x50 mm

Probetas de 50 a 2000 ml

---

Fuente: Propia

Cuadro 10. Lista de equipos para laboratorio

---

**Equipo de laboratorio**

---

Gabinete de flujo laminar BECTON DICKINSON

Microscopio de campo oscuro olympus BX 40

Balanza digital Denver Instrument company TL-204

Incubadora Fisher Scientific model 307

Lector de ELISA EL X 800 uv (BIO-TEK INSTRUMENTS INC)

Agitador vortex Heidolph REAX 2000

Medidor de pH Corning 430

Refrigerador SAMSUG Cool Tech Plus

Gradilla metálica para 72 tubos de 13 mm

---

Fuente: Propia

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Procedimiento de prueba rápida de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de Leptospirosis bovina

Con base en los ensayos realizados con diferentes antígenos, materiales etc. Se concretó como resultado el uso de:

Reactivo látex: Látex beads, Polystyrene, 10% lote MKBJ6718.

Antígeno Ag 02-A determinado con la lectura a través del método de Lowry en 481.8 µg. seleccionado para las pruebas.

Lectura Cuadro 11. Resultados de antígenos en cromatografía

Antígeno	Albumina 280 nm	Muestras y curva de Resultados (µg) 660nm	
Ag 11(M1)	0.1802	0.1677	434.4
Ag02 -A	0.2212	0.1646	481.8
Ag02 -B	0.2102	0.4222	789.7
Ag01 -14	0.5096	0.4872	1244.70
Ag02 -14	0.1136	0.1208	292.70
Ag03 -14	0.4511	0.4426	1116.0
Ag04 -14	0.8032	0.8442	2057.10

Y el código del conjugado anti-bovino Antibovine IgG (whole molecule)- peroxidase, antibody produced in rabbit 096k 4854. dando como resultado final el diseño de la prueba que se puede realizar en campo.

1. Con una pipeta colocar 25 µl de reactivo látex en cada círculo
2. Colocar cerca de la gota de reactivo de látex del primer círculo 10 µl de control positivo
3. Colocar cerca de la gota de reactivo de látex del segundo círculo 10 µl de control negativo
4. En los siguientes círculos colocar con la pipeta 10 µl de cada muestra que se vaya a procesar, siempre en un extremo de cada círculo y cerca de la gota de reactivo de látex
5. Mezclar cada par de gotas balanceando con movimientos muy suaves y circulares, hasta obtener una mezcla uniforme en toda la superficie del círculo

6. Iniciar inmediatamente el conteo con un cronometro mientras se continúa balanceando la placa
7. Los resultados son observados a simple vista, bajo una lámpara dentro del primer minuto de reacción
8. La interpretación de los resultados se considerará como:  
 No reactor a las muestras que se mantengan homogéneas dentro del primer minuto de reacción  
 Reactor a las muestras que presenten aglutinación dentro del primer minuto de reacción

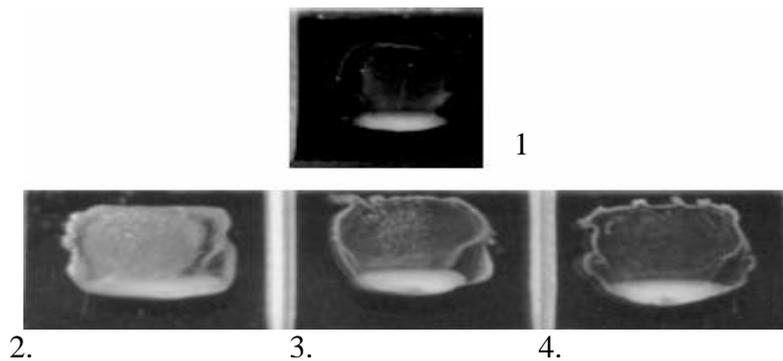


Figura 16. Diferentes grados de aglutinación positiva.1. Negativo.  
 Fuente: Propia

5.2 Efectividad de la prueba rápida a través de los parámetros tradicionales de sensibilidad y especificidad.

La eficacia de dicha prueba radica en su capacidad de identificar casos positivos de leptospirosis lo cual es demostrado con sus niveles de concordancia ante la prueba estándar internacional y un ELISA de realización interna.

