



## Artículo original

# Estudio transversal de leptospirosis y muerte fetal en Yucatán, México

A cross sectional study of leptospirosis and fetal death in Yucatan, Mexico

María Fidelia Cárdenas-Marrufo<sup>1</sup>, Ignacio Vado-Solis<sup>1</sup>, Carlos Pérez-Osorio<sup>1</sup>, Gaspar Peniche-Lara<sup>1</sup>, José Segura-Correa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias II. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán, Merida, Yucatan, México

<sup>2</sup> Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Autónoma de Yucatán. Merida, Yucatan, México.

Cárdenas-Marrufo MF, Vado-Solis I, Pérez-Osorio C, Peniche-Lara G, Segura-Correa J. A cross sectional study of leptospirosis and fetal death in Yucatan, Mexico. *Colomb Med (Cali)*. 2016; 47(1): 11-14.

© 2016 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acreditan.

### Historia:

Recibido: 26 mayo 2015  
Revisado: 13 enero 2016  
Aceptado: 04 febrero 2016

### Palabras clave:

Leptospirosis, aborto espontáneo, *Leptospira*

### Keywords:

Leptospirosis, abortion spontaneous, *Leptospira*

### Resumen

**Introducción:** Leptospirosis es una enfermedad zoonótica que afecta principalmente la población humana de bajos recursos. Infección aguda por leptospirosis durante el embarazo se ha asociado con aborto espontáneo y muerte fetal durante el primer trimestre del embarazo.

**Objetivo:** Estimar la frecuencia de infección por *Leptospira interrogans* en mujeres con aborto espontáneo en el estado de Yucatán, México.

**Métodos:** Se efectuó un estudio trasversal en 81 mujeres con aborto espontáneo. La prueba de referencia para Leptospirosis, prueba de microaglutinación, se utilizó para estimar la frecuencia de la serovar infectante. El ELISA IgM indirecto se utilizó para detectar infección reciente por *L. interrogans*. Se extrajo ADN a partir de tejido embebido en parafina de placenta para la detección de *L. interrogans* por PCR.

**Resultados:** La frecuencia global de la infección con *L. interrogans* en 81 mujeres con aborto, fue del 13.6%. Se encontró cinco de 12 serovares de *Leptospira*. Dos de las 11 mujeres con aborto espontáneo y positivo a microaglutinación también fueron positivas a la prueba ELISA IgM. Ninguna muestra fue positiva hacia el diagnóstico PCR de *Leptospira*.

**Conclusión:** Dos mujeres podrían estar asociados con el aborto espontáneo debido a la leptospirosis, porque mostraron anticuerpos contra *L. interrogans* en la microaglutinación y ensayos de ELISA IgM. Diferencias entre regiones fueron encontradas con respecto a las prevalencias de leptospirosis.

### Abstract

**Introduction:** Leptospirosis is a zoonotic disease affecting mainly to low income human population. Acute leptospiral infection during pregnancy has been associated with spontaneous abortion and fetal death during the first trimester and the abortion may occur as consequence of systemic failure.

**Objective:** To estimate the frequency of *Leptospira interrogans* infection in women with spontaneous abortion in the state of Yucatan, Mexico.

**Methods:** A cross sectional study on women with spontaneous abortion was conducted. Serum samples were tested for Leptospirosis by the microagglutination test, to estimate the frequency of the infecting serovar. The indirect ELISA IgM was used to detect recent infection by *L. interrogans*. DNA was extracted from paraffin-embedded tissue of placenta for PCR detection of *L. interrogans*.

**Results:** Overall frequency of infection with *L. interrogans* in the 81 women with abortion was 13.6%. Five of the 12 serovars evaluated were found and included. Two of the 11 women with abortion and positive to microagglutination test were also positive to the ELISA IgM test. None samples were positive for PCR *Leptospira* diagnosis.

**Conclusion:** two women could be associated with spontaneous abortion due to leptospirosis, because they showed antibodies against *L. interrogans* in the microagglutination test and ELISA IgM assays. Differences between regions were found with respect to the prevalences of leptospirosis.

