

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA



**DENGUE, LEPTOSPIROSIS, HANTAVIROSIS Y
RICKETTSIOSIS EN PACIENTES CON
SÍNDROME FEBRIL AGUDO NO PALÚDICO EN EL
META, COLOMBIA(2013-2014)**

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

Lic. LILIANA SÁNCHEZ LERMA

LA HABANA, 2017

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA**

DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGIA

**DENGUE, LEPTOSPIROSIS, HANTAVIROSI Y
RICKETTSIOSIS EN PACIENTES CON
SÍNDROME FEBRIL AGUDO NO PALÚDICO EN EL
META, COLOMBIA (2013-2014)**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Liliana Sánchez Lerma, MC
Tutor: Lic. Islay Rodríguez González, Dr. C
Lic. Salim Mattar Velilla, Dr. C
Asesora: Dra. María Eugenia Toledo Romani, Dr. C**

La Habana, 2017

*"No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento...."*

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios y a la vida por que me han dado el tiempo para lograr mis objetivos.

Agradezco especialmente a mis tutores los doctores **Islay Rodríguez** y **Salim Mattar** por compartir su experiencia conmigo, por el tiempo dedicado y por TODO.

A la doctora **María Eugenia Toledo** por sus recomendaciones.

A **Verónica, Norma** y **Vaneza** por su colaboración en el laboratorio y estar tan dispuestas siempre.

A la **Universidad Cooperativa de Colombia** por tener las puertas abiertas.

A mis estudiantes de la Facultad de Medicina: **Derly, Carlos, Daniel, Mauricio** y **Andrés** por ayudarme en la recolección de muestras y las arandelas que esto llevaba.

A la doctora **Nereyda** por su interés en este trabajo y en mi bienestar.

A la Licenciada **Maribel Chao** porque aunque dice que es su trabajo lo hace con mucha paciencia, gracias por tanta diligencia.

A los miembros del tribunal del examen de mínimo y predefensa, a las doctoras **Alina Llop, Isabel Martínez** y a las oponentes doctoras **Maria Teresa Illnait** y **Lisette Perez** por sus muy acertadas recomendaciones para mejorar el trabajo.

A la doctora **Ana Margarita Obregón**, por su ayuda, por su disposición, por sus aportes.

A mis padres **José** y **Aura** y mis hermanas **Alix** y **Adriana** por estar siempre presentes.

A **Anita** por su hospitalidad y por adoptarme.

A mi esposo **Nadel**, por cada uno de sus detalles.

A todas las personas del **IPK** que con su saludo y sonrisa hicieron mis estadias mucho más agradables en el Instituto y en la bella Isla.

Gracias

Liliana

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARAV:	Virus Araraquara
ARN:	Ácido ribonucleico
CDC:	Centro para la prevención y el control de enfermedades
dNTP:	Desoxirribonucleotidos trifosfato
DENV:	Virus Dengue
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Por sus siglas en Inglés)
EMJH:	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
FHSR:	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
GFM:	Grupo de las fiebres manchadas
HDV:	Hospital Departamental de Villavicencio
IC:	Intervalo de confianza
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
IgM:	Inmunoglobulina M
IgG:	Inmunoglobulina G
IIBT:	Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico
INS:	Instituto Nacional de Salud
IPK:	Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
MACV:	Virus Maciel
MAT:	Microaglutinación
NS:	Proteína no estructural

OIE:	Organización Mundial de Salud Animal
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds ratio
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (Por sus siglas en inglés)
PrM:	Proteína M
PCR-RT:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (por sus siglas en inglés)
RT- PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (Por sus siglas en inglés)
SFB:	Suero fetal bovino
SIVIGILA:	Sistema de vigilancia de salud pública del Instituto Nacional de Salud
SFA:	Síndrome febril agudo
SHF:	Síndrome hemofagocítico
SPH:	Síndrome pulmonar por Hantavirus
VSN:	Virus Sin Nombre
ZCIT:	Zona de confluencia intertropical

SINTESIS

En el departamento del Meta se desconoce la presencia de etiologías diferentes a dengue como causas del síndrome febril agudo (SFA) no palúdico. Con el objetivo de determinar la seroprevalencia de dengue, leptospirosis, hantaviriosis y rickettsiosis en pacientes de esta región colombiana, se realizó un estudio de corte transversal en el periodo entre mayo de 2013 a junio de 2014. A 100 pacientes con SFA se les tomó muestras pareadas de suero, a las que se les aplicó ELISA (IgM e IgG) para detección de anticuerpos contra dengue y hantavirus; inmunofluorescencia indirecta para rickettsiosis y microaglutinación para leptospirosis. Además, se capturaron garrapatas para la detección de ADN de *Rickettsia* sp. Este estudio demostró que en el Meta circulan *Rickettsia* (1%) y *Hantavirus* (3%), agentes que aún no son de notificación obligatoria en el país. De igual forma, se muestra el subregistro de leptospirosis (29%) y se corrobora la importancia del virus Dengue (44%) como principal agente etiológico de los SFA en esta zona del país. Se evidencia por primera vez en el Meta la presencia de *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi*. Este es el primer estudio que se realiza en la región y los resultados obtenidos permiten generar una alerta epidemiológica.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1	Introducción	1
1.2	Pregunta problema	5
1.3	Objetivos	5
1.4	Novedad científica	6
1.5	Valor teórico	6
1.6	Valor práctico	7

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1	Antecedentes y concepto de vigilancia sindrómica	8
2.2	Agentes etiológicos causantes de síndrome febril agudo	9
2.2.1	Definición de caso del síndrome febril agudo	9
2.2.2	Dengue	9
2.2.2.1	Etiología	10
2.2.2.2	Manifestaciones clínicas y patogenia	11
2.2.2.2.1	Fiebre del Dengue	11
2.2.2.2.2	Dengue grave	11
2.2.2.2.3	Síndrome del Choque por Dengue	12
2.2.2.3	Diagnóstico	12
2.2.2.3.1	Aislamiento viral	12
2.2.2.3.2	Inoculación Intracerebral	13
2.2.2.3.3	Cultivos en células de mamífero	13
2.2.2.3.4	Inoculación intratorácica en mosquitos adultos	13

2.2.2.3.5 Cultivos en células de mosquito	14
2.2.2.3.6 Diagnóstico serológico	14
2.2.2.3.7 Diagnóstico molecular	15
2.2.2.3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa- transcripción reversa	15
2.2.2.3.7.2 Hibridación de ácidos nucleicos	16
2.2.2.4 Situación en Colombia	16
2.2.3 Leptospirosis	19
2.2.3.1 Etiología	19
2.2.3.2 Reservorios y Transmisión	20
2.2.3.3 Manifestaciones clínicas	21
2.2.3.4 Diagnóstico	21
2.2.3.5 Situación en Colombia	23
2.2.4 Hantaviriosis	24
2.2.4.1 Etiología	25
2.2.4.2 Transmisión	25
2.2.4.3 Manifestaciones clínicas	26
2.2.4.3.1 Fiebre hemorrágica con síndrome renal	26
2.2.4.3.2 Síndrome pulmonar por hantavirus	27
2.2.4.4 Diagnóstico	28
2.2.4.5 Tratamiento	29
2.2.4.7 Situación en Colombia	29
2.2.5 Rickettsiosis	30
2.2.5.1 Etiología	31
2.2.5.2 Grupo de las fiebres manchadas	32
2.2.5.3 Rickettsiosis transmitidas por Garrapatas	32
2.2.5.4 Manifestaciones clínicas y patogenia	33
2.2.5.5 Situación en Colombia	34

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Diseño general	38
3.2	Aspectos demográficos y ecológicos del sitio de estudio	38
3.3	Universo de trabajo y Muestras	39
3.3.1	Selección de los pacientes objeto de estudio	40
3.4	Técnicas de laboratorio	41
3.4.1	Métodos para la detección de anticuerpos contra virus Dengue	41
3.4.1.1	Definición de caso para Dengue	41
3.4.2	Métodos para la detección de anticuerpos contra <i>Leptospira</i> sp.	41
3.4.2.1	Definición de caso para leptospirosis	42
3.4.3	Métodos para la detección de anticuerpos contra hantavirus	43
3.4.3.1	Definición de caso para Hantavirus	43
3.4.4	Métodos para la detección de anticuerpos contra <i>Rickettsia</i>	43
3.4.4.1	Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del Grupo de las Fiebres manchadas	43
3.4.4.1.1	Definición de caso para Rickettsiosis	44
3.5	Asociación de las variables clínicas y epidemiológicas con las etiologías de estudio	44
3.6	Muestreo de garrapatas en animales y en vegetación	45
3.6.1	Preparación de las garrapatas para la extracción de ADN de <i>Rickettsia</i>	46
3.6.1.1	Detección molecular de <i>Rickettsia</i> sp.	47
3.6.1.2	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para detección del gen <i>gltA</i> de <i>Rickettsia</i> sp.	47
3.6.1.3	Reacción en cadena de la polimerasa convencional para detección de los genes <i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>ompA</i> de <i>Rickettsia</i> sp.	48
3.6.1.4	Visualización de los productos amplificados	49
3.6.1.5	Secuenciación de los productos amplificados	49

3.7	Análisis estadístico	49
3.8	Aspectos éticos	52
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	Características sociodemográficas	54
4.2	Detección serológica de Dengue y leptospirosis	55
4.3	Detección de anticuerpos contra Hantavirus y Rickettsia	60
4.4	Asociación de las variables clínicas y epidemiológicas con las etiologías de estudio	69
4.5	Presencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en garrapatas	73
4.5.1	Detección molecular de rickettsias por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	74
4.5.2	Detección de los genes <i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>ompA</i> por reacción en cadena de la polimerasa convencional	75
4.5.2.1	Amplificación del gen <i>gltA</i> con los iniciadores CS78 y CS323	75
4.5.2.2	Amplificación del gen <i>ompB</i> con los iniciadores 120.2278 y 120.3599	76
4.5.2.3	Amplificación del gen <i>ompA</i> con los iniciadores Rr190.70 y 190.701	77
4.5.3	Identificación de especies de Rickettsias en garrapatas recolectadas	77
4.5.4	Consideraciones generales	82
CONCLUSIONES		86
RECOMENDACIONES		87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		89
ANEXOS		106

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El aumento de las enfermedades transmitidas por vectores y de sus reservorios en el mundo, se debe al incremento no planificado de la población humana y a la expansión de los suburbios en el desordenado hábitat causado por parte del hombre, en su búsqueda de adaptar el medio a sus necesidades. Esto ha generado un ecosistema ideal para que muchos animales silvestres se desplacen hacia estas zonas, con su consecuente adaptación y creación de ciclos zoonóticos, los cuales rompen el frágil equilibrio, lo que facilita que los animales domésticos hagan parte de él y generen nuevos ciclos que contribuyen a la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas (Monsalve *et al.*, 2009).

Las rickettsiosis, leptospirosis, hantaviriosis y el dengue, entre otras, constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución mundial. Los artrópodos y diversos mamíferos, fundamentalmente roedores pequeños, perros y animales domésticos, contribuyen en el ciclo enzoótico de estos microorganismos en el que el hombre constituye un huésped accidental. Además, estas infecciones inicialmente presentan síntomas sistémicos poco específicos que hacen difícil su diagnóstico temprano, basado en la semiología clínica (Mattar *et al.*, 2008).

Los comportamientos de alto riesgo que interactúan con factores de diversa índole (social, económica y cultural) constituyen factores condicionantes que crean un

ambiente propicio para la diseminación de estas enfermedades. Esto facilita la circulación de agentes patógenos y la transmisión de infecciones y epidemias entre diversos países y regiones (Mesa *et al.*, 2004).

Colombia, es una región de Suramérica que, por su condición socioeconómica, ubicación geográfica, biodiversidad de reservorios, vectores y características climatológicas tropicales, reúne condiciones favorables para la entrada, el desarrollo y persistencia de ciertas enfermedades emergentes (Cortés *et al.*, 2017).

Actualmente, en Colombia existen más de 60 enfermedades infectocontagiosas consideradas de interés en salud pública; estas se caracterizan por un comportamiento endemoepidémico en más del 85% del territorio nacional y se encuentran dentro del marco del síndrome febril agudo (SFA).

Para el médico colombiano es muy importante tener la capacidad de abordar los casos de forma adecuada, para garantizar la apropiada selección de las pruebas diagnósticas, las cuales, si bien tendrán limitaciones usuales en nuestro medio, le permitirán tomar las decisiones terapéuticas en un tiempo razonable (Cortés *et al.*, 2017).

En zonas tropicales como el departamento del Meta, la sintomatología de los pacientes es compatible con infecciones ocasionadas por agentes como virus *Dengue*, *Hantavirus*, virus de hepatitis y de la fiebre amarilla, bacterias como *Salmonella*, *Leptospira*, *Brucella* y *Rickettsia*, y parásitos como *Plasmodium*. Debido a los múltiples agentes que causan fiebres de origen desconocido en el

trópico colombiano, muchos casos quedan sin diagnosticar o con un diagnóstico erróneo.

El departamento del Meta y en general Colombia, debe darle un lugar prioritario a la vigilancia sindrómica, mediante la puesta en marcha de un conjunto de medidas que permitan disminuir los efectos devastadores de estos eventos; entre ellas, promover la investigación aplicada al diagnóstico y tratamiento oportunos; prevenir factores de riesgo; crear una estructura para el seguimiento de los agentes causales, consolidar las comunicaciones interlaboratorios y servicios de salud, y mantener la vigilancia sistemática de los vectores y reservorios, así como realizar esfuerzos para identificar los focos de contagio, brindar educación a la población de riesgo sobre las medidas de prevención, con el fin de evitar la aparición de nuevos casos y conocer la prevalencia; además, existe la necesidad de fortalecer la educación médica (Alemán *et al.*, 2006; Mattar *et al.*, 2004).

Los estudios sobre las etiologías del SFA en Colombia son pocos. En el Urabá antioqueño la etiología más frecuentemente identificada es la infección por virus dengue, cercana al 37%, seguida de *Leptospira* (14%), *Rickettsia* (2,7%) y la infección por arena y coronavirus (0,5%) (Arroyave *et al.*, 2013). Un estudio más reciente en el Quindío muestra como primera causa el dengue (43,6%), seguido de rickettsiosis (6,8%) y leptospirosis (6,8%). De forma interesante, este último estudio identificó coinfección por dengue y rickettsiosis (Rodríguez *et al.*, 2016).

El departamento del Meta ocupa los primeros lugares en las listas de casos notificados de dengue en el Sistema de vigilancia de salud pública del Instituto Nacional de Salud (SIVIGILA), donde prácticamente aparece como única causa

del SFA; no obstante, no existen estudios previos sobre las posibles etiologías de estos síndromes.

En el presente estudio se trabajó con cuatro agentes etiológicos: (i) el virus Dengue, que es el agente causal de la gran mayoría de síndromes febriles en el territorio nacional; (ii) *Leptospira*, que aunque es de notificación obligatoria en Colombia, los casos notificados al SIVIGILA por el departamento del Meta son sospechosamente bajos; (iii) *Hantavirus*, que solamente presenta estudios en el norte de Colombia, donde se encontró seroprevalencia en roedores y en humanos y un caso confirmado en el departamento de Córdoba. Los países vecinos como Venezuela y Brasil, han reportado casos de síndrome pulmonar por *Hantavirus* (SPH) y es posible que Colombia comparta roedores reservorios con ellos (Puerta *et al.*, 2006). (iv) *Rickettsia*, que aunque causa brotes importantes y de alta letalidad en Colombia, no es de notificación obligatoria. El departamento del Meta cumple con todas las condiciones sociales, climáticas, geográficas y sanitarias para que no solamente las enfermedades causadas por estos agentes, si no muchas más pasen solapadas bajo el nombre de dengue.

Se decidió excluir a la malaria de este estudio, ya que aunque el paludismo ocupa los primeros lugares en la etiología del síndrome febril en algunas zonas de Colombia, en el departamento del Meta se ha visto una reducción considerable desde el año 2010, donde se notificaron 1 480 casos, al año 2016 en el que se notificó 80 casos, esto posiblemente debido a la disminución de cultivos ilícitos en las zonas boscosas del departamento, lo que hace que menos personas viajen a estas áreas y estén expuestas a la picadura del vector, también a que el

Ministerio de Salud ha mejorado la vigilancia con la capacitación de personal de laboratorio que diagnostica la enfermedad por medio de la gota gruesa, asegurando que el paciente reciba tratamiento en el área y así se interrumpe la cadena de transmisión. También es importante tener en cuenta que, la malaria es una de las primeras enfermedades que se diagnostica en el laboratorio cuando el paciente procede de área endémica.

El Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico de la Universidad de Córdoba (IIBT) cuenta con personal entrenado en el estudio de enfermedades tropicales emergentes y reemergentes entre las que se encuentran las hantaviriosis y las rickettsiosis, esta es otra de las razones por las que se escogieron estos agentes etiológicos para el presente estudio.