Para esta prueba los resultados son satisfactorios ya que se encuentra dentro de los valores de aceptación. Según los programas para epidemiología epi R.

Cuadro 12. Resultado de las variables a evaluar para la prueba de látex y los parámetros aceptables para los programas de estadística epidemiológica utilizados.

<b>Variables</b>	<b>Rango látex</b>	<b>Parámetros aceptables</b>
Sensibilidad	0.90	(0.76, 0.97)
Especificidad	0.85	(0.62, 0.97)
Valor predictivo Positivo	0.92	(0.79, 0.98)
Valor predictivo Negativo	0.81	(0.58, 0.95)

El valor de concordancia para la prueba de aglutinación en látex confrontado con la prueba de referencia MAT fue de 0.74 lo cual la ubica en el nivel número 4 con valores de 0,61-0,80 por lo que se le considera una técnica BUENA según la tabla de valores determinados por Fleiss, en 1985 (Torres, 2009)

De las 64 muestras procesadas se obtuvo un valor de concordancia con el índice de Kappa y kappa ponderado de 0.74 para la técnica de aglutinación en látex con la MAT, dándonos una prevalencia de 67%, sensibilidad de 90%, especificidad de 85%, valor predictivo positivo 92% y valor predictivo negativo de 81%.

Como resultado para la prueba de ELISA frente a la MAT Obteniéndose un valor de concordancia con el índice de Kappa y kappa ponderado de 0.41 (Moderada), una prevalencia del 66%; una sensibilidad del 68% y una especificidad del 76%, un valor predictivo positivo de 85% y un valor predictivo negativo del 55%.

Tomando la técnica MAT como estándar de oro los resultados fueron de 42 muestras reactoras, 22 muestras no reactoras.

Cuadro 13. Resultados de las 3 pruebas

<b>RESULTADOS</b>	<b>MAT</b>	<b>LATEX</b>	<b>ELISA</b>
POSITIVOS	42	40	36
NEGATIVOS	22	24	28

### 5.3 Funcionalidad de la prueba rápida

El método de diagnóstico de aglutinación en látex demostró ser, rápido y simple considerando las dificultades que conllevan las pruebas MAT y ELISA, esta técnica se presenta como una opción entre pruebas rápidas la cual puede usarse de modo rutinario con condiciones mínimas de bioseguridad, se conserva por largo tiempo, es una técnica útil para el diagnóstico con poca preparación y entrenamiento que podría tener alta disponibilidad.

El procedimiento de realización directa del kit de la prueba de Aglutinación en Látex para detección de leptospirosis no requiere de equipos especiales y los resultados se obtienen en 60 segundos. Los ingredientes son altamente estables y pueden ser almacenados en condiciones mínimas de bioseguridad facilitando su uso en condiciones de campo lo cual se comprobó durante 15 meses en los que se llevó a cabo la investigación.

González et al (2018) afirman que:

Los métodos de aglutinación en látex han sido usados ampliamente en inmunología con distintos fines, basados en que son técnicas rápidas, fiables, tienen un precio asequible, son fácilmente realizables en cualquier tipo de laboratorio de microbiología clínica y se pueden aplicar prácticamente en cualquier tipo de muestra; se han evaluado contra otros métodos, estándares de oro, como las pruebas inmunoenzimáticas, con excelentes resultados.

Hay que tener en cuenta que las técnicas estándares de oro son caras, muchas de ellas con tiempos de ejecución prolongados y no están disponibles en todos los centros de asistencia ya que por su especificidad se requiere de un panel de serovariedades como antígenos diagnósticos que cubran el espectro de las serovariedades que causan la enfermedad en una zona determinada.

Esto implica el mantenimiento y manipulación de cultivos vivos, con los posibles problemas de contaminación, riesgo de infección, mezcla de cultivos e inevitable variación en la calidad del antígeno vivo. Esto dificulta la estandarización que se relaciona con una pobre reproducibilidad en la prueba, subjetividad en la lectura y en la interpretación de los resultados.