### Autor de correspondencia:

María Fidelia Cárdenas Marrufo. Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias II. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán, México. Avenida Itzáes, No 498 entre 59 y 59-A. Centro. Mérida, Yucatán, México. Phone +52 9999 240554 ext 1162. Email: cmarrufo@correo.uady.mx

## Introducción

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, que afecta principalmente a personas de bajos ingresos. La infección es causada por la espiroqueta *Leptospira interrogans* que comprende más de 200 variantes serológicas incluidas en 23 grupos. Su incidencia está asociada con factores sociales, ocupacionales y climáticos, con una distribución mundial y considerada de problema público debido a que puede causar la muerte en los humanos. Las presentaciones clínicas no específicas de la enfermedad y la dificultad para su diagnóstico por laboratorio causan una subestimación del número de casos. En humanos, la tasa de incidencia en algunas regiones puede ser tan alta como 975 casos por cada 100,000 habitantes<sup>1</sup>.

El aborto espontáneo es una de las complicaciones más comunes que ocurren durante el primer trimestre del embarazo, y 1:4 mujeres experimentan un aborto durante su etapa reproductiva<sup>2</sup>. La pérdida temprana del embarazo está definida como el final del embarazo antes de las 20 semanas de gestación o pérdida de peso fetal por debajo de los 500 g. Las principales causas del aborto son genéticas, inmunológicas, anomalías anatómicas, defectos hematológicos o endócrinos así como factores ambientales como infecciones causadas por diversos patógenos<sup>3</sup>. La infección por leptospirosis aguda durante el embarazo ha sido asociada con aborto espontáneo y muerte fetal durante el primer trimestre y el aborto puede ocurrir como consecuencia de una falla sistémica<sup>4-6</sup>. Sin embargo, todavía no se sabe si el aborto y la muerte fetal ocurren como un efecto directo o indirecto de la infección.

La leptospirosis en México fue reportada por primera vez en el estado de Yucatán en 1920<sup>7</sup>, y desde entonces, diferentes estudios en humanos y animales reservorios confirman su condición endémica en Yucatán donde se ha reportado un 14.2% de prevalencia<sup>8-9</sup>. Sin embargo, la presencia de *L. interrogans* en mujeres con aborto espontáneo no se ha demostrado. La detección de leptospirosis en mujeres embarazadas y fetos, podría ayudar al diagnóstico diferencial de aborto, y generar información acerca de la prevención de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de infección por *Leptospira interrogans* en mujeres con aborto espontáneo en dos hospitales del estado de Yucatán, México.

## Materiales y Métodos

Se realizó un estudio transversal en mujeres con aborto espontáneo, el cual se llevó a cabo en el Hospital Comunitario de la ciudad de Ticul (enero-junio 2008) y el Hospital Materno Infantil en la ciudad de Mérida, Yucatán (febrero-junio 2009), ambos localizados en el estado de Yucatán, México. El protocolo fue aprobado para su realización por parte del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán.

### Métodos de muestreo

Las muestras de sueros fueron obtenidas de un estudio previo en toxoplasmosis realizado en un hospital con una alta frecuencia de abortos reportados (120 mujeres entre 7 millones y 600 embarazos en el 2007)<sup>10</sup>. Solo 81 muestras de 100 mujeres con un aborto espontáneo examinadas de junio a mayo de 2009 fueron incluidas

en el estudio. Cuarenta y cinco muestras (suero y tejido placentario) correspondieron al Hospital Comunitario de Ticul y 36 al Hospital Materno Infantil de Mérida. Los sueros fueron almacenados a -70° C en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán. En adición, 40 muestras de placenta embebidos en parafina procedentes de ambos hospitales fueron analizados.

### Prueba de Microaglutinación (MAT)

La prueba de referencia para Leptospirosis, microaglutinación (MAT), fue utilizada para estimar la frecuencia de serovares infectados. La microaglutinación fue realizada de acuerdo al procedimiento recomendado por la WHO<sup>11</sup> y Haake *et al.*<sup>12</sup>. Doce de los serovares conocidos prevalentes en Yucatán fueron utilizados como antígenos en la MAT. Estos fueron Pomona, Canicola, Hardjo, Tarassovi, Panama, Icterohemorragiae, Grippityphosa, Pyrogenes, Bratislava, Australis, Wolfi y Autumnalis<sup>8,9</sup>. La microaglutinación fue observada con ayuda de un microscopio Leica DM1000 con un condensador de campo oscuro. Un título  $\geq 100$  fue utilizado como punto de corte para determinar la positividad. Todos los títulos por arriba de este valor fueron considerados como evidencia de exposición. Cuando se observó una reacción cruzada en una muestra, el serovar con el título más alto fue considerado como el infeccioso.

### Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (ELISA IgM)

Este ensayo se utilizó para detectar una infección reciente por *L. interrogans*. Una placa de poliestireno fondo plano (F8 Maxisorp Nunc-INMUNO MODULE), fue preparada absorbiendo un pool de 12 serovares de *L. interrogans* sonificados (10 mg/mL diluido en solución buffer de carbonato pH 9.6). Una solución de BSA al 2% fue utilizada como agente bloqueador así como una solución PBS-Tween 20 como solución de lavado. El anticuerpo secundario fue anti- $\mu$ -cadena peroxidasa específica conjugada (SIGMA), y OPD fue utilizado como desarrollador. 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se utilizó para detener la reacción. La DO se midió en un Benchmark plus microplate reader (Bio-Rad, Hercules CA) a 490 nm. El punto de corte utilizado fue el promedio de las muestras negativas más dos desviaciones estándar.

### Extracción de ADN y detección por PCR de *Leptospira interrogans*

El ADN se extrajo de tejidos embebidos en parafina de placenta. En breve, un corte de 10  $\mu$ m fue colocado en un tubo de 1.5 mL a los cuales se les adicionaron 500  $\mu$ L de xileno y se procedió a incubar durante 30 min a temperatura ambiente para remover la parafina. Al término, el xileno fue enjuagado con etanol al 100% y al 75% respectivamente durante 30 min cada uno. El último lavado se hizo con PBS. Después de este último lavado se añadieron 200  $\mu$ L de buffer de lisis (proteínasa K: 20 mg/mL, Tris-HCl solución 1M: 10  $\mu$ L, EDTA 0.5 M: 2  $\mu$ L, SDS al 10%: 100  $\mu$ L y agua destilada grado molecular: 838 mL) y se dejó incubar toda la noche a 52° C, hasta que todo el tejido estuvo disuelto completamente. Al término de la incubación, el tubo se mezcló en un vortex y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente. El líquido sobrenadante fue transferido después con una micropipeta a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y el pellet fue resuspendido en 50  $\mu$ L de agua destilada.

Para detectar *L. interrogans*, una PCR semi anidada fue adaptada del procedimiento realizado por Murgia *et al.*<sup>13</sup>, amplificando un

fragmento RNA del gen de 16S. Los oligonucleótidos iniciadores fueron: Lepat 1, 5'-GAG TCT GGG ATA ACT TT-3'; Lepat 2, 5'-AGA AAT TTG TGC TAA TAC CGA ATG T-3' y L4, 5'-GAT TTT TCG GGT AAA GAT-3'. Para la amplificación se preparó una mezcla de reactivos de PCR (HotMasterMix, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) al cual se le añadieron los iniciadores a una concentración de 0.5 mM al tubo de reacción y 100 ng/ $\mu$ L de muestra de ADN. Las condiciones de corrida fueron: 1 ciclo inicial a 94° C x 5 min, 40 ciclos de 94° C x 1 min, 47° C x 1.5 min, 72° C x 2 min; 1 ciclo de 72° C x 7 min y enfriado a 4° C hasta detener el protocolo. Los productos obtenidos en este procedimiento fueron observados, posterior a una electroforesis en gel de agarosa, en un fotodocumentador de luz ultravioleta (Bio-Rad, Hercules CA).

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva y la asociación del Hospital de procedencia con infección por *Leptospira* fue determinada por la prueba de chi-cuadrado utilizando el programa estadístico SPSS®.

### Control interno de DNA

Se utilizó como control interno Beta-actina para determinar que la muestra de DNA estuviera amplificando un fragmento de 290 pb por PCR a partir del exon III del gen; usando los cebadores hacia adelante 5'-ACC CAC ACTGTG CCC ATC TA-3' y reverso: 5'-CGG AAC CGC TCATTG CC-3' y siguiendo el mismo protocolo usado para la detección de *L. interrogans*, usando como temperatura de fusión de 60° C.

## Resultados

El rango de edad de las mujeres con aborto espontáneo fue de 14 a 42 años con una media y desviación estándar de 24.7 $\pm$ 7.6 años. Las frecuencias de mujer por edad, paridad y edad al momento del aborto se presentan en la Tabla 1. La mayoría de las mujeres abortaron a las 5-13 semanas de gestación.

La frecuencia global de infección por *L. interrogans* en las 81 mujeres con aborto, utilizando la técnica de MAT, fue de 13.6%. Diez (12.3%) de las mujeres infectadas fueron procedentes del Hospital Comunitario de Ticul (n= 45) y una (1.3%) en el Hospital Materno Infantil de Mérida (n= 36). No se identificó co-infección con toxoplasmosis en las muestras positivas a *L. interrogans*.