1.2 Pregunta Problema

¿Cuál es la frecuencia de dengue, leptospirosis, hantaviriosis y rickettsiosis en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico en el departamento del Meta?

1.3 Objetivos

1. Determinar la frecuencia de las entidades nosológicas dengue, leptospirosis, hantaviriosis y rickettsiosis asociadas al síndrome febril agudo no palúdico en humanos del departamento del Meta.
2. Identificar los factores clínicos y epidemiológicos asociados al síndrome febril agudo no palúdico de los casos de dengue, leptospirosis, hantaviriosis y rickettsiosis.

3. Detectar la presencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en garrapatas del departamento del Meta.

1.4 Novedad científica

La novedad científica de este trabajo radica en que:

- Muestra la primera evidencia serológica de infección por hantavirus en pacientes con sintomatología de SFA no palúdico en el departamento del Meta.
- Reporta el primer caso de síndrome hemofagocítico probablemente desencadenado por una rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en Colombia.
- Reporta por primera vez en el departamento del Meta y por tercera vez en Colombia *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi*.

1.5 Valor teórico

El presente documento contiene toda la información relacionada con:

- La búsqueda activa de agentes etiológicos causantes de síndrome febril agudo no palúdico en el departamento del Meta.
- La coinfección de agentes bacterianos y virales en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico en el departamento del Meta.
- Los resultados de la detección molecular de *Rickettsia* sp. del grupo de las fiebres manchadas, en garrapatas del departamento del Meta.
- El pensamiento clínico sobre la sospecha de la infección por hantavirus, rickettsias y leptospiras, el cual se incrementó en los últimos años, gracias a

las publicaciones nacionales (2) e internacionales o extranjeras (3) sobre el tema, la participación en eventos científicos nacionales (4), la impartición de los cursos de microbiología en la facultad de medicina, así como la conformación de semilleros de investigación con representación regional y nacional que han permitido divulgar los resultados de estas investigaciones.

1.6 Valor práctico

Se muestran evidencias serológicas de la presencia y circulación de hantavirus, leptospira y rickettsia, además del virus Dengue en el departamento del Meta, lo que representa una alerta epidemiológica para las autoridades regionales y nacionales de salud pública.

Los resultados de esta investigación constituyen la base para futuras investigaciones eco-epidemiológicas de los agentes etiológicos encontrados en esta región de Colombia.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes y concepto de la vigilancia sindrómica

En 1998 se constituyó el Comité mundial de vigilancia de enfermedades, conformado por especialistas de todos los continentes, en el cual se agregó un concepto diferente de vigilancia epidemiológica al que tradicionalmente se manejaba, el de vigilancia sindrómica, lo que permitiría, además de vigilar las enfermedades ya conocidas, detectar otras desconocidas que pudieran tener importancia para la salud pública nacional e internacional (ADEX., 2003). La vigilancia sindrómica se define como la vigilancia de un grupo de enfermedades que tienen similitud de signos y síntomas, fisiopatología común y etiología diversa, orientada a detectar rápidamente la presencia de brotes o enfermedades con daño potencial a la salud de la población (Ministerio de salud de Perú.,1999; MinSalud., 2011).

De esta forma, se reconocen seis entidades diferentes de síndromes febriles:

- a) Síndrome febril agudo.
- b) Síndrome febril icterico agudo.
- c) Síndrome febril con manifestaciones hemorrágicas.
- d) Síndrome febril respiratorio agudo.

c) Síndrome febril con manifestaciones neurológicas.

d) Síndrome febril con erupción dérmica.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), determinó que en todas las situaciones en las cuales se presente alguno de los síndromes mencionados, estos deberían ser notificados de forma obligatoria, sin esperar la identificación del agente causal, para así lograr una detección precoz de los casos y evitar epidemias (Arroyave *et al.*, 2013).

2.2 Agentes etiológicos causantes de síndrome febril agudo

Entre las enfermedades infecciosas que se manifiestan como síndromes febriles agudos en las Américas, se encuentran: dengue, fiebres de Mayaro y Oropuche, hantaviriosis, encefalitis equina venezolana, arbovirosis del grupo C, influenza, hepatitis A, B y C rickettsiosis, leptospirosis, brucelosis, peste bubónica, ehrlichiosis, fiebre Q, malaria y bartonelosis, entre otras (Arroyave *et al.*, 2013).

2.2.1 Definición de caso del síndrome febril agudo

Todo paciente con inicio brusco de fiebre, con temperatura axilar $\geq 38^{\circ}\text{C}$ y de menos de siete días de evolución, que tenga entre 5 y 65 años de edad y que no tenga foco infeccioso evidente (MinSalud., 2012).

2.2.2 Dengue

El dengue es una enfermedad viral, de carácter endémico-epidémico, transmitida por mosquitos del género *Aedes*, principalmente por *A. aegypti*, que constituye hoy la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad,

mortalidad y afectación económica. Tiene diversas formas de expresión clínica: desde fiebre indiferenciada (frecuente en niños) y fiebre con cefalea, gran malestar general, dolores osteomioarticulares, con o sin exantema, leucopenia y algún tipo de sangrado hasta formas graves que – al comenzar con lo anterior – presenta choque hipovolémico por extravasación de plasma, con trombocitopenia moderada o intensa y con grandes hemorragias en aparato digestivo y otras localizaciones (Martínez, 2008).

Los virus del dengue pueden ser transmitidos a las personas por la picadura de mosquitos hembra; la transmisión de la enfermedad es multicausal y en ella, intervienen diferentes factores entomológicos, socioeconómicos y climáticos, además de hábitos y cultura. En particular, se evidencia que estos últimos juegan un papel importante en la distribución espacial y temporal de la enfermedad (Rúa *et al.*, 2013).

2.2.2.1 Etiología

Los virus del dengue pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Martínez., 2008).

El complejo dengue lo constituyen cuatro serotipos virales serológicamente diferenciables (Dengue 1, 2, 3 y 4) que comparten analogías estructurales y patogénicas, por lo que cualquiera puede producir las formas graves de la enfermedad, aunque los serotipos 2 y 3 están asociados a la mayor cantidad de casos graves y fallecidos. Son virus constituidos por partículas esféricas de 40 a 50 nm de diámetro. Su genoma de ácido ribonucleico (ARN) codifica para tres

proteínas estructurales: la proteína C, que compone la cápside que rodea y protege al ácido nucleico; la M, que forma la membrana viral; y la E, que conforma la envoltura y desempeña un papel fundamental durante la penetración del virus en la célula y en la respuesta inmunitaria; también para siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Guzmán *et al.*, 2006).

La proteína no estructural NS1 participa en la maduración viral y pudiera servir para el diagnóstico temprano.

2.2.2.2 Manifestaciones clínicas y patogenia

2.2.2.2.1 Fiebre del dengue

La infección asintomática y la fiebre indiferenciada son las manifestaciones más comunes del virus del dengue y representan entre el 50 y el 80% de los casos. La enfermedad tiene un período de incubación de dos a siete días; comienza de forma característica con fiebre de aparición brusca, escalofríos, mialgias intensas que explican la denominación popular de “fiebre quebrantahuesos”. La anorexia es característica y puede haber náuseas e incluso vómitos (Guzmán *et al.*, 2010).

Los signos físicos son mínimos y suelen reducirse a la inyección conjuntival y a los dolores con la palpación de los músculos o del epigastrio (Duran *et al.*, 2010).

El espectro de la enfermedad varía desde las formas subclínicas hasta las causantes de incapacidad transitoria y frecuentemente se confunde con otras alteraciones (Reyna *et al.*, 2014).

2.2.2.2.2 Dengue grave

El factor de riesgo principal de sufrir dengue grave es tener una segunda infección con un serotipo diferente del que causó la infección primaria. También se tiene consenso en que tener menos de 15 años de edad es un factor de riesgo al igual que ser de raza blanca y sufrir de enfermedades crónicas como el asma, la diabetes y la anemia de células falciformes (Malagón *et al.*, 2011).

El dengue grave se caracteriza por aumento de la permeabilidad vascular que conlleva a derrames serosos y hemoconcentración. La correlación entre la severidad de la enfermedad y los marcadores moleculares de la activación inmune y otros factores como el conteo alterado de plaquetas sugieren que la respuesta inmune al virus del dengue también contribuye al desarrollo del dengue grave (Guzmán *et al.*, 2006).

2.2.2.2.3 Síndrome del choque por dengue

El cuadro de síndrome de choque por dengue se manifiesta cuando, después de unos días de fiebre, el estado del paciente empeora bruscamente lo que coincide con el descenso de la temperatura. El dolor abdominal agudo es una característica frecuente, que se presenta unas horas antes del choque. La muerte puede ocurrir de 12 a 24 horas después de iniciado el choque; la falla cardiaca y la congestión pulmonar son las causas de muerte. La severidad del choque es dependiente de la edad, en niños pequeños la fuga capilar es mas grave, fenómeno relacionado con la integridad intrínseca de los capilares (Guzmán *et al.*, 2010).

2.2.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de una infección por el virus Dengue se debe realizar por pruebas de laboratorio, y puede ser por medio del aislamiento del virus, uso de biología molecular o detección de anticuerpos en el suero de los pacientes (SEDES., 2009).

2.2.2.3.1 Aislamiento viral

Cuatro métodos de aislamiento viral son usados rutinariamente: la inoculación intracerebral en ratones recién nacidos, la inoculación en cultivos de células de mamífero, la inoculación intratorácica de mosquitos adultos y la inoculación en cultivos celulares de mosquito (Oliveira *et al.*, 2004).

2.2.2.3.2 Inoculación intracerebral

La inoculación intracerebral de la muestra en ratones recién nacidos (uno o dos días) es el método tradicional y a su vez, el menos sensible para el aislamiento del virus, además de ser muy costoso y por requerir un tiempo largo para el aislamiento.

2.2.2.3.3 Cultivo en células de mamífero

El cultivo en células de mamífero presenta las mismas desventajas que la inoculación intracerebral, los virus generalmente requieren de muchos pases antes de que induzcan el efecto citopático en las células infectadas. Varias líneas celulares de mamíferos se usan con distintos grados de sensibilidad para el aislamiento de estos virus como la línea : LLCMK 2 y la BHK 21.

2.2.2.3.4 Inoculación intratorácica en mosquitos adultos

La inoculación del mosquito es el método de aislamiento viral más sensible hasta el momento. Cuatro especies de mosquito se usan para esta técnica: *A. aegypti*,

A. albopictus, *Toxorhynchites amboinensis* y *T. splendens*. Los mosquitos de ambos sexos son susceptibles. El virus dengue se replica a títulos altos en unos cuatro o cinco días, esto depende de la temperatura de incubación. La detección se hace a través de una inmunofluorescencia indirecta (IFI) de los tejidos del mosquito, usualmente del cerebro o de las glándulas salivares. Las desventajas de esta técnica son que se requiere de personal muy entrenado y tener insectarios para un gran número de mosquitos con las debidas precauciones, para evitar el escape de alguno infectado (Acosta *et al.*, 2005).

2.2.2.3.5 Cultivo en células de mosquito

El cultivo en células de mosquito es la técnica más reciente desarrollada para el aislamiento viral. El clon C6/36 de células de *A. albopictus* es la línea celular más empleada. La identificación viral se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Comparada con las otras técnicas, las ventajas de esta son la alta sensibilidad y la facilidad del mantenimiento del cultivo celular (Oliveira *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2005).

2.2.2.3.6 Diagnóstico serológico

En el dengue se observan principalmente dos tipos de respuesta serológica: primaria y secundaria. La primaria se presenta en aquellos individuos que no son inmunes a flavivirus. La respuesta secundaria se desarrolla en aquellos individuos con una infección aguda por dengue y que, además padecieron previamente una infección por flavivirus. La inmunidad a un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo. La existencia de

los cuatro serotipos virales posibilita que se produzcan, incluso, infecciones terciarias y cuaternarias (Nascimento *et al.*, 2014).

En los individuos que sufren una primoinfección, los anticuerpos IgG antidengue se incrementan lentamente a partir del quinto o sexto día del comienzo de los síntomas, los cuales son máximos hacia los 15 a 21 días. Después declinan y permanecen detectables prácticamente durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi al mismo tiempo del comienzo de los síntomas, permanecen elevados durante varias semanas y luego declinan. Esta elevación significativa permite el diagnóstico presuntivo en monosueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad (Castro *et al.*, 2013).

Los anticuerpos IgM antidengue que se producen en respuesta a la infección, se desarrollan rápidamente, y hacia el quinto día de la enfermedad, la mayoría de los individuos presenta cantidades detectables. (Guzmán *et al.*, 2002).

Existen diferentes sistemas inmunoenzimáticos (ELISA, de las siglas en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para el diagnóstico del dengue. Estos son económicos, rápidos y fáciles de ejecutar. Muestran a su vez sensibilidad elevada y especificidad cruzada, lo que los hace de gran utilidad como pruebas de “tamizaje”. Diferentes ELISA desarrollados para determinar la presencia de anticuerpos totales antilavivirus, demuestran su utilidad en estudios seroepidemiológicos y en el diagnóstico serológico (Aria *et al.*, 2010) (Guzmán *et al.*, 2010).

Los anticuerpos IgM antidengue, se producen transitoriamente durante las infecciones primaria y secundaria y su detección indica una infección activa o reciente por dengue (Moreno *et al.*, 2013).

2.2.2.3.7 Diagnóstico molecular

Las técnicas moleculares desarrolladas en la actualidad son:

2.2.2.3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa

La Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa (RT-PCR) se desarrolló para el diagnóstico de muchas enfermedades. El método es rápido, sensible y simple, además es útil para obtener información rápida de los serotipos circulantes (Usme *et al.*, 2012).

Lanciotti *et al.* desarrollaron una RT-PCR que usa cebadores diseñados para amplificar una región común de 511 pb de los virus dengue: los genes *C* y *prM*, seguida de una PCR anidada, que usa cebadores específicos para cada serotipo del virus dengue (Lanciotti *et al.*, 1992).

2.2.2.3.7.2 Hibridación de ácidos nucleicos

Es una técnica útil para el diagnóstico viral en tejidos obtenidos a partir de necropsias, ya que pueden usarse muestras frescas o tejidos fijos (Oliveira *et al.*, 2004).

2.2.2.4 Situación en Colombia

El territorio colombiano ofrece adecuadas condiciones ecológicas para la transmisión de la enfermedad (<http://goo.gl/7XKaw0>).

La altitud es un factor que limita la distribución de *A. aegypti*. En el país se registra infestación de este vector entre 0 y 2 200 metros sobre el nivel del mar (msnm) y transmisión a 2 200 msnm. En el territorio nacional existen 811 municipios ubicados a una altitud menor de los 1.800 msnm. Entre estos, según el sistema de información de eventos de notificación obligatoria (SIVIGILA), 758 municipios (93%) notifican casos de dengue en el país, entre 1999 y 2010 (Padilla *et al.*, 2012).

La costumbre de almacenar agua está muy arraigada en la mayor parte de la población de las áreas endémicas de transmisión en el país y existen factores que favorecen su persistencia, como la baja percepción individual y colectiva sobre el riesgo que esta práctica genera, y la enorme brecha existente entre el conocimiento de las medidas necesarias de prevención y control y la práctica de acciones regulares para prevenir y controlar los criaderos potenciales de *A. aegypti* (Suarez, 2000).

Las formas graves del dengue aparecieron en Colombia desde los inicios de la década de los noventa del siglo pasado y su proporción se mantiene cercana al 10% del total de los casos presentados (Padilla *et al.*, 2012).

Las muertes se deben, generalmente, a la falta de medidas efectivas de promoción que induzcan la demanda de la atención, la mala calidad generada por el desconocimiento y la falta de observancia de las guías oficiales además de las restricciones que imponen las aseguradoras e instituciones prestadoras de servicios de salud para el manejo hospitalario oportuno (Padilla *et al.*, 2012).

La región de la Orinoquia ocupa el extremo oriental del país. Es una sabana extensa, plana y cálida, con clima tropical húmedo y rica hidrología. Se encuentra ubicada entre los límites con la República Bolivariana de Venezuela por el norte y el oriente, la línea de divorcio de aguas con la Amazonia por el sur y la línea de divorcio de la Cordillera Oriental de los Andes por el occidente. Tiene una extensión territorial de 310.263 km², equivalente a 27,2% del territorio nacional. El territorio de la Orinoquia está ocupado por los departamentos de Arauca, Casanare, Meta, Vichada, Guaviare y Guainía. El ecotopo fundamental de esta región es el llano (Regiones Colombianas, 2015).

Durante 1983 a 2010 se registraron 99 879 casos acumulados de dengue en la Orinoquia colombiana, de ellos, 94 742 casos sucedieron a partir de 1990 y de ellos se registraron 4 674 casos graves. El 65,7% (62 288) de los casos acumulados de dengue se concentraron en Meta y Arauca. Además, si se suman los casos de Casanare, en estos tres departamentos de la Orinoquia colombiana se concentraría el 91,4% del total de los casos de dengue del país (Padilla *et al.*, 2012).