Cumpliendo con lo propuesto en los objetivos de esta investigación, el protocolo establecido para la prueba de diagnóstico de aglutinación en látex demostró ser, rápido y simple considerando las dificultades que conllevan las pruebas MAT y ELISA, esta técnica se presenta como una opción entre pruebas rápidas la cual puede usarse de modo rutinario con condiciones mínimas de bioseguridad, se conserva por largo tiempo, es una técnica útil para el diagnóstico con poca preparación y entrenamiento que podría tener alta disponibilidad.

El procedimiento de la prueba de Aglutinación en Látex para detección de leptospirosis no requiere de equipos especiales y los resultados se obtienen en 60 segundos. Los ingredientes son altamente estables y pueden ser almacenados en condiciones mínimas de bioseguridad facilitando su uso en condiciones de campo lo cual se comprobó durante 15 meses en los que se llevó a cabo la investigación.

Tomando en cuenta que son muy pocos los sistemas de diagnóstico por aglutinación en látex nuestra investigación presenta resultados comparables con estudios realizados por el ministerio de salud de cuba que evaluó durante 2 años 5 tipos de conjugados, 4 de fabricación propia y el único kit comercial circulante, donde expone Obregón (2004) que obtuvieron como resultado que:

En los sistemas evaluados, “la mejor combinación de sensibilidad y especificidad se observó con el conjugado látex-Pool (93,8% y 90,4%, respectivamente)”. Y en nuestro estudio los valores obtenidos fueron de una sensibilidad de 90% y especificidad de 85%.

La mejor combinación de valores predictivos positivos y negativos se observó con “el conjugado látex-Sejroe (90,9% y 95,8%, respectivamente)” (Obregón ,2004), y nuestro valor predictivo positivo 92% y valor predictivo negativo de 81%. Además de mostrar una adecuada estabilidad y reproducibilidad de los conjugados estudiados.

## VI. CONCLUSIONES

Se creó un protocolo para la realización de una prueba rápida de aglutinación en látex para la detección de anticuerpos antileptospira en la especie bovina basados en las técnicas de aglutinación antígeno – anticuerpo, el procedimiento se estructuró en 6 etapas: 1. Preparación del antígeno, 2. Lectura a través del método de Lowry, 3. Sensibilización de las perlas de látex, 4. Acoplamiento de las partículas de látex al antígeno, 5. Procedimiento para la prueba rápida de aglutinación con partículas de látex para el diagnóstico de Leptospirosis bovina, 6. Interpretación de los resultados

Se demostró la eficacia de la prueba la cual radica en su capacidad de identificar casos positivos de leptospirosis lo cual es demostrado con sus niveles de concordancia ante MAT y ELISA.

El valor de concordancia para la prueba de aglutinación en látex confrontado con la prueba de referencia MAT fue de 0.74 lo cual la ubica en el nivel número 4 con valores de 0,61-0,80 por lo que se le considera una técnica BUENA según la tabla de valores determinados por Fleiss, 1985. Dándonos una sensibilidad de 90%, especificidad de 85%, valor predictivo positivo 92% y valor predictivo negativo de 81%.

La técnica de aglutinación en látex probada frente a Elisa y MAT demostró su funcionalidad ante la sospecha de leptospirosis bovina al ser, rápida, simple, poseer concordancia en sus resultados lo que la convierte en una prueba relevante que podría constituir un diagnóstico presuntivo a la brevedad para su posterior confirmación con las pruebas de referencia, además de proveer la posibilidad de una terapéutica inmediata, considerando las dificultades, metodológicas y preparación que conllevan dichas técnicas de referencia por lo que se consideraría conveniente implementar su uso en el diagnóstico para leptospirosis bovina.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Continuar con las investigaciones para determinar diferentes medidas con las que se podría facilitar el acceso a pruebas de laboratorio en poblaciones donde existe la enfermedad y se presenta de manera recurrente.