Cinco de 12 serovares evaluados fueron encontrados incluyendo Hardjo, Gryppotyphosa, Borincana, Bratislava y Cynopteri. Los

**Tabla 1.** Frecuencia de mujeres por edad, paridad y edad al momento del aborto.

Factor	Frecuencia	%
Edad (años)		
14-19	22	27.2
20-34	50	61.7
$\geq$ 35	9	11.1
Paridad		
Primigestantes	40	49.3
Multigestantes	40	49.3
Edad al abortar (semanas)		
$\leq$ 4	8	9.9
5-8	27	33.4
9-13	30	37.0
14-17	9	11.0
18-20	5	6.2

serovares con alto número de casos positivos y altos títulos fueron Hardjo y Gryppotyphosa, ambos con títulos de 1:400 Tabla 2.

Ninguna de las 45 muestras de placenta evaluadas por PCR utilizando los oligonucleótidos Lepat1 y Lepat2 fueron positivas en las muestras del Hospital Comunitario de Ticul. Para evaluar si el extracto de ADN de las muestras se encontraba en buen estado, las muestras fueron re-analizadas por PCR mediante oligonucleótidos universales que amplifican un fragmento de 290 pares de bases del exón III del gen beta-actina. Primer 1: 5'-ACC CAC ACTGTG CCC ATC TA-3' y Primer 2: 5'-CGG AAC CGC TCATTG CC-3'. La preparación de la mezcla de PCR fue la misma utilizada para el protocolo de detección de *Leptospira interrogans* utilizando 60°C como temperatura de alineamiento.

## Discusión

De las 81 mujeres con aborto, el grupo de mujeres de 20 a 34 años fue el más frecuente probablemente porque es la edad más común para embarazarse en Yucatán (Tabla 1).

La mayoría de los abortos ocurrieron en la primera etapa de embarazo (antes de las 12 semanas de embarazo), un valor similar a lo reportado en la guía para el diagnóstico y tratamiento de aborto espontáneo por la Secretaría de Salud de México 14 y Chile 15.

La positividad a MAT en mujeres con aborto espontáneo obtuvo un porcentaje similar (13.6%) a los valores encontrados en poblaciones abiertas mixtas (14.1, 14.0, 14.2) por Vado *et al.* 8, también en Yucatán. El serovar más frecuente encontrado en el estudio, fue Hardjo (asociado a ganado vacuno), seguido de Gryppotyphosa (asociado con animales silvestres y cerdos), los cuales han sido reportada su presencia en humanos y animales domésticos de Yucatán en estudios previos<sup>8,9</sup>. En Australia, Faine y Adler<sup>4</sup> reportó un caso mortal de infección intrauterina por *Leptospira hardjo*, identificada en placenta y tejido fetal de 30 semanas. En nuestro estudio, dos mujeres fueron positivas a ELISA IgM y MAT, una reaccionando al serovar Hardjo y otra el serovar Gryppotyphosa, en ambos casos con títulos de anticuerpos de 1:400 que sugieren que estas dos mujeres cursaban una infección reciente o aguda por *Leptospira*. Sin embargo, debido a que no se encontraron leptospirosis en tejido placentario, no se puede asociar directamente con la principal causa de aborto. La WHO<sup>11</sup> reportó que la leptospirosis durante el embarazo puede llevar al aborto, muerte fetal o leptospirosis congénita, dependiendo del período de embarazo, pero solo unos pocos casos han sido reportados.

Una alta frecuencia de casos positivos de leptospirosis se encontraron en el Hospital Comunitario de Ticul comparado con el Hospital Materno Infantil localizado en un área urbana. Estos

**Tabla 2.** Positividad por serogrupo, serovar y títulos de anticuerpos contra *L. interrogans* en mujeres con aborto espontáneo en el estudio.

Serogrupo	Serovar	Título anticuerpos		
		Positivos	%	1:100 1:200 1:400
sejroe	Hardjo	5	45.5	2 2 1
grippotyphosa	gryppotyphosa	2	18.2	1 1 1
hebdomadis	borincana	2	18.2	2
australis	bratislava	1	9.1	1
cynopteri	cynopteri	1	9.1	1
Porcentaje			63.6	18.2 18.2

resultados concuerdan con los reportados por otros autores<sup>8,16</sup>, quienes observaron que las áreas rurales son un alto riesgo de adquirir leptospirosis. Estos probablemente este asociado a una alta prevalencia de leptospirosis en animales (vacas, cerdos y perros) y el contacto de la gente con ellos, en el sur de Yucatán, donde el Hospital Comunitario de Ticul está localizado. Sin embargo, no se obtuvo información del paciente acerca de una exposición directa con animales. Gaïnder *et al.*<sup>17</sup>, reportaron un caso de leptospirosis en una mujer nulípara de 20 años de edad (26 semanas de embarazo) altamente expuesta a animales de granja y ratas, como Dadhwal *et al.*<sup>18</sup>, reportaron un caso de leptospirosis en una mujer de 36 semanas de embarazo. Baytur *et al.*<sup>19</sup>, por otra parte, reportaron un caso en una nulípara de 26 semana de embarazo expuesta a ovejas.