Según datos SIVIGILA, en el 2011 se reportaron 2 725 casos de dengue en el departamento del Meta, 6 214 casos en el 2012, 9 290 en el 2013, 7 801 en el 2014, 6 097 en el 2015 y hasta la semana 30 del 2016, se notifican 2 136 casos (INS., 2010; INS.,2011; INS., 2012; INS.,2015; INS .,2016).

En términos de tasas de incidencia, la enfermedad fluctúa desde 1978, con tendencia al incremento a través del tiempo. Situación similar se observa en el comportamiento de la mortalidad, la cual pasó de 0,07 defunciones por 100 000

habitantes en los años 1990 a 0,19 defunciones por 100 000 habitantes en la presente década (MinSalud., 2013).

La información epidemiológica del Meta evidencia el carácter endemo-epidémico, con un cambio en el patrón de transmisión a hiperendemia, con transmisión activa de dengue en la mayoría de los municipios de este departamento, donde se destaca Villavicencio como el foco de transmisión más importante. Uno de los factores que explica este fenómeno es la intensa actividad comercial que mantiene Villavicencio como centro urbano con la mayoría de los municipios del departamento y de la orinoquia colombiana. (Padilla *et al.*, 2012).

2.2.3 Leptospirosis

La leptospirosis, descrita la primera vez por A. Weil en 1886, es una enfermedad infecciosa aguda incluida entre las zoonosis. Es causada por espiroquetas del género *Leptospira*, las cuales infectan a variados animales domésticos y silvestres, los que frecuentemente constituyen portadores asintomáticos. El hombre se puede infectar por contacto directo o indirecto (Zunino *et al.*, 2007; Ningal *et al.*, 2015).

Por la diversidad en sus formas de presentación, la leptospirosis es un problema de salud pública, ya que puede ir desde una enfermedad asintomática, cuadros incapacitantes hasta las formas graves que pueden terminar en la muerte del paciente. (Caino *et al.*, 2006).

2.2.3.1 Etiología

Las leptospirosis son bacterias muy delgadas, de 6 a 20 μm de largo y 0,1 a 0,2 μm de ancho, pero en cultivos pueden observarse células más largas. Son

espiroquetas muy flexibles, con sus extremos encorvados como ganchos, poseen dos filamentos axiales con inserciones polares responsables de su movilidad. Son bacterias Gram negativas que se clasifican en dos complejos: *Leptospira interrogans* sensu lato (sl) y *Leptospira biflexa* sl. La clasificación está basada en la capacidad para producir enfermedad y en el contenido guanina–citosina de su ADN, entre otras (Ningal *et al.*, 2015). Dentro del complejo *L. interrogans* sl se encuentran más de doscientos serovares y en *L. biflexa* sl hay más de sesenta serovares (Baquero *et al.*, 2010; Naranjo, 2010).

Las leptospiras son microorganismos aerobios obligados, catalasa y oxidasa positivos, que crecen a una temperatura óptima de 28 a 30 °C. Se desarrollan en medios enriquecidos con vitaminas B1 y B12, factores de crecimiento, ácidos grasos de cadena larga, que son su única fuente de carbono, y son metabolizados por β -oxidación (Naranjo, 2010).

2.2.3.2 Reservorios y transmisión

Las leptospiras colonizan los túbulos renales de los animales reservorios, los cuales excretan la bacteria en la orina. Muchas especies de mamíferos y anfibios pueden actuar como reservorios de leptospiras y haber podido estar con ellas por muchas generaciones, situación que permite relacionar el serovar con una especie animal, por ejemplo: es común que el serovar Pomona tenga como reservorio a los cerdos, el serovar Hardjo a las vacas, el serovar Icterohaemorrhagiae a las ratas (Agudelo *et al.*, 2007).

En Colombia, los perros, cerdos y roedores se consideran como un factor importante para la transmisión de leptospiras en ambientes urbanos y rurales (Georgia Epidemiology report, 2006; Ferro *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2010).

La infección en humanos ocurre por el contacto con las leptospiras que penetran por pequeños cortes en la piel o a través de membranas mucosas como la conjuntiva. La inhalación de gotas microscópicas, el paso de la leptospira por mucosa oral y la ingestión, son formas menos probables de infección. Asimismo, en menor frecuencia, la leptospirosis puede adquirirse por contacto directo con sangre, orina o tejidos de animales infectados (Chinchilla *et al.*, 1996).

La leptospirosis representa un riesgo ocupacional para veterinarios, arroceros, trabajadores que limpian alcantarillas o que trabajan en el tratamiento de aguas, al igual que el personal del ejército, debido a algunas prácticas militares (Georgia Epidemiology report., 2006) .

El hombre es un huésped accidental y en él se interrumpe la cadena de transmisión, ya que posee una orina relativamente ácida y la bacteria es muy sensible al pH ácido (Chinchilla *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2010).

2.2.3.3 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación promedio es de aproximadamente diez días, con un rango de tiempo que oscila entre siete y 12 días, mientras que el periodo de transmisibilidad puede ir de uno a 11 meses, pasada la fase aguda de la enfermedad o fase leptospirémica. La inmunidad surge después de la infección y es específica para el serovar infectante (Ningal *et al.*, 2015).

La forma leve de la enfermedad en humanos comienza con una fase leptospirémica, en la que el signo más característico es la inyección conjuntival, que se inicia de dos a tres días luego de la aparición de la fiebre y se mantiene hasta tres semanas. Los síntomas acompañantes suelen ser cefalea frontal, con menor frecuencia retroorbital o bitemporal, generalmente persistente e intensa, fiebre alta con uno o más picos diarios, precedidos de escalofríos y dolor muscular intenso en muslos, pantorrillas, región lumbosacra y abdomen (Caino *et al.*, 2006) (Chinchilla *et al.*, 1996).

La leptospirosis también puede presentarse con una gran variedad de manifestaciones clínicas, que van desde una forma inaparente o una simple gripa, hasta una forma severa o enfermedad de Weil. La severidad de la enfermedad dependerá del serovar involucrado, del tamaño del inóculo, la edad y el estado inmunológico de la persona (Caino *et al.*, 2006).

2.2.3.4 Diagnóstico

Existe una gran variedad de pruebas diagnósticas para la leptospirosis, estas incluyen:

1. Cultivo bacteriológico: El cultivo de sangre como método de diagnóstico es de gran importancia, porque constituye una prueba irrefutable de la causa de la enfermedad, permite el aislamiento del microorganismo, así como la identificación y clasificación del aislado. Esta técnica solo es útil en los diez primeros días de la enfermedad, después de este tiempo, las leptospiras empiezan a desaparecer de la sangre (Rodríguez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005).

2. Detección de ácidos nucleicos: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las siglas en inglés Polymerase Chain Reaction): esta prueba se utiliza únicamente en los primeros siete días de la enfermedad en sangre y, después de este tiempo, en muestra de orina, donde el diagnóstico es rápidamente confirmado. (Cardona *et al.*, 2008). Es una técnica muy útil en el diagnóstico postmortem de esta enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2013).

3. Pruebas serológicas: Una variedad de pruebas serológicas para el diagnóstico de la leptospirosis fueron desarrolladas en los últimos años, pero su aplicación y validación en Colombia aún no se ha establecido (Agudelo., 2005). El ELISA IgM es una prueba con gran sensibilidad, no requiere de sueros pareados. Sin embargo, los resultados del ELISA se consideran preliminares y se recomienda la confirmación por microaglutinación (MAT, de sus siglas en inglés Microagglutination Test) (Guerrero *et al.*, 2001).

La MAT es considerada la prueba de referencia, por su alta especificidad, y esta es su mejor ventaja. La principal desventaja es que requiere de un panel de leptospiras vivas, que no se encuentran disponibles en todos los laboratorios. El panel necesita incluir serovares representativos de los serogrupos (Cinco *et al.*, 1992; Meites *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2010; Obregón *et al.*, 2003).

La leptospirosis humana necesita de un diagnóstico microbiológico rápido y oportuno, por ser una enfermedad letal y frecuente en todo el mundo. Por eso, en algunas partes se utilizan las pruebas rápidas, que brindan resultados en tres minutos; con aceptables valores de sensibilidad, especificidad y concordancia, en

comparación con el método de referencia internacional o MAT (Obregón *et al.*, 2014; Obregón *et al.*, 2011).

2.2.3.5 Situación en Colombia

En Colombia se reportan diferentes valores de seroprevalencia de la enfermedad; así por ejemplo, en un estudio realizado en el departamento de Córdoba, con población en situación de desplazamiento, se reportó seroprevalencia de anticuerpos contra leptospiras de 67,9% (53/78) (Rodríguez *et al.*, 2009b). En el departamento del Valle del Cauca se informó 23,3% (60/259) (Ferro *et al.*, 2006). En Antioquia la seroprevalencia fue de 13,3%, en donde se observó que los brotes presentados se debían a factores socioambientales como la cercanía de las viviendas a las márgenes de los ríos y las quebradas (Agudelo *et al.*, 2007; Arroyave *et al.*, 2013). En Bogotá se presentó una seroprevalencia de 12,6% (165/1307) (Ortiz *et al.*, 2009), mientras que en Tolima se reporta la más baja del país con 6% (51/850) (Romero *et al.*, 2010).

En estos estudios los serovares más prevalentes son Icterohaemorrhagiae y Grippothyphosa, seguidos de otros como Bataviae, Cynopteri, Canicola, Shermani, Patoc, Copenhageni, Panama y Pomona (Agudelo *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008).

Desde el año 2007, la leptospirosis es de notificación obligatoria en Colombia. El Instituto Nacional de Salud (INS) confirma el diagnóstico de leptospirosis mediante ELISA y MAT de muestras humanas de diferentes partes del país (Pulido *et al.*, 2014). Para la semana epidemiológica 30 de 2016 se habían notificado en el departamento del Meta 25 casos de leptospirosis (INS, 2016).

2.2 4 Hantaviriosis

En el decenio de 1930 se notificaron en Europa y Asia brotes de lo que en esa época se pensaba que era una fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR), pero fue en 1978 cuando se aisló el virus Hantaan, fecha en la cual se confirmó que algunos roedores servían de reservorio de los virus que causaban dicho cuadro (OPS, 1999).

En 1993, en el suroeste de los Estados Unidos de América, un brote de afecciones respiratorias graves permitió que se identificara un nuevo hantavirus, como el agente etiológico de una enfermedad conocida en la actualidad como síndrome pulmonar por hantavirus (SPH). El virus se llamó *Sin Nombre* (VSN), y se detectó que el roedor que servía de reservorio primario era *Peromyscus maniculatus*, un ratón de campo (Guzmán *et al.*, 2013).

Investigaciones ulteriores han identificado otros hantavirus en el continente americano y, de ellos, algunos han causado SPH (Londoño *et al.*, 2011).

2.2.4.1 Etiología

El género hantavirus pertenece a la familia *Bunyaviridae*, una gran familia de unos 300 virus que infectan animales, plantas y humanos. En general, los hantavirus son referidos comúnmente como hantavirus del viejo y del nuevo mundo, debido a la distribución geográfica de los roedores reservorios y del tipo de enfermedad (FHSR y SPH) que se manifiesta en los humanos (Londoño *et al.*, 2011).

El genoma está constituido por ARN trisegmentario, con un segmento grande (L) cuya longitud es de aproximadamente 6 500 nucleótidos, un segmento medio (M) que tiene alineados de 3 600 a 3 800 nucleótidos y un segmento pequeño (S) con

una longitud aproximada de 1 700 a 2 100 nucleótidos. El segmento L codifica para la nucleoproteína (N) y las glicoproteínas de envoltura (Gn y Gc) (Puerta *et al.*,2006).

Para los hantavirus, la proteína N es la más abundante y es la que primero se sintetiza en una infección y hay evidencias que sugieren que modula la respuesta inmune durante la infección (Jonsson *et al.*, 2010).

2.2.4.2 Transmisión

La infección por hantavirus en el huésped natural es crónica, asintomática, con diseminación del virus en múltiples órganos. La transmisión entre poblaciones de reservorios es horizontal, producto de los encuentros agresivos entre machos adultos (Mattar *et al.*, 2007).

Su transmisión a seres humanos ocurre principalmente a través de la inhalación de aerosoles contaminados con partículas virales provenientes de las excretas y orinas de roedores. Otras rutas de infección menos frecuentes incluyen el contacto directo (piel lesionada, membranas mucosas) con fluidos de roedores o fómites, ingestión de alimentos contaminados, mordedura de un roedor infectado y, posiblemente, transmisión persona a persona, documentada con el virus *Andes* (CDC, 2002).

2.2.4.3 Manifestaciones clínicas

2.2.4.3.1 Fiebre hemorrágica con síndrome renal

La gravedad de la FHSR varía con el agente causal. Las infecciones por los virus *Hantaan*, *Dobrava* y *Amur* generalmente causan síntomas graves. El virus *Seoul* suele provocar enfermedad moderada, mientras que las infecciones por los virus

Puumala y *Saaremaa* (Dobrava Aa) habitualmente son leves. El curso de la enfermedad clásicamente se divide en los estadios febril, hipotenso/proteinúrico, oligúrico, diurético y convaleciente (Avellaneda, 2012).

La aparición de la FHSR generalmente es abrupta; los signos clínicos iniciales pueden incluir fiebre, escalofríos, postración, dolor de cabeza y dolor de espalda. También se pueden observar signos gastrointestinales que incluyen náuseas, vómitos y dolor abdominal. Este estadio prodrómico habitualmente dura de unos días a una semana, y está seguido por la aparición de los signos renales. El primer estadio es el proteinúrico. Durante esta fase de la enfermedad se puede desarrollar hipotensión y dura horas o días. Con frecuencia se producen náuseas y vómitos, y un ataque agudo puede provocar la muerte (Zhenqiang *et al.*, 2008).

En los casos graves, este estadio está seguido habitualmente de una fase oligúrica y luego de una fase diurética/poliúrica, a medida que se mejora la función renal. En cualquier momento puede ocurrir la muerte (<http://goo.gl/MospJv>, 2009).

2.2.4.3.2 Síndrome pulmonar por Hantavirus

Desde que se identificó el SPH en 1993, numerosas especies de hantavirus del Nuevo Mundo se describen en Norte, Centro y Suramérica. En Norteamérica, la gran mayoría de casos de SPH son causados por el virus *Sin Nombre* (VSN), responsable también de los primeros casos identificados. Otros virus incluidos son *New York* y *Monongahela*, cuyos reservorios son los roedores del género *Peromyscus*; el virus *Bayou*, cuyo reservorio es *Oligoryzomys palustris* o rata del arroz y el virus *Black Creek Canal* cuyo roedor reservorio es *Sigmodon hispidus*,

la rata del algodón (MacNeil *et al.*, 2011). El período de incubación tiene un rango de uno a cinco semanas.

El SPH inicia con un pródromo que incluye fiebre, mialgias, cefalea, dolor abdominal, diarrea y náuseas. Con posterioridad aparece de forma rápida (lapso de cuatro a 24 horas) la enfermedad pulmonar severa con hipoxia; el incremento extraordinario de la permeabilidad de los capilares pulmonares ocasiona edema pulmonar, en el que el trasudado tiene abundantes proteínas. Los individuos en estado muy grave pueden necesitar la extracción, por aspiración, de un litro de líquido seroso por hora de sus vías respiratorias (Mas *et al.*, 2009).

La hipovolemia resultante del paso de líquido de la sangre circulante a los planos intersticiales del pulmón y a los espacios aéreos, contribuye a la hipotensión arterial; sin embargo, casi todos los enfermos también muestran depresión grave del miocardio que, junto con el edema pulmonar, son la causa de la muerte (OPS, 1999).

Las infecciones leves o que no presentan síntomas, parecen ser inusuales con el VSN, pero pueden ser más comunes con algunos hantavirus sudamericanos. Las infecciones por el virus *Andes* suelen causar enfermedad grave, mientras que las infecciones por el virus *Choclo* generalmente son más leves (<http://goo.gl/MospJv>).

2.2.4.4 Diagnóstico

El Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC) define como caso confirmado de infección por Hantavirus a aquel clínicamente compatible con la enfermedad y confirmado por laboratorio (CDC, 2015).

La clínica compatible con la enfermedad incluye uno o más de los siguientes signos o síntomas: fiebre (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$); edema bilateral intersticial difuso, que radiográficamente parece un síndrome de distress agudo respiratorio, requiere ventilación mecánica y, además, ocurre en una persona previamente sana (CDC, 2015).

La confirmación de laboratorio incluye la detección de inmunoglobulinas IgM específicas para hantavirus o seroconversión o incremento de 4 veces en los títulos de IgG específicos para hantavirus, mediante el ELISA de captura, en donde se utiliza la proteína N del VSN como antígeno; este antígeno cruza con todos los hantavirus del nuevo mundo (CDC, 2015).