Desarrollar este kit de manera comercial ayudaría de manera general al desarrollo de la ganadería en nuestro país con su disponibilidad a nivel local.

Incrementar el aislamiento de cepas circulantes que afecten al ganado bovino, al detectar cuadros agudos de la enfermedad.

Detectar casos que pueden significar un brote epidémico. enfocando la enfermedad como una zoonosis de alta incidencia en nuestro país.

Iniciar estudios de pruebas rápidas para detección de leptospirosis para otras especies de interés en clínicas veterinarias

Realizar ensayos para validar la utilidad de la aglutinación en látex en la detección de leptospirosis canina.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Alonso Carles, Rosa Bartolomé, José Domínguez, Lurdes Matas, Nuria Rabella (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf> [archivo pdf]
- Asociación de médicos de sanidad exterior AMSE (2016) Inf. Epidemiológica; Leptospirosis Epidemiología y Situación mundial <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/167-leptospirosis-epidemiologia-y-situacion-mundial#:~:text=El%20reservorio%20de%20la%20enfermedad,y%20los%20perros%20para%20L>
- Campos Chacón, Natalia. (2014). Leptospirosis. Medicina Legal de Costa Rica, 31 (2), 112-118. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152014000200012&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200012&lng=en&tlng=es).
- Castro Marco (2016) *Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis* Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 54 (5), pp. 620-625. Universidad Autónoma de Yucatán, México. [Antonio.torres@correo.uady.mx](mailto:Antonio.torres@correo.uady.mx) <https://www.redalyc.org/journal/4577/457746956011/html/>
- Céspedes Manuel (2013) *Evaluación de la protección Inmunológica a partir de los Extractos antigénicos de Leptospira*. Laboratorio Nacional de zoonosis bacteriana, dirección ejecutiva de enfermedades transmisibles Centro Nacional de Salud Pública URL: [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/zop/zona\\_evento\\_01/presetaci%c3%b3n%20leptospira.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/zop/zona_evento_01/presetaci%c3%b3n%20leptospira.pdf)
- Gamer Matthias (2012) *Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement*. (software) R package versión 0.84. <https://CRAN.R-project.org/package=irr>
- García F. J. (2002) Tratamiento y control de la leptospirosis bovina. *Revista Dialnet plus*. Bovis, ISSN 1130-4804, N°. 106 p 77-95 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4368846>
- García Arias, María Teresa. Paula Carpintero Fernández, Mercedes María Acha Diaz, Ana Isabel Quiñones Valdés (2019) Técnica de inmunología, según el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). *Revista médica Ocronos* <https://revistamedica.com/tecnica-de-inmunologia-servicio-de-anatomia-patologica/>

- González-Losada, Cristóbal, Victoria-García, Maylin, & Dorta-Contreras, Alberto Juan. (2018). *Método de aglutinación en látex para el diagnóstico rápido del síndrome de Guillain-Barré*. *Vaccimonitor*, 27(2), 67-75. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2018000200005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2018000200005&lng=es&tlng=es).
- Grass fed solution (2020) *Pruitt and Momont, Cattle 87-9, "Effects of Body Condition On Reproductive Performance of Range Beef Cows"* y de Virginia Cooperative Extension, 400-795, *Body Condition Scoring Beef Cows*. <https://www.grass-fed-solutions.com/Condicion-Corporal-Bovino.html#gallery>
- McDonough, P. (2001). *Leptospirosis en caninos- estado actual*. Publisher: International veterinary information service (www.ivis.org), Ithaca, New York USA. [archivo pdf] Documento No. A0112.0701.ES [www.ivis.org/advances/infect\\_dis\\_carmichael/mcdonough\\_es/ivis.pdf](http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/mcdonough_es/ivis.pdf)
- Ministerio de salud de Perú (2000) monografía *Leptospirosis* <https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/146/CNSP0016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Norma Técnica Nicaragüense (2005) 25 001 – 05 Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense de Prevención y Control de Leptospirosis Humana. *LA GACETA* (Diario oficial) 27 feb. 2005. <http://legislacion.asamblea.gob.ni/normaweb.nsf>
- Obregón fuentes AM, (2004) Fernández C, Rodríguez I, Balbis Y, Martínez B, Rodríguez J. *Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la leptospirosis en Cuba*. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16(4): 259–65. <https://scielosp.org/article/rpsp/2004.v16n4/259-265/es/>
- Obregón Fuentes AM, (2011) Fernández Molina C, Martínez Motas I, Llop Hernández A, Rodríguez González I, Rodríguez Silveira J, et al. *Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba*. *Rev cubana Med Trop* 63 (3) Ciudad de la Habana sep.-dic. 2011 63-239-45. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S03757602011000300007&lng=e](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03757602011000300007&lng=e)
- Organización Mundial de sanidad animal OIE, (2010). *Manual de recolección conservación y envío de muestras al laboratorio para diagnóstico de enfermedades comunes de los animales* [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Self-declarations/Archives/Anexo\\_4.\\_Manual\\_de\\_toma\\_y\\_remision\\_de\\_muestras](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Self-declarations/Archives/Anexo_4._Manual_de_toma_y_remision_de_muestras). [archivo pdf] pág. 29