## Conclusión

La espiroqueta *Leptospira interrogans* es de cuidado para las mujeres embarazadas como se evidencia en este estudio en el cual, dos mujeres presentaron anticuerpos contra *L. interrogans* en las pruebas de MAT y ELISA IgM. Diferencias entre las regiones fueron encontradas con respecto a las prevalencias de leptospirosis y demostramos la necesidad de programas educativos en áreas rurales para prevenir la transmisión de la enfermedad. El diagnóstico diferencial de leptospirosis en mujeres con aborto puede contribuir a mejorar los programas de prevención contra dicha enfermedad incluyendo educación en infecciones zoonóticas como leptospirosis a médicos en hospitales rurales.

## Conflicto de intereses:

Authors declare no conflict of interest in the preparation and presentation of this article

## Referencias

1. WHO. Leptospirosis: an emerging public health problem. *Wkly Epidemiol Rec.* 2011; 86(6): 45–50.
2. Regan L. A prospective study of spontaneous abortion. In: Beard RW and Sharp F (eds). *Early Pregnancy Loss: Mechanisms and Treatment.* New York: Springer-Verlag, 1988: 23–7.
3. Petrozza JC, Scott RS. Recurrent early pregnancy loss. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/260495-overview>.
4. Faine S, Adler B, Christopher W, Valentine R. Fatal congenital human leptospirosis. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1984; 257: 548.
5. Shaked Y, Shpilber O, Samra D, Samra Y. Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: Casa report and review. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 241–3.
6. Carles G, Montoya E, Joly F, Peneau C. Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1995; 24(4): 418–1.
7. Noguchi H, Klieger J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Mérida, Yucatan. *J Exp Med.* 1920; 32(5): 627–32.
8. Vado-Solís I, Cárdenas-Marrufo MF, Jiménez-Delgadillo B, Alzina-López A, Laviada-Molina H, Suárez-Solís V, *et al.* Clinical epidemiological study of Leptospirosis in human and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002; 44(6): 335–40.
9. Cárdenas-Marrufo MF, Vado-Solís I, Pérez-Osorio CE, Segura-Correa J. Seropositivity to leptospirosis in domestic reservoirs and detection of *Leptospira* spp. from water sources, in farms of Yucatan, Mexico. *Trop Subtrop Agroecosyst.* 2011; 14(1): 185–9.
10. Vado-Solís IA, Suárez-Solís V, Jiménez-Delgadillo B, Zavala-Velázquez JE, Segura-Correa JC. *Toxoplasma gondii* presence in women with spontaneous abortion in Yucatan, Mexico. *J Parasitol.* 2013; 99(2): 383–5.
11. WHO . Human Leptospirosis. Geneva, Switzerland: WHO; 2003.
12. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. In: Adler B (ed). *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015: 665–98.
13. Murgia R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; 148: 27–34.
14. Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y Tratamiento del Aborto Espontaneo y manejo inicial del Aborto Recurrente. México: CENETEC; 2009.
15. Cassasco G, Di-Pietrantonio E. Aborto Guía de Atención. *Rev Hosp Mat Inf Ramón Sarda.* 2008; 27(1): 33–41.
16. Donaires LF, Céspedes MS, Sihuíncha MF, Pachas PE. Determinantes ambientales y sociales para la reemergencia de la leptospirosis en la región amazónica del Perú, 2012. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2012; 29(2): 280–4.
17. Gaïnder S, Singla R, Dhaliwal L, Suri V Leptospirosis as a cause of intrauterine fetal demise: short report of rare presentation. *Arch Gynecol Obstet.* 2010; 281(6): 1061–3.
18. Dadhwal V, Bahadur A, Deka D. Leptospirosis as a cause of fever in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007; 99(3): 252–3.
19. Baytur YB, Cabuk M and Kandiloglu AR Weil's syndrome in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 119: 132–3.