Un estudio realizado por Guzmán *et al.* (2013), comparó pruebas de ELISA en las que se utiliza como antígenos los virus *Maciel* MACV y *Araraquara* ARAV con un sistema de referencia que emplea al VSN como antígeno, y mostró sensibilidades de 91% y 73% para MACV ELISA y ARAV ELISA, respectivamente, lo que avala el empleo del VSN como antígeno.

La RT-PCR es una técnica de diagnóstico molecular dirigida a la detección de regiones específicas del genoma viral y se realiza únicamente en laboratorios de investigación escogidos. No se recomienda su uso para el diagnóstico de rutina, pero es útil para definir el genotipo viral, buscar nuevos virus y realizar estudios epidemiológicos (Gegundez *et al.*, 2005).

2.2.4.5 Tratamiento

Hasta el presente, no se conocen antivirales, vacunas o inmunoterapéuticos que sirvan como tratamiento contra las fiebres hemorrágicas virales. La Ribavirina

tiene actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* (en animales) contra miembros de las familias *Bunyaviridae* y *Arenaviridae*. Este antiviral reduce la mortalidad y es efectiva en el tratamiento de la encefalitis, en ratones lactantes infectados con el virus *Hantaan* (Jonsson *et al.*, 2010).

2.2.4.6 Situación en Colombia

Los hantavirus están documentados en Sur América, específicamente en Argentina, Chile, Paraguay, Uruguay, Bolivia, Brasil, Perú y Venezuela, así como América Central en Costa Rica y Panamá (Mattar *et al.*, 2004).

Aunque en cuatro de los países fronterizos con Colombia se reportan casos de hantaviriosis, en este país solo se conoce de un caso en la ciudad de Montería, Córdoba. El paciente no presentó edema pulmonar y solo tuvo algunos síntomas respiratorios leves, similar a lo sucedido en Panamá. (Mattar *et al.*, 2014).

En el norte de Colombia, en los departamentos de Sucre y Córdoba, se muestran prevalencias al VSN en trabajadores de áreas rurales, lo que sugiere que al menos un hantavirus es endémico en roedores de esta área (Mattar *et al.*, 2004).

En el 2012, en el departamento de Sucre, Blanco *et al.* encontraron evidencia serológica de infección por hantavirus en las especies de roedores *R. rattus* y *Mus musculus*. La presencia de roedores urbanos infectados sugiere que alguna de estas especies murinas actúa como posible reservorio de hantavirus en esta área y que posiblemente existe más de un virus de esta especie que circula en esa región de Colombia (Blanco *et al.*, 2012).

En el límite del departamento de Córdoba con Panamá, se comparte la fauna de roedores; entre ellos se encuentra *Oligoryzomys fulvescens*, reservorio del virus

Choclo y causante del SPH en Panamá. En estudio realizado por Alemán *et al.*, la baja captura en el número de *O. fulvescens*, sugiere que posiblemente este virus circula en Colombia, aunque en ese estudio fueron capturados más roedores *Zygodontomys brevicauda* que es reservorio del virus *Calabazo* en Panamá aún no asociado con enfermedad en humanos (Alemán *et al.*, 2006).

La caracterización genética de los hantavirus que circulan en el departamento de Antioquia (ubicado al sureste de Córdoba) indican que los agentes aislados son similares al virus *Calabazo* (85% secuencia nucleotídica y 100% aminoácidos) (Londoño *et al.*, 2011). Lo que explicaría la ausencia de la enfermedad en humanos de la región. (Guzmán *et al.*, 2013). En la región de la Orinoquia no existen estudios sobre hantavirus.

2.2.5 Rickettsiosis

La rickettsiosis es una enfermedad poco conocida por la comunidad no médica; sin embargo, sus raíces, por lo menos las conocidas, se remontan al siglo XIX, cuando se empezó a estudiar la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. Aunque existen en el plano internacional diversos grupos que la estudian, principalmente desde las ciencias básicas, su diagnóstico y presencia en el ámbito epidemiológico local son aún inciertos, en especial en el ámbito social y cultural. (Hidalgo *et al.*, 2008).

2.2.5.1 Etiología

El género *Rickettsia* incluye las bacterias del *phylum* proteobacteria, subclase a-1 del orden Rickettsiales. Viven en el citoplasma, y con menos frecuencia en el núcleo de las células que infectan, y se caracterizan por ser pequeños cocobacilos

(0,3 a 1 μm) de crecimiento obligado intracelular. Tienen un genoma que oscila entre 1,1 y 1,6 Mb. A pesar de ser clasificadas como Gram negativas, se tiñen mal mediante esta tinción. No crecen en los medios de cultivo habituales y precisan animales de laboratorio, huevos embrionados o líneas celulares como Vero, HEL, L-929 o líneas celulares de artrópodos. Presentan además diferentes proteínas mayores de superficie, entre las que destacan la OmpA (190 kDa) que está presente fundamentalmente en las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas y la OmpB (135 kDa), presente en todas las especies de *Rickettsia* (Oteo *et al.*, 2014).

Con base en análisis filogenéticos, se proponen dos clasificaciones para las diferentes especies de este género. En la primera, se describen cuatro grupos: grupo de las fiebres manchadas, grupo del tifus, grupo transicional y grupo ancestral. En la segunda clasificación, se contemplan únicamente dos grupos con subgrupos: grupo de las fiebres manchadas (subgrupo *Rickettsia rickettsii*, subgrupo *R. massiliae*, subgrupo *R. helvetica* y subgrupo *R. akari*) y grupo del tifus (subgrupo *R. prowazekii*) (Hidalgo *et al.*, 2013).

2.2.5.2 Grupo de las Fiebres Manchadas

Las fiebres manchadas comprenden un gran número de infecciones zoonóticas transmitidas por mordedura y picadura de garrapatas y pulgas. Estas infecciones son causadas por rickettsias estrechamente relacionadas en el nivel genético. Dentro de este grupo encontramos la fiebre de las Montañas Rocosas (conocida en Colombia como fiebre de Tobia). Las rickettsias son, en muchos lugares del mundo, agentes patógenos emergentes o reemergentes y las enfermedades

asociadas a las mismas tienen un espectro amplio de severidad. (Hidalgo *et al.*, 2008).

2.2.5.3 Rickettsiosis transmitidas por garrapatas

Las garrapatas son los artrópodos vectores de mayor importancia en la transmisión de microorganismos al hombre y a los animales (Hidalgo *et al.*, 2013). Diferentes géneros de la familia *Ixodidae* están implicados en el papel vectorial y como reservorios o amplificadores de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (Parola *et al.*, 2005), los cuales requieren un periodo aproximado entre seis y 24 horas de hematofagia continua en el ser humano, para la transmisión de estos microorganismos (Chapman *et al.*, 2006).

En las Américas, las garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Amblyomma* están fuertemente relacionadas con la transmisión de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. massiliae* y *R. africae*, estas son las especies más representativas en este continente (Guglielmone *et al.*, 2006).

2.2.5.4 Manifestaciones clínicas y patogenia de la fiebre manchada por *Rickettsia rickettsi*

Cuando *R. rickettsii* ingresa al huésped humano, después de ser inyectada directamente desde las glándulas salivales de la garrapata durante su alimentación, se dispersa por los vasos linfáticos y sanguíneos hasta alcanzar las células endoteliales, por las que tiene especial tropismo. Como *R. rickettsii* tiene un genoma restringido, utiliza muchos sustratos esenciales de la célula hospedadora en lugar de sintetizarlos. Este mecanismo le permite permanecer en

el citoplasma del hospedador y sobrevivir sin necesidad de genes que codifiquen proteínas para su metabolismo (Chen *et al.*, 2008) (Venzal *et al.*, 2011).

Clínicamente la rickettsiosis, por *R. rickettsi*, presenta un periodo de incubación entre dos y 14 días después de la mordedura de la garrapata (aproximadamente el 40% de los pacientes lo recuerda), con una media de 7 días (Lin *et al.*, 2012). En las fases iniciales predominan los síntomas inespecíficos, como fiebre, malestar general, escalofríos, cefalea intensa, mialgias entre otros (Hidalgo *et al.*, 2013).

La tríada clínica clásica es fiebre, cefalea y exantema, presente únicamente en 3 a 5% en los primeros tres días, porcentaje que aumenta hasta 60 a 70% entre el día siete y el 10 de la enfermedad (Dantas, 2007). El exantema se inicia típicamente en las muñecas y los tobillos, como lesiones maculares eritematosas pequeñas no pruriginosas, para diseminarse de forma centrípeta y alcanzar las extremidades (se incluyen palmas de las manos y plantas de los pies) y el tronco. Sin embargo, el 10% de los pacientes nunca desarrolla manifestaciones exantemáticas (Díaz *et al.*, 2010). Las complicaciones incluyen meningitis o meningoencefalitis, edema pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, falla renal aguda, disfunción hepática, choque hipovolémico y rara vez, compromiso cardíaco (Hidalgo *et al.*, 2013).

Otras rickettsias como *R. parkeri* y *R. amblyommii* están asociadas con una enfermedad similar a la fiebre manchada de la Montañas Rocosas, pero con un curso más benigno. La demostración de reacción cruzada de estos agentes con *R. rickettsi*, hizo que se propusieran nuevas teorías sobre la ecoepidemiología de la fiebre manchada. En estas se resalta el papel de otros generos de garrapatas

como vectores y el concepto de reacción cruzada entre las especies del grupo de la fiebre manchada (Angerami *et al.*, 2016). Esto pudiera explicar la pequeña proporción de casos confirmados ante un gran número de sospechosos.

2.2.5.5 Situación en Colombia

En este país la fiebre manchada de las Montañas Rocosas la describió por primera vez Luis Patiño en 1937, quien informó de un síndrome febril en el municipio de Tobia, en el departamento de Cundinamarca. La mortalidad del brote alcanzó el 95% y, posteriormente, se demostró que fue causado por *R. rickettsii* (Hidalgo *et al.*, 2008).

En el 2002, en el análisis de sueros de 100 campesinos del municipio de Ciénaga de Oro, en el departamento de Córdoba, se encontró una seroprevalencia de 49% contra *Rickettsia* sp. (Miranda *et al.*, 2002). Posteriormente, entre diciembre de 2003 y mayo de 2004, se confirmaron dos casos mortales de pacientes que vivían cerca de los municipios de Villeta y Tobia, en Cundinamarca (Hidalgo *et al.*, 2007a). En el municipio de Villeta, se encontró que el 40%, de 371 muestras contenían anticuerpos IgG contra *R. rickettsii* (Hidalgo *et al.*, 2007b).

Entre febrero y marzo de 2006, en el municipio de Necoclí, en el golfo del Urabá antioqueño se describió por primera vez la infección, se presentó el brote de un síndrome febril hemorrágico y se encontraron 14 individuos que cumplían con la definición de caso establecida; los que se confirmaron como rickettsiosis mediante inmunohistoquímica y por IFI-IgG, y dos casos fatales por nexos epidemiológicos (Acosta *et al.*, 2006).

Un año después, a finales de febrero de 2007, otro brote de síndrome febril ocurrió en el municipio Los Córdoba, departamento de Córdoba. Se confirmaron 11 casos de rickettsiosis: tres por inmunohistoquímica y siete por IFI, y en un caso se logró amplificar los genes *rOmpA* y *rOmpB* por PCR, y se confirmó la presencia de *R. rickettsii*. Fallecieron seis personas para una letalidad de 54% (Hidalgo *et al.*, 2007c).

Un tercer brote ocurrió en enero de 2008, esta vez en Turbo, en donde se encontraron 22 casos sospechosos, de los que finalmente 15 fueron considerados para el estudio, cuatro de ellos fallecieron, para una letalidad del 26,6%. Finalmente, seis casos (40%) se confirmaron por laboratorio, identificándose como agente implicado una rickettsia del grupo de las fiebres manchadas (Díaz *et al.*, 2010).

El departamento del Meta solo cuenta con un estudio en donde se reportó por primera vez una alta tasa de infección por rickettsia en humanos. La seroprevalencia contra *Rickettsia* sp. del grupo de la fiebres manchadas, fue de 59% (19 humanos); se encontraron 12 sueros con título de 64, 6 sueros con 128 y un suero presentó titulación de 512. (Miranda *et al.*, 2011).

Finalmente, para mitigar los efectos que se presentan con enfermedades como las causadas por hantavirus, leptospiras o rickettsias, Colombia debe darle un lugar prioritario a la vigilancia, no solo de estos agentes infecciosos, sino también de otras enfermedades emergentes y re-emergentes, con la puesta en marcha de un conjunto de medidas que permitan disminuir los efectos devastadores de estos eventos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño general

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se diseñó un estudio observacional de corte transversal en el periodo entre mayo de 2013 y junio de 2014. Se dividió en cuatro partes:

- Determinación de la frecuencia de dengue y leptospirosis en pacientes con SFA no palúdico del departamento del Meta.
- Detección de hantaviriosis y rickettsiosis en los pacientes con SFA no palúdico en estudio.
- Asociación de variables clínicas y epidemiológicas con las etiologías encontradas.
- Colecta de garrapatas para detección molecular de *Rickettsia* sp. del grupo de las fiebres manchada.

3.2 Aspectos demográficos y ecológicos del sitio de estudio

El departamento del Meta posee una población total de 961 292 habitantes, según la aproximación hecha por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística para el 2016, basado en el último censo del 2005 (DANE., 2005). El Meta cuenta con una superficie equivalente a 85 635 km² que representan el 7,49% del territorio nacional, ubicándose como el cuarto departamento más grande del país (figura 1).

La altura sobre el nivel del mar oscila entre 125 y 4 000 metros y la temperatura promedio es de 30°C (Gobernación del Meta, 2016). El departamento del Meta tiene 29 municipios y está formado por tres grandes regiones fisiográficas que lo perfilan con un amplio potencial forestal y una gran riqueza hídrica (Plan vial departamental del Meta., 2009).



Figura 1. Mapa de Colombia donde se resalta el departamento del Meta.

http://sancarlosdeguaroa-meta.gov.co/apc-aa-files/38393161666263343864633263613562/San_Carlos_en_Colombia.JPG

3.3 Universo de trabajo y muestras

La población la conformó todo paciente febril que llegó al Hospital Departamental de Villavicencio (HDV) y que cumplía con los siguientes criterios de inclusión: temperatura axilar ≥ 38 °C de no más de siete días de evolución, edad comprendida entre 5 y 65 años de edad y sin focalización conocida.

Debido a que los médicos de los servicios de urgencias, solo remiten al laboratorio para toma de muestra a: i. Niños menores de 5 años, ii. Adultos mayores de 65

años, iii. Mujeres embarazadas y iv. Pacientes con enfermedad de base, se tomó la decisión de hablar con ellos para explicarles sobre el proyecto de investigación y solicitarles el envío de un número mayor de pacientes al laboratorio que cumplieran con los criterios de inclusión. De igual forma se diseñó un cartel que se colocó en los pasillos de los servicios de urgencias, donde se invitaba a los pacientes a asistir al laboratorio clínico si tenían alguno de los síntomas que se nombraban en el mismo (anexo 1).

3.3.1 Selección de los pacientes objeto de estudio

La selección de los pacientes se hizo mediante un muestreo no probabilístico, por conveniencia durante el periodo de estudio. Una vez en el laboratorio a cada paciente que cumplió con los criterios de inclusión anteriormente mencionados, se le realizó el examen de gota gruesa para descartar malaria. Acudieron 286 pacientes al laboratorio para obtención del suero de fase aguda, pero solo 100 pacientes regresaron al laboratorio para toma de la segunda muestra, constituyendo estos últimos la muestra de estudio.

Cada paciente firmó un consentimiento informado, para los pacientes menores de edad el consentimiento lo firmó el acudiente, luego se procedió a llenar una encuesta diseñada para el trabajo (anexos 2 y 3).

De cada paciente se obtuvieron 5 ml de sangre, por venopunción, en un tubo sin anticoagulante, procedimiento que se llevó a cabo en el laboratorio clínico del HDV. Los sueros de la fase aguda se recolectaron únicamente al quinto día de iniciados los síntomas, al seguir el protocolo del HDV, y los sueros de la fase convalecientes fueron tomados del día 15 al 20 de iniciados los síntomas.

La sangre se centrifugó una vez formado el coágulo; el suero obtenido se distribuyó en alícuotas, en cuatro tubos ependorff, rotulados debidamente y almacenados en nitrógeno líquido hasta su uso.

El algoritmo de trabajo se resume en el anexo 4.

3.4 Técnicas de laboratorio

3.4.1 Métodos para la detección de anticuerpos contra virus *Dengue*

El ELISA de captura IgM y el ELISA IgG se les realizó a los 100 sueros pareados, mediante los estuches Virus IgM Capture DxSelect™ y Dengue IgG ELISA DxSelect™ de Focus Diagnostics (EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta técnica se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del HDV.