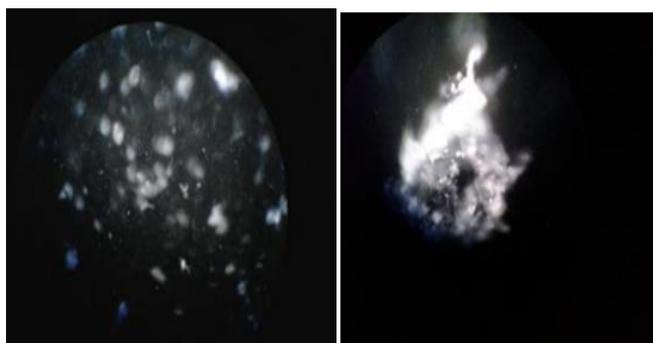
- Organizacion Mundial de la Salud OMS (2003). *Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*. ISSN 0101-6970 International Leptospirosis Society NLM classification: WC 420. Malta: World Health Organization: 109. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42667> <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-Spa.pdf> [archivo pdf]
- Organización panamericana de la salud. OPS (2009). *Eliminación de las enfermedades desatendidas y otras infecciones relacionadas con la pobreza*. CD49 R19 p. Foro nacional de leptospirosis en Nicaragua 2012 <https://www.paho.org/es/temas/leptospirosis>
- Organización panamericana de la salud. OPS (2012) *Foro nacional de Leptospirosis Nicaragua* [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=list&slug=presentaciones-foro-nacional-leptospirosis-nicaragua-4719&Itemid=270&lang=es#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=list&slug=presentaciones-foro-nacional-leptospirosis-nicaragua-4719&Itemid=270&lang=es#gsc.tab=0)
- Pardo, CE. (2001). *Compendio de epidemiología*. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Medicina Veterinaria p. 61 <http://repositorio.una.edu.ni/2439/1/nl73p226.pdf>
- Pérez Elias, Yendrys, Obregón Fuentes, Ana Margarita, Rodríguez Reyes, Isabel del Carmen, & Alfonso González, Martha Julia. (2015). Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44(4) [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572015000400006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572015000400006&lng=es&tlng=es)
- R Core Team (2017). *R: A Language and environment for statistical computing. (software)* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <https://www.R-project.org/>.
- Sánchez PA. (2014). *Estudio Serológico de Leptospirosis Bovina en la Comarca Lagunera*, (DAW Veterinaria del Norte/Novalitton, SA de CV), Rivera OF. (Asociación de MVZ Esp. en Bovinos de la Comarca Lagunera) (Proyecto de Leptospiras, CENID Microbiología INIFAP). México. 22/12/2014. <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/leptospirosis-bovina-t29244.htm>
- Stevenson Mark. (2017). *epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data*. R package version 0.9-87. <https://CRAN.R-project.org/package=epiR>
- Torres Gordillo, Juan Jesús, & Perera Rodríguez, Víctor Hugo (2009). *Cálculo de la fiabilidad y concordancia entre codificadores de un sistema de categorías para el estudio del foro online en e-learning*. *Revista de Investigación Educativa*, 27(1) 89-103. ISSN: 0212-4068. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=283322804006>
- Zunino M, Enna, & Pizarro P, Rolando. (2007). Leptospirosis: Puesta al día. *Revista chilena de infectología*, 24(3), 220-226. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182007000300008>