3.4.1.1 Definición de caso para Dengue

Caso probable de dengue: Todo paciente que presentó una enfermedad febril aguda de hasta siete días, de origen no aparente, acompañada de dos o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retroocular, mialgias, artralgias, postración, exantema, y que además tuviera antecedente de desplazamiento (hasta 15 días antes del inicio de síntomas) o que residiera en área endémica de dengue.

Caso confirmado de dengue: Caso probable de dengue, dengue grave, o mortalidad por dengue confirmado por alguno de los criterios de laboratorio para el diagnóstico (prueba serológica IgM para dengue).

Caso primario de dengue: Cuando el ELISA IgM del suero agudo era positivo y la IgG negativa, y en el segundo suero la IgM se mantenía positiva y seroconvertía la IgG.

Caso secundario **para dengue:** Cuando el ELISA IgM del suero agudo era positivo o indetectable y la IgG mostraba positividad y en el segundo suero la IgM aumentaba y la IgG seguía mostrando el mismo comportamiento (INS., 2010).

3.4.2. Métodos para la detección de anticuerpos contra *Leptospira* sp.

Para la detección de los casos de leptospirosis se usó la MAT, técnica serológica de referencia internacional, referida por la OMS y la Sociedad Internacional de Leptospirosis (Faine *et al.*, 2003). La técnica se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas y Brucelas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” en La Habana, Cuba (LNREB-IPK).

Se siguió el protocolo descrito en el Procedimiento Normalizado de Operaciones PNO-LNEB-06. La tabla 1 muestra las especies, los serogrupos y serovares usados en la técnica.

Tabla 1. Relación de las especies, los serogrupos y serovares de leptospirosis, empleados en la técnica de referencia internacional MAT.

Especie	Serogrupo	Serovar
<i>Leptospira interrogans</i> ss	Australis	Australis
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis
<i>Leptospira interrogans</i> ss	Bataviae	Bataviae
<i>Leptospira interrogans</i> ss	Canicola	Canicola
<i>Leptospira kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri
<i>Leptospira noguchii</i>	Panama	Panama
<i>Leptospira interrogans</i> ss	Pyrogenes	Pyrogenes
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe
<i>Leptospira biflexa</i>	Semarang	Patoc

Fuente: PNO-LNEB-06 del LNREB-IPK.

El incremento en dos diluciones del título del segundo suero, respecto al primero, indicó un resultado positivo (Faine *et al.*, 2003; Obregón, 2009). Las muestras reactivas a dos serogrupos con títulos iguales fueron consideradas como coaglutinaciones (OIE., 2014).

3.4.2.1 Definición de caso para leptospirosis

Caso Confirmado por laboratorio: Paciente con signos o síntomas compatibles con el caso sospechoso que fue confirmado por alguno de los siguientes criterios de laboratorio:

- Seroconversión en muestras pareadas mediante MAT (Faine *et al.*, 2003).
- Títulos de MAT mayores o iguales a 160 en la primera muestra (Obregón, 2009).

3.4.3 Métodos para la detección de anticuerpos contra *Hantavirus*

El ELISA de captura para IgM y el ELISA para IgG se llevaron a cabo en el IIBT. Se usaron los estuches Hantavirus IgM Dx Select™ y Hantavirus IgG DxSelect™ de Focus Diagnostics (EUA) que utilizan como antígeno al VSN.

La prueba se realizó a los sueros pareados, según instrucciones del proveedor.

3.4.3.1 Definición de caso para hantaviriosis

Caso confirmado: Paciente con antecedente de síndrome febril inespecífico, con fiebre mayor de 38° C sin etiología definida, acompañado de alguno de los siguientes signos y síntomas: mialgias, escalofríos, astenia, cefalea o dolor abdominal y que en las seis semanas previas al inicio de los síntomas haya estado expuesto al contacto con roedores, y que cumple con uno de los siguientes criterios de laboratorio:

- Presencia de anticuerpos IgM específicos contra hantavirus, o seroconversión o un incremento de cuatro veces o mayor en los títulos de anticuerpos IgG en el ELISA (CDC, 2015).

3.4.4 Métodos para la detección de *Rickettsia*

3.4.4.1 Detección de anticuerpos IgG contra *Rickettsias* del grupo de las fiebres manchadas.

La IFI IgG para los sueros agudos y convalecientes de los pacientes se llevó a cabo en el IIBT. Se utilizaron láminas antigenadas con *R. parkeri* (donadas por el Dr. Marcelo Labruna de la Universidad de Sao Paulo, Brasil) con el fin de titular anticuerpos de tipo IgG contra rickettsias del Grupo de las Fiebres Manchadas, se empleó el conjugado Anti-Human IgG (Fc specific)-FITC (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA). Se siguió el protocolo establecido por la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas (UTMB.,2013). Se interpretó como resultado positivo cuando se observaron rickettsias fluorescentes en dilución $\geq 1:64$ (punto de corte).

3.4.4.1.1 Definición de caso para rickettsiosis

Caso probable para Rickettsiosis: Todo paciente febril con uno o más de los siguientes signos o síntomas: Exantema, alteración de la biometría hemática (trombocitopenia, leucocitosis, neutrofilia, elevación de las transaminasas), mialgias, datos digestivos (dolor abdominal, náusea o vómito), signos neurológicos, manifestaciones hemorrágicas o antecedente de mordedura por garrapata.

Caso confirmado: Cualquier caso probable con confirmación de laboratorio: evidencia serológica de elevación de IgG por IFI (Field *et al.*, 2011).

3.5 Asociación de las variables clínicas y epidemiológicas con las etiologías estudiadas

La información de las encuestas se introdujo en bases de datos diseñadas para el efecto, con el empleo del programa Excel (Microsoft Office). El programa SPSS versión 21 se utilizó para el análisis estadístico. Se calculó media y desviación estándar a las variables cuantitativas y a las cualitativas medidas de frecuencia absoluta y relativa. La comparación entre los grupos se hizo mediante la prueba χ^2 ; se utilizó el odds ratio (OR) como fuerza de asociación con sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC 95%) y el valor de p. Se aceptó un nivel de significancia $p < 0,05$.

Las variables clínicas que se analizaron fueron los signos y síntomas como: la cefalea, las mialgias, artralgias, vómito, dolor abdominal, presencia de exantema, dificultad respiratoria, dolor retroocular y diarrea.

Las variables epidemiológicas que se analizaron fueron: el tener contacto con ratas y ratones, el contacto con ganado vacuno, contacto con garrapatas, tener mascotas, tener contacto con animales enfermos, actividades acuáticas, exposición a inundaciones, contacto con aguas estancadas, fuente de agua, forma de almacenar el agua, presencia de alcantarillas, disposición de basuras, tiempo de recolección de basuras, antecedente de familiar con dengue y desplazamiento del paciente entre municipios.

3.6 Muestreo de garrapatas en animales domésticos y en vegetación

Las garrapatas se recolectaron mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia entre los años 2013 y 2014, a partir de animales domésticos (caninos, bovinos y equinos) de seis municipios del Meta (Acacias, Puerto Gaitán, Puerto López, Restrepo, Cumaral, Villavicencio). En la capital, Villavicencio, se recolectaron garrapatas en seis veredas pertenecientes al área rural (El Carmen, Servitá, Pipiral, Barcelona, Cocuy, La Cecilia) y en barrios del área urbana. La captura se realizó sobre el hospedero (fase parasítica) de forma manual y con pinzas entomológicas.

Para la recolección de garrapatas sobre vegetación o en vida libre (fase no parasítica), se utilizaron los métodos de arrastre y bandereo (Terassini *et al.*, 2010) en zonas de potrero y matorrales (única por cada sitio de muestreo).

Las garrapatas capturadas se depositaron en tubos plásticos de 1,5 ml con alcohol al 70% y rotulados individualmente, teniendo en cuenta el hospedero animal o sitio en el cual se realizó la captura. Las garrapatas se enviaron al IIBT de la Universidad de Córdoba, donde se realizó su identificación por género y especie con el empleo de claves taxonómicas fenotípicas (Barros-Battesti *et al.*, 2006) y la detección y caracterización molecular de las rickettsias.

3.6.1 Preparación de las garrapatas para extracción de ADN de *Rickettsia*

Las garrapatas se prepararon según el protocolo diseñado por el IIBT:

- 1) Se sacaron las garrapatas del tubo con alcohol y se colocaron sobre un papel de filtro. Se agregó el alcohol del tubo sobre las garrapatas y se procedió a

triturarlas con una cuchilla estéril. Una vez trituradas, se colocaron nuevamente al tubo seco.

- 2) Se preparó el baño de agua a 56°C, se colocaron los tubos abiertos con las garrapatas trituradas durante 20 minutos, para que el alcohol restante se evaporara.
- 3) Se adicionaron 250 µl de PBS al 1x a cada tubo con los macerados de garrapatas.
- 4) El extremo puntiagudo de una punta azul de pipeta automática de 1000 µl se quemó en la llama de mechero para sellarla y con esta se maceraron las muestras hasta que tuvieron un aspecto lechoso, sin dejar pedazos grandes de garrapatas. El macerado se utilizó para el procedimiento de extracción de ADN.

3.6.1.1 Detección molecular de *Rickettsia* sp.

Para la extracción del ADN se utilizó el estuche comercial de Purelink DNA mini kit (Invitrogen, California) y se siguieron las recomendaciones del proveedor. El ADN purificado se conservó a -20°C hasta su uso.

3.6.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real para detección del gen *gltA* de *Rickettsia* sp.

Las muestras obtenidas del proceso de extracción fueron analizadas por PCR en tiempo real (PCR-RT), en un termociclador LightCycler 1.5 de tres canales (530, 640 y 705) de la casa comercial Roche. Se utilizaron los iniciadores CS-5 (5'-GAG AGA AAA TTA TAT CCA AAT GTT GAT-3) y CS-6 (5'-AGG GTC TTC GTG CAT

TTC TT-3), descritos por Labruna *et al.*, (2004). Estos iniciadores son específicos para un fragmento de 147 pb del gen *gltA*, que se encuentra en todas las especies del género *Rickettsia* sp. y codifica la enzima citrato sintetasa. Adicionalmente, se empleó una sonda de hidrólisis (6-FAM–CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT-BHQ-1), cuyo análisis de detección en la emisión de luz de la longitud de onda fue realizada en el canal de 530 del termociclador.

La mezcla de reacción de PCR se preparó a un volumen final de 20 µL. Cada reacción presentó los siguientes componentes: 4 µL de Master TaqMan (compuesta por FastStar Taq ADN polimerasa, dNTPs y MgCl₂ en concentración óptima) (Roche Diagnostic, Applied Science, Mannheim, Alemania), 0,6 µL de cada uno de los iniciadores [0,5 µM]; 1 µL de sonda [0,2 µM]; 8,8 µL de agua calidad biología molecular y 5 µL de muestra de ADN. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos. Un ciclo final de 40°C por 30 segundos.

3.6.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa convencional para detección de genes *gltA*, *ompB* y *ompA* de *Rickettsia* sp.

Las muestras positivas por PCR-RT fueron amplificadas posteriormente por PCR convencional, se usaron los iniciadores CS-78 y CS-323 que amplifican un fragmento de 401 pb del gen *gltA*. Así mismo, se utilizaron los iniciadores 120.2788 y 120.3599 que amplifican un fragmento de 811 pb del gen *ompB* que se encuentra en la mayoría de especies de *Rickettsia*; y los iniciadores Rr190-70 y 190-701 que amplifican un fragmento de 631 pb del gen *ompA*, el cual se

encuentra solo en las especies que pertenecen al grupo de las fiebres manchadas. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para PCR convencional se describen en la tabla 2, así como las condiciones para los programas de amplificación.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos y condiciones de amplificación para los genes *gltA*, *ompA* y *ompB*.

Gen y Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	Condiciones de amplificación			Tamaño del fragmento (pb)	Fuente
<i>Gen gltA</i>	95°C	3 min	1 ciclo	401	Labruna <i>et al.</i> 2004
CS78	95°C	15 seg			
5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3'	48°C	30 seg	40 ciclos		
CS323	72°C	30 seg			
5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3'	72°C	7 min	1 ciclo		
<i>Gen OmpA</i>	95°C	3 min	1 ciclo	631	Roux 1996
Rr 190.70	95°C	30 seg			
5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3'	50°C	30 seg	40 ciclos		
190-701	63°C	1 min			
5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3'	72°C	7 min	1 ciclo		
<i>Gen OmpB</i>	95°C	2 min	1 ciclo	811	Roux 2000
120.2788	95°C	30 seg			
AAACAATAATCAAGGTAAGT	50°C	30 seg	40 ciclos		
120.3599	68°C	1:30 seg			
TACTTCCGGTTACAGCAAAGT	68°C	7 min	1 ciclo		

Las reacciones de PCR para la amplificación de los diferentes genes se prepararon de acuerdo a los protocolos de identificación de *Rickettsia* del IIBT. Las mezclas de reacción se prepararon a volúmenes finales de 50 µL, se utilizaron los componentes que se indican en las tablas 3, 4 y 5. Para la amplificación, se utilizó la enzima *Taq* ADN polimerasa recombinante (GenTaq, Colombia). La PCR se

desarrolló en un termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc, Watertown, USA). Para cada reacción se incluyeron un control negativo (agua grado biología molecular) y un control positivo (ADN de *R. amblyommii* proporcionada por el IIBT).

Tabla 3. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados en PCR convencional para la detección del gen *gltA* con los iniciadores CS78-CS323.

Componentes	Volumen por reacción (V. final 50µL)	Concentración inicial del reactivo	Concentración final del reactivo en la reacción
Buffer	5,0 µL	10 X	1X
MgCl ₂	3,0 µL	25 mM	2 mM
dNTP	1 µL	10 µM	0,2 µM
<i>Taq</i> polimerasa	0,29 µL	5 unid/ µL	2,5 U
<i>CS78 Forward</i>	2 µL	20 µM	0.8 µM
<i>CS323 Reverse</i>	2 µL	20 µM	0,8 µM
Agua	31,75 µL		
ADN	5 µL		
Volumen final	50 µL		

Tabla 4. Concentraciones de reactivos utilizados en PCR convencional para la detección del gen *ompA* con los iniciadores Rr190.70 y 190-701.

Componentes	Volumen por reacción (V. final 50µL)	Concentración inicial del reactivo	Concentración final del reactivo en la reacción
Buffer	5,0 µL	10 X	1X
MgCl ₂	3,0 µL	25 mM	2,5 mM
dNTP	1 µL	10 µM	0,2 µM
<i>Taq</i> Polimerasa	0,29 µL	5 unid/ µl	4 U
<i>Rr 190.70 Forward</i>	2 µL	20 µM	0.6 µM
<i>190.701 Reverse</i>	2 µL	20 µM	0,6 µM
Agua	31,71 µL		
ADN	5 µL		
Volumen final	50 µL		

Tabla 5. Concentraciones de reactivos utilizados en la PCR convencional para la detección del gen *ompB* con los iniciadores 120.2278 y 120.3599.

Componentes	Volumen por reacción (V. final 50µL)	Concentración inicial del reactivo	Concentración final del reactivo en la reacción
Buffer	5,0 µL	10 X	1X
MgCl ₂	3,0 µL	25 mM	2,5 mM
dNTP	1 µL	10 µM	0,2 µM
<i>Taq</i> polimerasa	0,29 µL	5 unid/ µl	5 U
120-2788 <i>Forward</i>	2 µL	20 µM	0.8 µM
120-3599 <i>Reverse</i>	2 µL	20 µM	0,8 µM
Agua	31,71 µL		
ADN	6 µL		
Volumen final	50 µL		

3.6.1.4 Visualización de los productos amplificados

Para la visualización de los productos amplificados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Posteriormente, los geles se examinaron en un transiluminador (BioRad, CA, EUA). El tamaño de los amplicones se determinó por comparación con el marcador de peso molecular de escalera de 100 pb (Invitrogen, CA, EUA).

3.6.1.5 Secuenciación de los productos amplificados

Los productos de las PCR se purificaron mediante el empleo del estuche de extracción PureLink™ Quick Gel (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones de la casa manufacturera. Las secuenciaciones se llevaron a cabo en MacroGen Inc en Corea y los análisis filogenéticos se realizaron con MEGA (molecular evolutionary genetics analysis) versión 6; las secuencias resultantes se compararon con las depositadas en el GenBank (GenBank/EMBL/DDBJ)

mediante la herramienta BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (Tamura *et al.*, 2013).

3.7 Análisis estadístico

Para el análisis de la información se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 21. Se utilizaron medidas de estadística descriptiva e inferencial, con lo cual se realizó la asociación de variables con sus respectivos intervalos de confianza (nivel de confiabilidad de 95%).

3.8 Aspectos éticos

El protocolo de esta investigación fue aprobado por el comité de investigaciones del HDV y por la Comisión Científica Especializada de Microbiología del IPK.