## **IX. ANEXOS**

### Anexo 1. Morfología de las Leptospiras

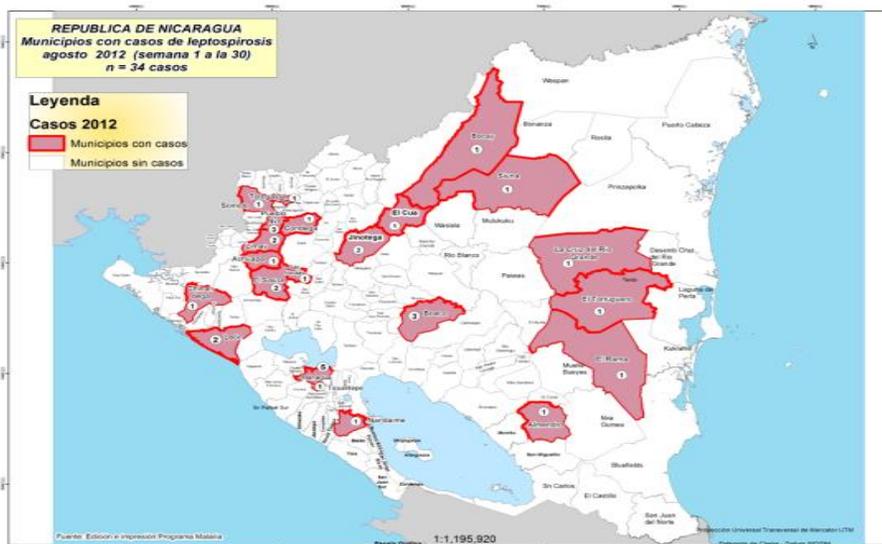


### Anexo 2. Microaglutinación de leptospiras



### Anexo 3. Mapa de transmisión de la leptospirosis en el territorio

Municipios con casos positivos en el año 2012



Fuente: MINSa, Nicaragua

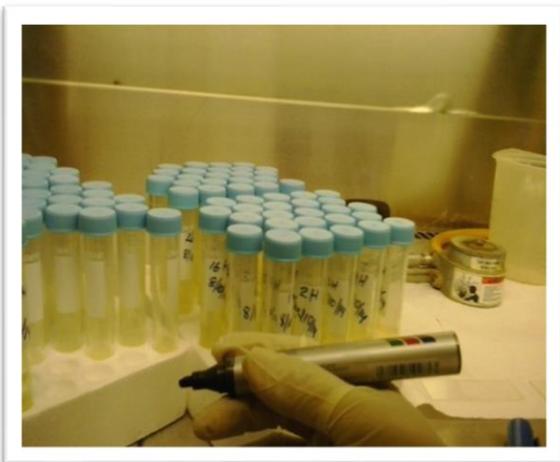
#### Anexo 4. Rotulación de soluciones



#### Anexo 5. Lavado de placas



#### Anexo 6. Rotulación de cultivos de nuevas cepas



Anexo 7. Procesamiento de muestras bovinas



Anexo 8. Lavado de látex



Anexo 9. Muestras en microplaca para ELISA



Anexo 10. Cepas manejadas en Gabinete de flujo laminar



Anexo 11. Preparación de soluciones y reactivos



Anexo 12. Baño María



Anexo 13. Vortex



Anexo 14. Micro-pipetas multicanal



Anexo 15. Micro pipetas



Anexo 16. Centrifuga



Anexo 17. Cuarto frío



Anexo 18. Lector de ELISA



Anexo 19. Rotulación de reactivos



Anexo 20. Microscopio de campo oscuro



Anexo 21. Medidor de PH (Corning)



Anexo 22. Balanza Electrónica



Anexo 23. Cristalería para soluciones



A



## Anexo 25. Glosario

**Aglutinación:** Es la interacción entre un anticuerpo y una partícula antigénica que se visualiza por la formación de agregados o grumos macroscópicos. En este proceso, el anticuerpo es conocido como aglutinina y el antígeno como el aglutinógeno.