Las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y la manipulación de muestras biológicas se cumplieron, de acuerdo a los niveles de riesgo establecidos por el Ministerio de Protección Social (MinSalud., 2011).

La información se conservó con carácter confidencial. No se reveló la identidad de los individuos de los que se recibieron muestras clínicas para su estudio. Los resultados de las pruebas de laboratorio se enviaron exclusivamente a los médicos de asistencia que solicitaron los análisis y solo se utilizaron por el equipo de investigación con fines científicos.

Se obtuvo el consentimiento informado de los individuos para participar de manera voluntaria y gratuita en la encuesta epidemiológica y la toma de muestras en el laboratorio, previa explicación en un lenguaje sencillo y claro de cómo se realizaría el mismo, su importancia y los beneficios que proporcionaría para el conocimiento

de las etiologías a investigar. Los datos de los participantes se mantuvieron bajo estricta confidencialidad, solo accesibles al investigador principal del estudio. En niños menores de edad el consentimiento lo firmó un acudiente.

Durante la recolección de garrapatas se garantizó la conservación y protección de la fauna.

Toda la información de esta investigación se encuentra conservada y protegida en el IIBT y el IPK.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características sociodemográficas

De acuerdo con los criterios definidos en el presente estudio, se presentaron 286 pacientes para toma del suero en periodo febril agudo, pero solo pudieronarse 100 de las muestras, ya que el resto de los individuos abandonó el estudio. La distribución por procedencia de estos 100 pacientes con síndrome febril agudo no palúdico que ingresaron al HDV correspondió a: 72 (72%) Villavicencio, 5 (5%) Acacias, 3 (3%) Puerto Gaitán, 3 (3%) Puerto López, 3 (3%) Granada, 3 (3%) Cumaral, 2 (2%) Restrepo, 2 (2%) San Martín, 2 (2%) El Castillo, 1 (1%) Guamal, 1 (1%) Fuente de Oro, 1 (1%) Castilla, 1 (1%) Pachaquiario y 1 (1%) Vista Hermosa. Estas personas fueron remitidas de los centros de salud del municipio correspondiente.

El 51% (51) de los pacientes pertenecía al sexo femenino y el 49% (49) al sexo masculino. No se encontró diferencia entre el número de pacientes de sexo femenino con SFA y los de sexo masculino, aunque los estudios internacionales siempre han mostrado una mayor incidencia en el sexo masculino que en el femenino, con una razón hombre: mujer que oscila entre 2,5 y 1,5:1 (Guha *et al.*, 2005).

En cuanto a la distribución de los pacientes por grupos etarios, el 29% (29) de la población se ubicó en edades de 5 a 13 años, el 38% (38) de 14 a 26 años y el

33% (33) de 27 a 65 años. La población que más acudió al servicio de urgencias por SFA correspondió a la de 14 a 26 años, tal vez por ser el grupo que tiene exposición más prolongada dadas las actividades escolares y vida social. Estos resultados discrepan con lo observado en el Urabá antioqueño donde los grupos etarios más frecuentes fueron los de 30 a 40 años, al igual que en los estados de Baja California en México donde la mayor proporción de los pacientes (39%) correspondió al grupo de 25 a 44 años de edad (Arroyave *et al.*, 2013; Navarrete *et al.*, 2015).

4.2 Detección serológica de dengue y leptospirosis

De los casos con SFA no palúdico que ingresaron al estudio, el 44% se diagnosticó con dengue y el 29% con leptospirosis (figuras 3 y 4), existiendo casos de coinfección, que se analizarán mas adelante.

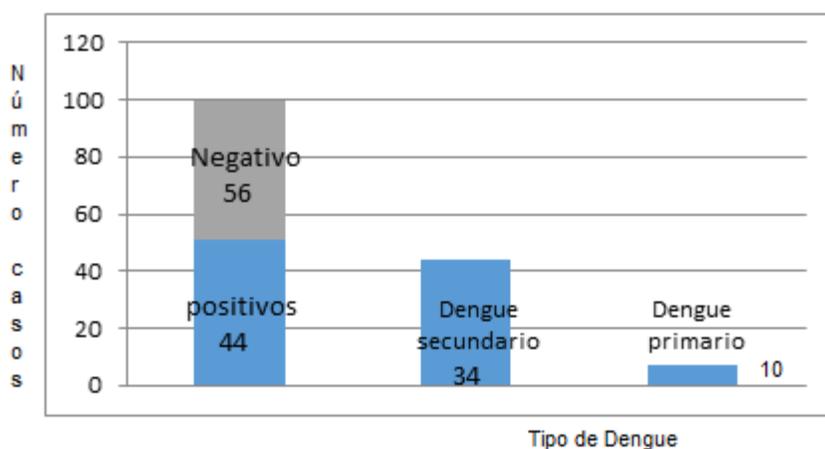


Figura 3. Seroprevalencia de Dengue en los pacientes con síndrome febril agudo no palúdico

Respecto a la etiología probable del SFA no palúdico de pacientes que consultaron al HDV durante el periodo de estudio, el dengue constituyó una causa importante, lo cual coincide con los reportes de incidencia de esta enfermedad. Vale la pena mencionar que el dengue es considerada una enfermedad

endemoepidémica en el país y su tendencia en los últimos 10 años es de aumento, al pasar de 22 775 casos registrados en el año 2000, a más de 150 000 casos en el 2010. Esta situación corrobora que en el país, el dengue es una seria preocupación para la salud pública (Arroyave *et al.*, 2013).

Durante los años 2013 y 2014, el 76,1% de los casos de dengue en Colombia procedió de 10 entidades territoriales: Tolima, Valle, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Meta, Cesar, Huila, Antioquia y Putumayo (INS, 2013).

La población urbana es la que más está en riesgo de contraer dengue y precisamente Villavicencio es el centro urbano y comercial por excelencia de la región de la orinoquia (Padilla., 2012). Esto condiciona que su población esté más expuesta a condiciones que favorecen el desarrollo del vector del virus del Dengue y con esto se incrementa el riesgo de contraer esta infección. Esta situación alerta sobre la necesidad de mejorar y fortalecer el sistema de vigilancia del dengue, sobre todo en las cabeceras municipales. La urbanización desordenada de estas localizaciones crea el ambiente propicio para la reemergencia y diseminación de esta y otras enfermedades.

De los 44 casos positivos para dengue, 34 mostraron ser dengues secundarios lo que aumenta el riesgo para la evolución clínica a dengue grave, ya que estudios anteriores han demostrado que en este cuadro se exagera la activación y liberación de citocinas, lo que se relaciona con la mayor gravedad del cuadro clínico (Guzman *et al.*,2006). No hubo diferencia entre la proporción de hombres (23) y mujeres (21) que presentaron dengue y el grupo etario que presentó esta etiología fue fundamentalmente el de 14 a 26 años.

En la presente investigación no se pudo determinar los serotipos de virus *Dengue* circulantes en la región en el periodo de estudio.

En cuanto a la leptospirosis, es importante mencionar que dentro de la batería de serovares que se trabajó no estaba disponible el serovar *Icterohaemorrhagiae*. La leptospirosis fue una causa importante del SFA en el departamento del Meta, principalmente frente al serovar *Canicola* (11/29), seguido del serovar *Ballum* (6/29) (figura 4). Se presentaron coaglutinaciones en ocho casos seropositivos (38,09%), fundamentalmente entre los serovares *Canicola* y *Ballum*, en los que no se pudo determinar el probable serogrupo infectante. Según Agudelo *et al.* en el Urabá antioqueño la coaglutinación más frecuente fue la de los serovares *Grippityphosa* e *Icterohaemorrhagiae* (Agudelo *et al.*, 2007).

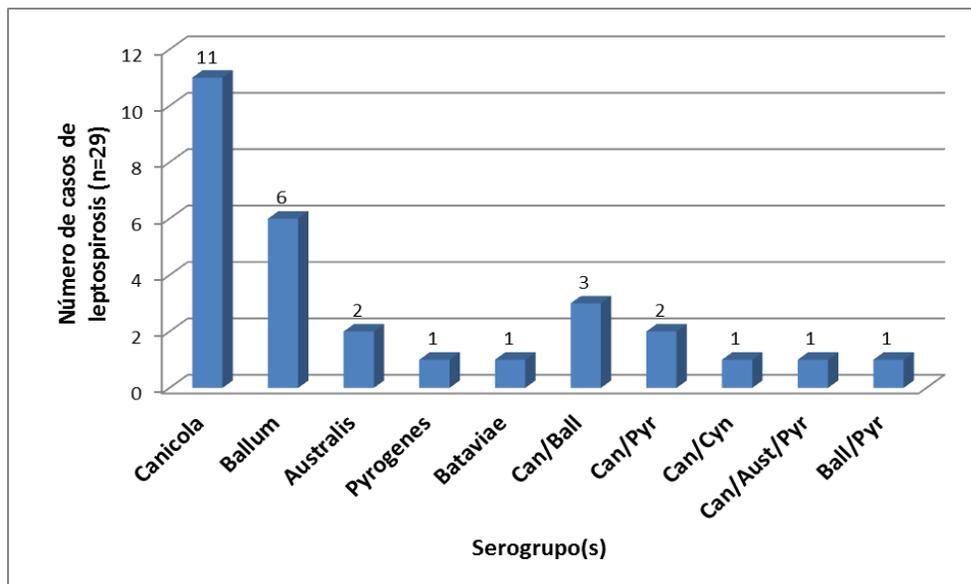


Figura 4. Número de casos de leptospirosis y probables serogrupos infectantes en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico

Estas coaglutinaciones suelen deberse, según algunos autores, a la infección por más de un serovar patógeno (Siuce *et al.*, 2015) o a reacciones cruzadas que

suelen presentarse en etapas tempranas de la enfermedad. Cabe resaltar que el cultivo es la única prueba que permite conocer realmente el serogrupo/serovar infectante, en los últimos años se ha incentivado el uso de esta prueba ya que además permite monitorear la aparición de nuevas cepas circulantes en una región (Jacob *et al.*,2015).

En un estudio publicado en 2013 donde se describe el comportamiento de la vigilancia epidemiológica de leptospirosis humana en Colombia entre 2007 y 2011, se reportan como serovares de mayor circulación a Australis (24,89%), Hebdomadis (9,33%), Sejroe (8%) e Icterohaemorrhagiae (7,56%). También se destacan los departamentos/distritos con mayor incidencia de la enfermedad, donde los cinco principales, en orden descendente, fueron: Guaviare (267,3 casos x 100 000 habitantes), Risaralda (46,4 casos x 100 000 habitantes), San Andrés (45,4 casos x 100 000 habitantes), Santa Marta (36,9 casos x 100 000 habitantes) y Barranquilla (27,2 casos x 100 000 habitantes) (Bello *et al.*, 2013).

Hasta el momento se conocen solo dos estudios sobre la seroprevalencia de la leptospirosis en el departamento del Meta, más específicamente en el municipio de Villavicencio en población de riesgo no sintomática. En ambos se determinó que los serogrupos más prevalentes en esta región son: Bratislava 24%, Australis 8%, Copenhageni 6%, Canicola 3%, Autumnalis y Hardjoprajitno 1% (Quitian *et al.*, 2009; Góngora *et al.*, 2008).

Los serogrupos Canicola y Ballum generalmente se realacionan con perros y ratas como principales reservorios, y precisamente según información colectada con las encuestas en esta investigación 8 (27,58%) de los pacientes con leptospirosis,

reportó haber visto ratas o ratones dentro de la vivienda y 19 (65,5%) manifestaron tener mascotas principalmente perros. Ello permite inferir que los mamíferos relacionados con estos serogrupos juegan un papel importante en la epidemiología de esta enfermedad en el departamento del Meta, dado que los roedores y canes pueden estar contaminando el agua de pozos, ríos, lagunas y convertirse en la forma más frecuente de contraer la infección por leptospiras (Cespedes *et al.*, 2007).

La mayoría de los estudios sobre la seroprevalencia de la leptospirosis en Colombia se realizaron en animales (Bermudez *et al.*, 2010). Aquellos que comprendieron a los humanos se hicieron en poblaciones expuestas a factores de riesgo. En este último caso, se detectaron anticuerpos contra leptospiras en el 13,1% y 22,4% de las personas evaluadas (Bermudez *et al.*, 2010; Ferro *et al.*, 2016).

La positividad a leptospirosis y dengue encontrada en este trabajo es superior a la reportada por Troyes *et al.*, al estudiar la etiología del SFA (incluyendo malaria) en la provincia de Jaen en Perú, quienes obtuvieron 11,1% de positividad a leptospirosis y 10,1% a dengue (Troyes *et al.*, 2006).

Los resultados del presente estudio constituyen el primer reporte de leptospiras como agente causal de SFA no palúdico en el Meta; no es sorprendente que la leptospirosis forme parte de la etiología del SFA en la población de estudio, ya que está catalogada la zoonosis de mayor distribución y prevalencia a nivel mundial, de predominio en zonas tropicales y subtropicales (como lo es el

departamento del Meta), y causa frecuente de fiebre de origen indeterminado (Hartskeerl *et al.*, 2011). Los resultados de la prevalencia de leptospirosis muestran que esta enfermedad es subregistrada en la zona, por lo que se recomienda que se incluya en el diagnóstico diferencial de los SFA.

4.3 Detección de anticuerpos contra *Hantavirus* y *Rickettsia*

El presente estudio permitió demostrar, por pruebas serológicas, la circulación de hantavirus y rickettsias en el departamento del Meta. El 3% de los pacientes resultó positivo para hantavirosis y el 1% a rickettsiosis (figuras 5 y 6). En algunos pacientes se evidenció reactividad sin cambios en el nivel de títulos de anticuerpos.

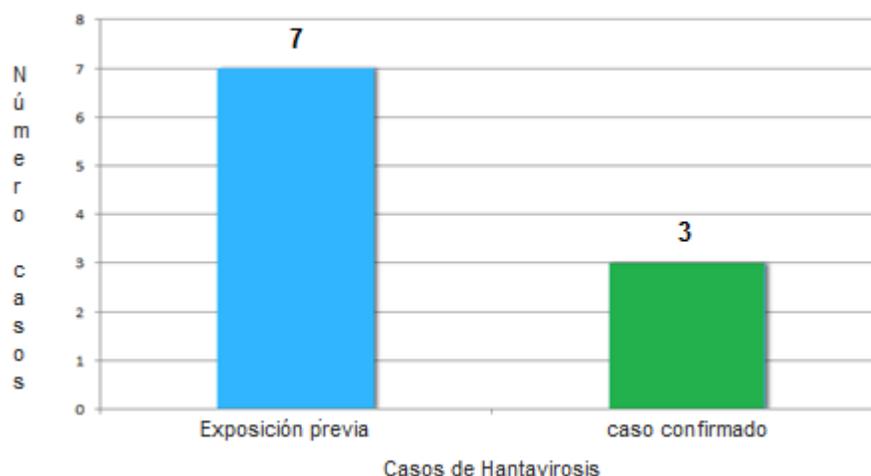


Figura 5. Casos de exposición previa y casos confirmados de infección por Hantavirus en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico

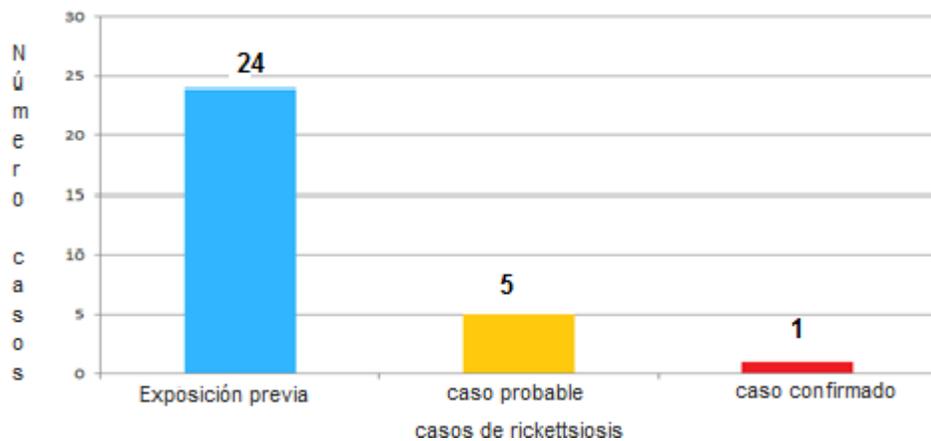


Figura 6. Casos probables, exposición previa y caso confirmado de rickettsiosis en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico

Para hantavirus, otro 7% (7) de los pacientes presentó exposición previa al agente al no mostrar seroconversión a IgG, mientras que para rickettsias se observó que el 5% (5) presentó títulos elevados de anticuerpos en ambos sueros, tanto en la fase aguda como en la convaleciente, los que se clasificaron como casos probables; el 24% (24) presentó títulos bajos sin cambio, valores que apuntan únicamente a exposiciones previas al agente.