**Albumina:** Proteína animal y vegetal, rica en azufre y soluble en agua, que constituye el componente principal de la clara del huevo y se encuentra también en el plasma sanguíneo y linfático, en la leche y en las semillas de ciertas plantas

**Brote:** Término referido al inicio de una manifestación de enfermedad.

**BSA:** La albúmina de suero bovino o ASB, es una proteína extraída del suero bovino que es ampliamente usada en muchos procedimientos de bioquímica: Western blot, ELISA. También es usado como nutriente en cultivos celulares.

**Buffer:** Solución que mantiene un valor constante y conocido de PH a una temperatura dada.

**CNDR:** Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

**CSF:** fluido cerebro espinal

**Endemia:** Enfermedad que reina habitualmente, o en épocas fijas, en un país o comarca.

**Endémico:** Es relativo a endemia, pero que es propio o exclusivo de determinadas localidades o regiones.

**Enfermedad:** Cualquier proceso o alteración más o menos grave que afecte la salud.

**ELISA:** Es la prueba cualitativa ó cuantitativa para determinar presencia de anticuerpos contra *Leptospira*, para definir caso probable.

**Glicina:** La glicina (Gly, G) es uno de los aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos. Es el aminoácido más pequeño y el único no quiral de los 20 aminoácidos presentes en la célula. La glicina es un aminoácido no esencial.

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

**LPS:** Lipopolisacáridos

**MAT:** Es la prueba de referencia internacional cuantitativa para la titulación de anticuerpos séricos contra los diferentes serovares de *Leptospira* y cualitativa para corroborar la presencia de las mismas o no, en la que se utilizan microorganismos vivos como antígeno, haciendo

diluciones del suero problema, tomando como positiva la dilución más alta en la que el suero aglutina.

Microaglutinación: Es la reacción que se da entre el antígeno y el anticuerpo que ha desarrollado cualquier animal, esta reacción solo puede ser observada a través de un microscopio de campo oscuro.

PBS: "phosphate buffer solution", que en español se traduce como "tampón fosfato salino". Es una solución amortiguadora del pH, se utiliza para efectuar operaciones de lavado en pruebas de ELISA.

pH: Medida de la concentración del ión hidrogeno, índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución, puede estar entre 0 – 7 disolución ácida y de 7 – 14 disolución básica.

Prevalencia: Término utilizado en epidemiología para determinar el número de personas que sufren una enfermedad con respecto a la población en estudio.

Serovar o serotipo: Grupo de microorganismos clasificados juntos sobre la base de su estructura antigénica, en el caso de la *Leptospira* los lipopolisacáridos (LPS), son los principales antígenos utilizados para su clasificación. Es la unidad básica que nos permite conocer y explicar la relación entre agente etiológico – Hospedador.

Serogrupo: Grupo de serovares con antígenos comunes.

Seroprevalencia: Prevalencia encontrada en sueros.

Thymerosal: Compuesto órgano mercuríco. Agente antiséptico y antifúngico muy utilizado como preservante de vacunas.

Tween: Es un detergente llamado polisorbato 20, reacciona como surfactante en la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases. Se añade a la solución PBS para usos varios.

Validación: Proceso netamente experimental, efectuado mediante estudios de laboratorio, que permite evaluar o determinar la conveniencia o capacidad de un esquema analítico particular, cuyas características de diseño cumplen con los requerimientos metodológicos y de resultados que involucra el desarrollo de un protocolo, que incluye la estimación de las medidas de precisión y exactitud aplicables a cualquier método analítico, esté o no normalizado.

Zoonosis: Enfermedad o infección que se da en los animales y que es transmisible al hombre en condiciones naturales.