Estos hallazgos son similares a los reportados por otros países de la región. En Argentina de 1 386 muestras de suero estudiadas, 81 fueron confirmadas por detección de IgM e IgG en la primera muestra, 7 mostraron presencia de IgM y ausencia de IgG y 5 fueron confirmadas por seroconversión mediante ELISA (Iglesias *et al.*, 2016). De igual forma en Brasil, el diagnóstico de esta etiología se realiza por medio de la seroconversión del ELISA-IgG, y durante 1999 se confirmaron 28 casos de SPH (Ferreira *et al.*, 2000).

La revisión de las historias clínicas de los casos serológicamente confirmados, mostraron en común algunas características como que todos los pacientes tuvieron fiebre de más de 38,5°C, mialgias, artralgias, fatiga generalizada, náuseas, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, dolor abdominal y exantema. También se observó incremento del hematocrito, niveles elevados de creatinina y leucocitosis. De la misma forma Carvalho *et al.* reportó en Brasil la muerte de un paciente diagnosticado con SPH cuyos síntomas iniciales fueron dolor de cabeza, mialgias, artralgias, con trombocitopenia marcada (27 000), las transaminasas y la creatinina levemente elevadas (Carvalho *et al.*, 2014). En el presente estudio, en todos los pacientes los niveles de plaquetas bajaron significativamente (98 000, 24 000 y 29 000), hubo elevación leve de las enzimas hepáticas y ninguno de los pacientes presentó distress respiratorio, solamente signos respiratorios leves. Esta condición de la infección por Hantavirus la reportó previamente Armien *et al.* en Panamá y Mattar *et al.* en Colombia. En el primero de estos trabajos el 44% de los pacientes con SPH desarrollaron edema pulmonar sin distress respiratorio, y el 21 % no mostró evidencias de edema pulmonar (Armien *et al.*, 2011). El segundo trabajo constituye el primer reporte de infección por Hantavirus en Colombia y de forma coincidente el paciente no presentó insuficiencia respiratoria (Mattar *et al.*, 2014). Los hallazgos de hantaviriosis en el departamento del Meta demuestran la importancia de implementar la vigilancia de la infección por hantavirus, en pacientes que tengan exposición previa con roedores o sus excretas.

Colombia posee fronteras con países como Panamá, Venezuela y Brasil que reportan SPH. Este hecho sugiere la posibilidad de que en Colombia también circule Hantavirus ya que los roedores que actúan como reservorios del virus pueden traspasar las fronteras entre dichos países (Mattar *et al.*, 2014).

En relación a rickettsiosis, se diagnosticó en una niña de 8 años de edad que ingresó al servicio de urgencias del Hospital local de San Martín, departamento del Meta. La paciente procedía de área rural; arribó al hospital con historia de fiebre y cefalea de tres días de evolución que no resolvían con analgésicos, exantema de tipo macular en pies y manos, con extensión al tronco, hepatomegalia y dolor abdominal.

Se le practicaron pruebas serológicas para: Dengue (IgM), VIH 1-2, hepatitis A, B, C, citomegalovirus, Epstein Barr, *Leishmania* y *Toxoplasma gondii* que resultaron negativas. Inicialmente fue tratada con ampicilina–sulbactam durante dos días y luego con vancomicina–cefepime por tres días. La paciente no mostró mejoría y fue trasladada a Bogotá donde se le diagnosticó un síndrome hemofagocítico (SHF), paralelamente se le diagnosticó rickettsiosis mediante la IFI-IgG casera. La prueba mostró títulos de anticuerpos de 64 en el suero inicial y 1024 durante la fase convaleciente. La paciente recibió tratamiento con prednisolona 15 mg al día para el SHF y doxiciclina 100 mg cada 12 h por 7 días para la rickettsiosis. La paciente evolucionó de forma satisfactoria y se dio de alta hospitalaria.

El impacto causado por las rickettsiosis es considerable, debido a su elevada prevalencia en áreas endémicas; sin embargo, varios factores como la similitud

en la sintomatología clínica enmascaran el diagnóstico de la enfermedad con otros síndromes febriles tropicales, sumado a que las condiciones sanitarias inadecuadas, la pobreza, el hacinamiento y los conflictos sociales inciden en la aparición de esta enfermedad (Suárez *et al.*, 2008). El presente caso se diagnosticó de forma accidental, ya que la paciente de forma casual formó parte del presente estudio de SFA. Los resultados permitieron confirmar la infección por *Rickettsia* sp. del GFM, la cual posiblemente desencadenó el SHF.

Cinco pacientes fueron clasificados como casos probables de rickettsiosis, debido a que no alcanzaron la elevación de cuatro veces de los títulos de anticuerpos del suero en la fase convalesciente respecto a la primera muestra (figura 6). La sintomatología presentada por ellos fue inespecífica: fiebre, mialgias, artralgias, cefalea, exantema, trombocitopenia, leucocitos variables. Sin embargo, es de resaltar la evolución clínica favorable de la enfermedad en estos casos, ya que no se documentaron complicaciones o mortalidad, lo que es frecuente en la rickettsiosis por *R. rickettsii* (Lin *et al.*, 2012). Ello podría estar dado porque las infecciones se presentaron de forma asintomática o al comportamiento benigno de las mismas al ser causadas por otras especies de rickettsias del GFM menos patógenas que *R. rickettsii*, como se sugiere en relación a *R. amblyommii* (Walker., 2013).

De igual manera, llama la atención que el 24% de los pacientes con SFA que asistieron al HDV resultaron seropositivos pero no mostraron seroconversión lo que demuestra que tuvieron exposición previa al agente. Estos fueron

diagnosticados como dengue según su cuadro clínico; sin embargo, solo 10 de ellos (41,66%) mostraron evidencias serológicas de esta infección. Situación similar se presentó en el nordeste de Brasil, durante epidemias simultáneas de dengue y leptospirosis en centros urbanos; en ese estudio, la revisión de casos de hospitalizados por leptospirosis reveló que del 42% de los pacientes que acudieron a consulta en los tres primeros días de fiebre, 61% recibió el diagnóstico de dengue. Esto, a su vez, se asoció a retraso en la remisión a un hospital de mayor complejidad, así como a mayores probabilidades de ingreso en unidades de cuidados intensivos y probabilidades de muerte (Flannery *et al.*,2001).

Los resultados obtenidos sugieren coinfección en el 33,9% (19/56) de los casos que resultaron positivos para al menos una de la entidades estudiadas, y quedó distribuida de la siguiente manera: 28,57% (16/56) dengue-leptospirosis, 1,78% (1/56) rickettsiosis-leptospirosis y 3,57% (2/56) dengue-hantaviriosis-leptospirosis (figura 7). Al igual que en el estudio de Arroyave *et al.* la coinfección por dengue y leptospirosis fue la más frecuente. Esto podría explicarse porque ambas enfermedades suelen ser endémicas en áreas tropicales y son clínicamente indistinguibles en su presentación como SFA (Arroyave *et al.*, 2013). Estos hechos podrían justificar el subregistro de la leptospirosis, cuyo diagnóstico queda solapado por el del dengue.

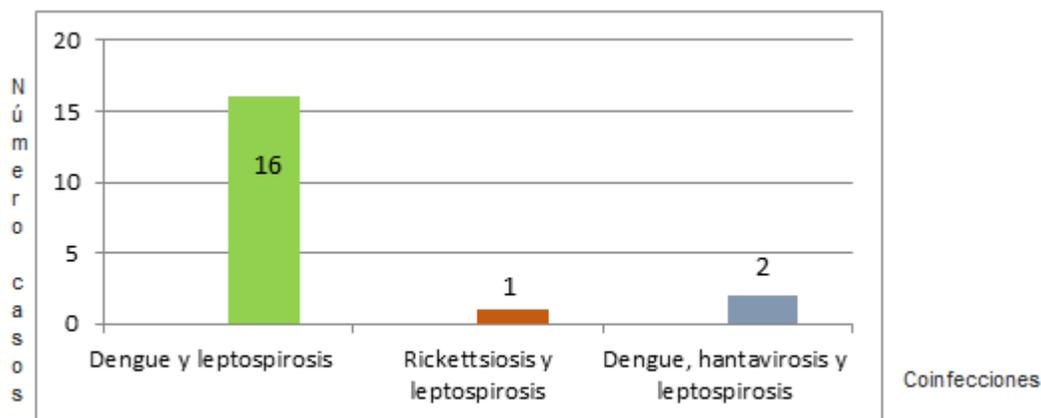


Figura 7. Coinfecciones que se presentaron en los pacientes con síndrome febril agudo

En el presente estudio el 44% de los pacientes quedó sin diagnóstico, similar a lo ocurrido en el Urabá antioqueño y en Jaen (Perú) donde en el 57,3 % y 34,2%, respectivamente, de los pacientes no fue posible determinar la causa etiológica (Arroyave *et al.*, 2013; Troyes *et al.*, 2006). En todos los casos mencionados el SFA podría deberse a patologías frecuentes en la zona y no investigadas como rubeola o fiebre tifoidea; sin embargo, no se deben descartar otras infecciones aún no investigadas en la población como influenza, arenavirus, entre otras (Troyes *et al.*, 2006). El número de pacientes con SFA sin diagnóstico es elevado y esto podría mejorarse con la búsqueda activa de casos a través de la vigilancia centinela en los hospitales.

Si bien la causa principal de fiebre en el departamento del Meta es el dengue, no se puede dejar de pensar en otras enfermedades.

El incremento de las poblaciones urbano-marginales, las transiciones demográficas, epidemiológicas, y la necesidad de realizar actividades económicas

de riesgo, han inducido a la urbanización de vectores y aparición de agentes transmisores de enfermedades.

En ese sentido, es importante destacar la vigilancia sindrómica como una forma de identificar nuevas enfermedades para ser capaces de responder a estas situaciones, mejorando la sensibilidad de la identificación y notificación de casos. Cuanto más rápida y oportuna sea esta identificación, las intervenciones que se puedan realizar serán mejores, se debe incluir por ende el fortalecimiento de capacidades de diagnóstico en los niveles locales, así como intervenciones de prevención y control (Mattar *et al.*, 2013., Troyes *et al.*, 2006).

En la tabla 6 se resume la información demográfica, clínica y diagnósticos probables de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 6. Características demográficas y clínicas de los pacientes con diagnóstico probable y confirmado de dengue, Hantavirus y rickettsiosis-GFM. F (femenino) y M (masculino); Edad (años); M (mialgias); A (artralgia); C (cefalea), V (vómito), Da (dolor abdominal); E (exantema); Dr (dolor retrocular); Hc (hiperemia conjuntival); D (diarrea); DiR (dificultad respiratoria)

Código del paciente	DATOS DEMOGRÁFICOS				Síntomas	Diagnóstico Probable
	sexo	edad	ocupación	procedencia		
1	M	11	estudiante	Villa/cio	C,M,V,E	Dengue
2	F	20	estudiante	Villa/cio	M,A,V,Da,E	Dengue, Leptospirosis
3	F	18	estudiante	Villa/cio	C,M,A, V,Da,Dr,D,E	Dengue
4	M	65	tractorista	Villa/cio	C,M,A,E	Leptospirosis
5	F	37	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,Da,Dr	Dengue
7	F	6	estudiante	Villa/cio	M,V,Da,E	
8	M	10	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da, DiR, Dr, E	Dengue, Leptospirosis
9	F	29	ama de casa	Villa/cio	C,M,Da,D	Dengue, leptospirosis
11	F	20	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D, Dr	Dengue
12	M	15	estudiante	Villa/cio	C,V,Dr	Dengue
14	M	16	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da	Dengue
18	F	32	comisionista	Villa/cio	C,M,A,V,D,Dr,DiR,E	Dengue, Hantavirus, leptospirosis
20	F	5	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dr,DiR,E	Leptospirosis
22	F	18	estudiante	Villa/cio	C,V,Da, D,Dr, DiR, E	Hantavirus
24	M	5	estudiante	Villa/cio	C,M,V,Da,D,Dr,DiR,E	Dengue
26	M	14	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,Dr,E	Dengue
28	M	48	medico	Villa/cio	C,M,A,Da,D,Dr,E	Dengue, Leptopirosis
29	M	44	medico	Villa/cio	C,M,A,D,Dr,E	Dengue, Leptospirosis
30	F	9	estudiante	Villa/cio	C,A,V,Dir, Dr	
31	F	21	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dr,DiR,E	Leptospirosis
34	M	8	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dir,Dr,E	Dengue, Leptopirosis
35	M	15	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dr,DiR,E	Dengue, Leptopirosis
37	M	34	bombero	Villa/cio	C,M,A,Dr	Dengue
38	M	16	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,D,Dr,E	Leptospirosis
39	M	20	conductor	Villa/cio	C,V,Da,D,Dr,DiR	Leptopirosis
42	M	56	constructor	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,Dr,DiR, E	Dengue, Hantavirus, leptopirosis
46	M	15	estudiante	Cumaral	V, D,Dr,E	Dengue
47	F	38	cocinera	Acacias	C,A,V,Da,Dr,DiR	
49	F	9	estudiante	Villa/cio	C,V,Dr	
58	F	19	estudiante	Villa/cio	C,V,Da,D	Dengue, leptospirosis
59	M	45	vaquero	Pto Gaitán	C,M,Dr,DiR,E	
61	M	33	varios	Acacias	C,M,Dir,Dr,E	Dengue, Leptopirosis
64	F	17	estudiante	Villa/cio	C,M,V,Da,D,DiR,Dr,E	Dengue, leptospirosis
73	F	65	ama de casa	Villa/cio	M,A	

Código del paciente	DATOS DEMOGRÁFICOS				Síntomas	Diagnóstico Probable
74	M	12	estudiante	Villa/cio	C,V,Da,E	
76	F	19	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,DiR,Dr	Dengue
77	F	15	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,Dr,E	Dengue, leptospirosis
79	M	11	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,E	Leptospirosis
80	M	30	agricultor	Villa/cio	C,M,A,Da,D,Dr,DiR,E	Dengue, leptospirosis
83	F	56	auxiliar cocina	Villa/cio	M,A,V,Da,D,Dr,DiR,E	Leptospirosis
86	F	21	mesera	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,Dr,E	Dengue, leptospirosis
90	M	65	agricultor	Pachaquiario	C,M,A,Da,DiR,Dr	
91	F	18	estudiante	Fuente de oro	C,M,V,Da,D,E	Leptospirosis
92	F	7	estudiante	Acacias	M,V,Da,Dr,E	Leptospirosis
93	M	13	estudiante	Castilla	C,V	Dengue, Leptospirosis
94	F	8	estudiante	San Martin	C,M,A,V,Da,D	
95	F	6	estudiante	Restrepo	C,M,A,Da,Dr,DiR,E	Dengue, Leptospirosis
96	M	32	comerciante	Villa/cio	A,E	Dengue, Leptospirosis
97	F	10	estudiante	Villa/cio	C,V,Dr	Dengue
101	F	20	estudiante	Acacias	C,M,A,V,Da,D,Dr,DiR,E	
102	F	22	estudiante	Villa/cio	C,M,V,Da	Dengue
103	F	21	independiente	Villa/cio	C,M,V,Da,DiR,E	
106	M	5	estudiante	Villa/cio	M,Da,Dr,E	
112	F	34	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,Dr,DiR,E	Dengue
114	M	13	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,Dr,E	Dengue
115	F	11	estudiante	Acacias	C,M,A,V,Da,E	
116	F	13	estudiante	Fuente de oro	C,M,A,V,Da,Dr,E	Dengue
117	F	10	estudiante	Cumaral	C,M,A,Dr,E	
120	M	22	independiente	Pto Gaitan	C,A,Dr,E	Dengue
121	M	18	estudiante	Granada	C,A,Dr,E	
122	M	5	estudiante	Vista Hermosa	C,A,V,Da,Dr	
123	M	5	Ninguna	Pto Lopez	C,M,E	
124	M	28	comerciante	Villa/cio	C,M,A,V,D	
125	M	24	ND	Villa/cio	C,M	
126	F	30	trabajadora social	Villa/cio	C,M,A,V,Dd,Dr,E	Dengue
128	F	18	Oficios varios	Granada	V,Da	
129	M	26	pasante	Pto Lopez	C,V,Da,E	
130	M	22	pasante	Guamal	C,A,V,Da,D,E	
131	F	20	estudiante	Villa/cio	C,M,A,Da,D,E	
132	F	17	pasante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dr,DiR,E	
133	M	24	trabajador sena	Villa/cio	C,M,A,E	
134	F	22	pasante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dir,Dr,E	
135	M	31	trabajador sena	Villa/cio	C,M,A,E	

Código del paciente	DATOS DEMOGRÁFICOS				Síntomas	Diagnóstico Probable
136	M	54	instructor	Villa/cio	C,M	
137	M	52	ing agrónomo	Villa/cio	C,E	
138	M	52	adm de Granja	Villa/cio	C,M,A,V,Da,Dr,E	
139	M	57	docente	Villa/cio	C,Da,E	
140	M	39	veterinario	Villa/cio	C,M,A,V,Dr,DiR,E	
141	M	29	operario de Maquina Agricola	Villa/cio	C,A,Da,Dr	
143	F	18	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,E	
144	M	24	estudiante	Villa/cio	C,M,Da	
146	F	5	estudiante	Villa/cio	C,Da,E	Dengue
150	M	20	Oficio varios	Villa/cio	C,M,Da,D	
151	F	6	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,DiR,E	
152	F	14	estudiante	Villa/cio	C,V,Da,D,Dr	Dengue
153	F	64	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,Da,D,DiR	Leptospirosis
154	F	22	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,V,Da	Dengue
200	F	8	estudiante	San Martin	C,M,A,V,Dr,E	Rickettsiosis, Leptospirosis
201	F	33	ama de casa	Cumaral	C,M,Da,Dr	
202	F	36	ama de casa	Granada	C,Da,Dr,E	
203	F	37	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D	
204	M	41	independiente	el castillo	C,M,Da,DiR,E	
205	F	16	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,DiR,Dr,E	
206	F	27	ND	Pto Gaitan	C,M,A,E	
300	F	34	ama de casa	Villa/cio	C,M,A,Dr,E	
301	M	5	estudiante	Villa/cio	C,M,A,V,Da,D,E	Dengue
302	M	11	estudiante	Villa/cio	C,M,D	Dengue
303	M	5	estudiante	Pto Lopez	C,M,D	Dengue
310	F	14	estudiante	Villa/cio	C,A,V,Da,D,Dr,E	Dengue
311	M	12	estudiante	Guamal	C,M,V,Da,D,Dr,E	Dengue

4.4 Asociación de las variables clínicas y epidemiológicas con las etiologías en estudio

El análisis de regresión logística demostró asociación entre el diagnóstico de dengue y presentar diarrea (anexo 5). Esto fue previamente sugerido por Cortés *et al.* quienes observaron que los pacientes con dengue frecuentemente

presentaban diarrea, lo que podría indicar que el tracto gastrointestinal también es blanco de esta infección (Cortés *et al.*, 2016).

Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes de los cuatro diagnósticos, se destacaron la cefalea y las mialgias con 91% y 74%, respectivamente, seguidos de artralgias, dolor abdominal, exantema y dolor retroorbital (figura 8). De manera similar, Troyes *et al.* encontraron en Perú que los signos y síntomas más frecuentes en los pacientes con SFA diagnosticados con dengue, leptospirosis y rickettsiosis fueron escalofríos, cefalea, seguidos de malestar general, dolor retroorbital y mialgias (Troyes *et al.*, 2006). Es importante recordar que ciertos síntomas pueden acompañar la enfermedad, pero no ser marcadores de ella (Cortés *et al.*, 2016).

De otro lado, se encontró asociación entre la infección por leptospiras y la presencia de diarrea y dolor retroocular. Los pacientes con coinfecciones de dengue y leptospirosis mostraron asociación con la presencia de mialgias, exantema, dificultad respiratoria y diarrea. Por su parte las coinfecciones con hantavirus, leptospiras y rickettsias, se distinguieron por asociarse a dificultad respiratoria. En el estudio realizado en el Urabá antioqueño las mialgias (principalmente en las pantorrillas) se asociaron a la leptospirosis y la cefalea a la rickettsiosis. De igual forma, en el presente trabajo, la paciente con rickettsiosis sufrió de cefalea constante y aunque no se puede hablar de asociación por tratarse de un solo caso, esta fue un síntoma relevante en el caso.

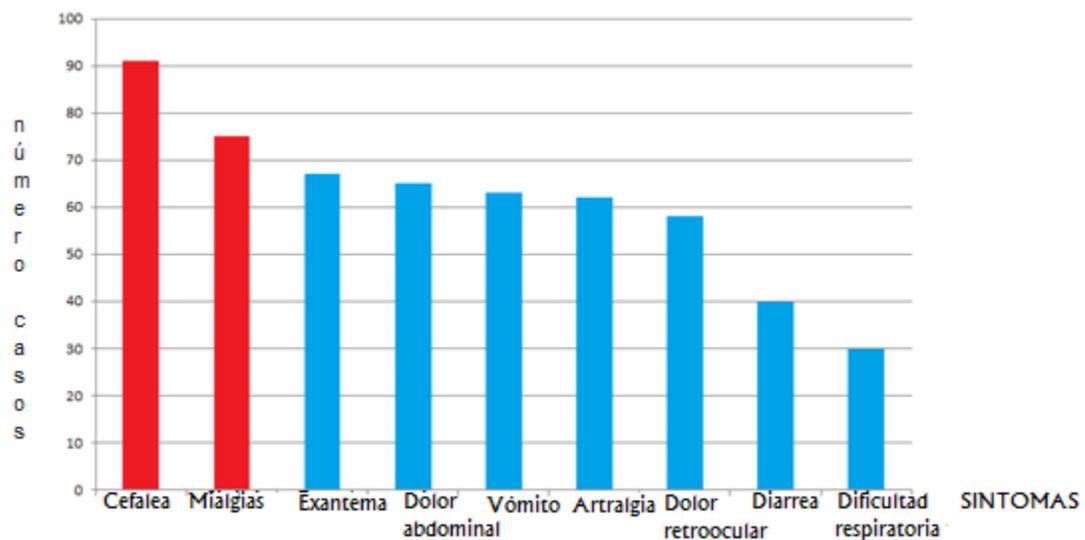


Figura 8. Características clínicas de la población estudiada

Entre los factores asociados a las etiologías estudiadas, se encontró que la edad promedio fue mayor en los pacientes que presentaron infección por hantavirus. En este trabajo, la edad promedio de los pacientes diagnosticados con hantaviriosis fue de 33,3 años. Dos de los tres pacientes con hantaviriosis presentaron coinfección con dengue y leptospira y el edema pleural se presentó en el paciente no coinfectado. Vale la pena aclarar que en Colombia las coinfecciones con flavivirus y leptospiras son comunes, ya que es un país endémico para estos agentes. De forma similar Navarrete *et al.* encontraron en México que la relación entre la presencia de anticuerpos contra ambas infecciones fue de 3,4% y que así mismo, los grupos estudiados que presentaron la mayor prevalencia de anticuerpos contra leptospiras también presentaron la mayor proporción de individuos positivos para dengue (Navarrete *et al.*, 2006).

A la leptospirosis y a la infección por hantavirus se asoció la tenencia de mascota, principalmente perro, y el contacto con aguas estancadas, lo que soporta que los

probables serovares de leptospiras infectantes encontrados con mayor frecuencia fueran Canicola y Ballum, ya que estos están asociados a reservorios como perros y ratas, respectivamente. Vargas *et al.* en pacientes con síndrome febril en Ayacucho, Perú encontraron a los serovares Icterohaemorrhagiae y Djasiman como los más prevalentes y una fuerte asociación con la presencia de roedores (ratas) en las viviendas, además relacionan el caminar descalzo como un factor de riesgo que favorece la posibilidad de infección por el patógeno (Vargas *et al.*, 2008).

En la provincia Madre de Dios en Perú, las características de la vivienda, como el techo de plástico y paja, así como el consumo de agua de río en el hogar, consumo de agua de río en el campo y contacto con perros, estuvieron asociados a mayor riesgo de infección por *Leptospira* (Cespedes *et al.*, 2003). De forma muy similar Ferro *et al.* en Cali, encontraron asociación estadísticamente significativa entre el contacto con animales ($p = 0,038$), en particular con cerdos ($p = 0,042$) y conejos ($p = 0,049$) y la presencia de anticuerpos anti-*Leptospira*; en los serovares Grippothyphosa (10,4%) y Copenhageni (2,3%) se presentó más reactividad (Ferro *et al.*, 2006).

A la única paciente con infección por rickettsias se le encontró como factor relacionado, su procedencia del área rural y vivir en una finca ganadera, donde probablemente tuvo contacto con garrapatas, aunque su acudiente lo negara en la encuesta. Es importante mencionar que en los estudios realizados en Suramérica las rickettsiosis producidas por *R. rickettsi* presentan un cuadro clínico que incluye escalofríos, malestar general, mialgias, artralgias, cefalea, vómitos, fotofobia y

exantema, con un deterioro rápido que conduce a la muerte, mientras que las rickettsiosis ocasionadas por *R. parkeri* además de las manifestaciones bien conocidas y comunes para todas las rickettsiosis, como cefalea, mialgias, artralgias, tienen en algunos casos odinofagia, diarrea, fotofobia e inyección conjuntival, pero tienen un curso relativamente benigno y los pacientes se recuperan tras la terapia con doxiciclina (Abarca *et al.*, 2014).

Los resultados resaltan la necesidad de desarrollar e implementar nuevas herramientas diagnósticas que ayuden al médico clínico a guiar su diagnóstico y a dilucidar muchos de los casos que permanecen sin identificación, y que generan una importante carga de enfermedad e incapacidad.

4.5 Presencia de Rickettsias del Grupo de las Fiebres Manchadas en garrapatas

Las garrapatas incluidas en este estudio fueron clasificadas en tres géneros: *Rhipicephalus*, *Dermacentor* y *Amblyomma*. La tabla 10 muestra los porcentajes de acuerdo al estadio.

La descripción de las características morfológicas y ecológicas de las especies colectadas se muestra en el anexo 6.

Tabla 7. Distribución de las garrapatas de acuerdo a la procedencia (hospederos o ambiente).

HOSPEDERO	ESPECIE	ESTADIO	CANTIDAD	TOTAL
Bovinos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adultos	51	178
		Ninfas	2	
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Adultos	125	
Caninos	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adultos	395	404
		Ninfas	9	
Equinos	<i>Dermacentor spp.</i>	Adultos	30	47
		Ninfas	13	
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Ninfas	4	
Pradera	<i>Amblyomma spp.</i>	Ninfas	2	28
		Larvas	22	
	<i>Dermacentor spp.</i>	Adultos	2	
		Ninfas	2	
TOTAL				657

4.5.1 Detección molecular de *Rickettsia* sp. por Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

De 657 garrapatas incluidas en este estudio, se conformaron 169 grupos que fueron analizados por PCR-RT; en dos de ellos (grupos 18 y 19) se detectó ADN de *Rickettsia* sp. (1,18%). El grupo 18 estaba conformado por 16 larvas y una ninfa de garrapata del género *Amblyomma* recolectadas en una pradera de la vereda Barcelona del municipio de Villavicencio. El grupo 19 por seis larvas y una ninfa de garrapata del género *Amblyomma*, recolectada en una pradera del municipio de Puerto López.

4.5.2 Detección de los genes *gltA*, *ompB* y *ompA* de *Rickettsia* sp. por Reacción en cadena de la polimerasa convencional.

4.5.2.1 Amplificación del gen *gltA* con los iniciadores CS78 y CS323.

La PCR convencional para detectar el fragmento del gen *gltA* mostró amplificación en los dos grupos de garrapatas de interés (figuras 9 y 10).

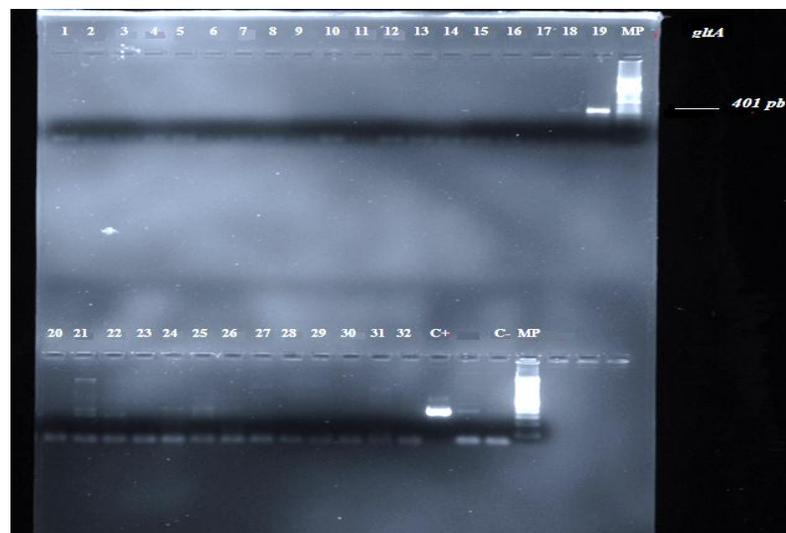


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la detección del gen *gltA* en los grupos de garrapatas. Las líneas MP corresponden al marcador de peso molecular (escala de 100 pb). Se observa amplificación en las líneas 18 y 19, la línea marcada con C- corresponde al control negativo (agua) y la C++ al control positivo (ADN de *Rickettsia*)

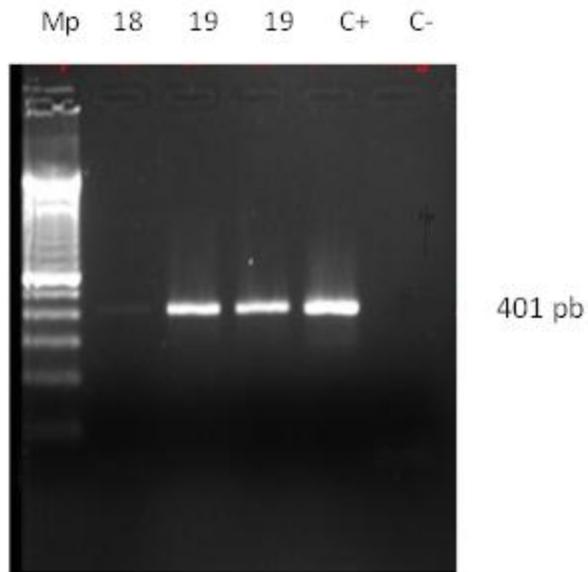


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la detección del gen *gItA* en los grupos de garrapatas. La línea Mp corresponde al marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Las líneas 18 y 19 corresponden a los grupos de garrapatas donde se observa amplificación, la línea marcada con C- corresponde al control negativo y la C+ al control positivo.

4.5.2.2 Amplificación del gen *ompB* con los iniciadores 120.2278 y 120.3599.

La PCR para la detección de un fragmento del gen *ompB* solo mostró amplificación en el grupo 19, que se corresponde a garrapatas *Amblyomma* recolectadas en una de las praderas del municipio de Puerto López (figura 11).

4.5.2.3 Amplificación del gen *ompA* con los iniciadores Rr190.70 y 190-701.

La PCR convencional para el gen *ompA*, de igual manera a la anterior, solo amplificó a partir del extracto obtenido del grupo 19 (figura 11).

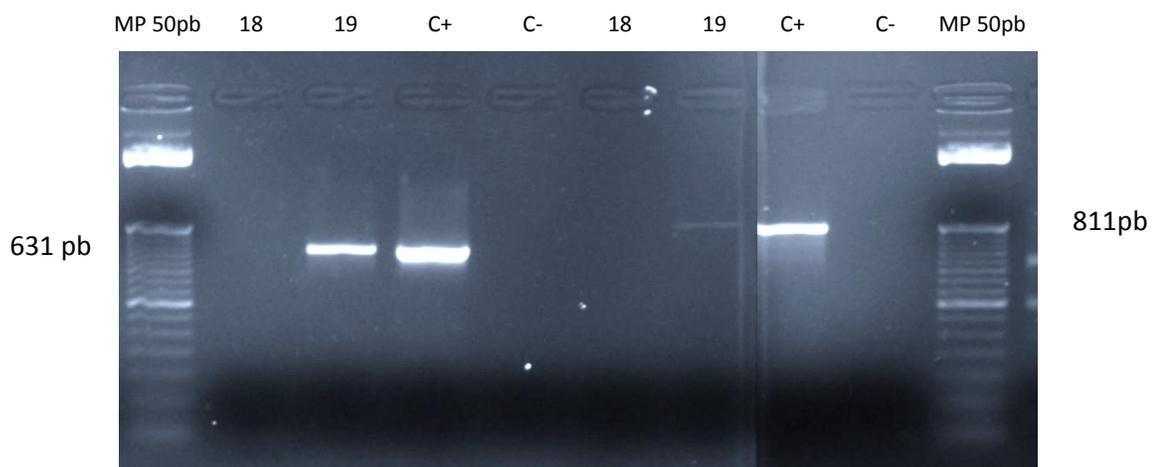


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la detección del gen *ompA* y *ompB* en el grupo 19 de garrapatas. Las líneas MP50 corresponden al marcador de peso molecular (escalera de 50 pb). La amplificación de 631 pb corresponde al gen *ompA* y la de 811 pb al gen *ompB*.

4.5.3 Identificación de las especies de *Rickettsia* en las garrapatas recolectadas

La secuenciación de los productos de PCR positivos para el gen *gltA* indican que la secuencia obtenida para el grupo 18 presenta 99% de identidad con *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi* y con *Rickettsia* sp., clon Necoclí (figura 12).

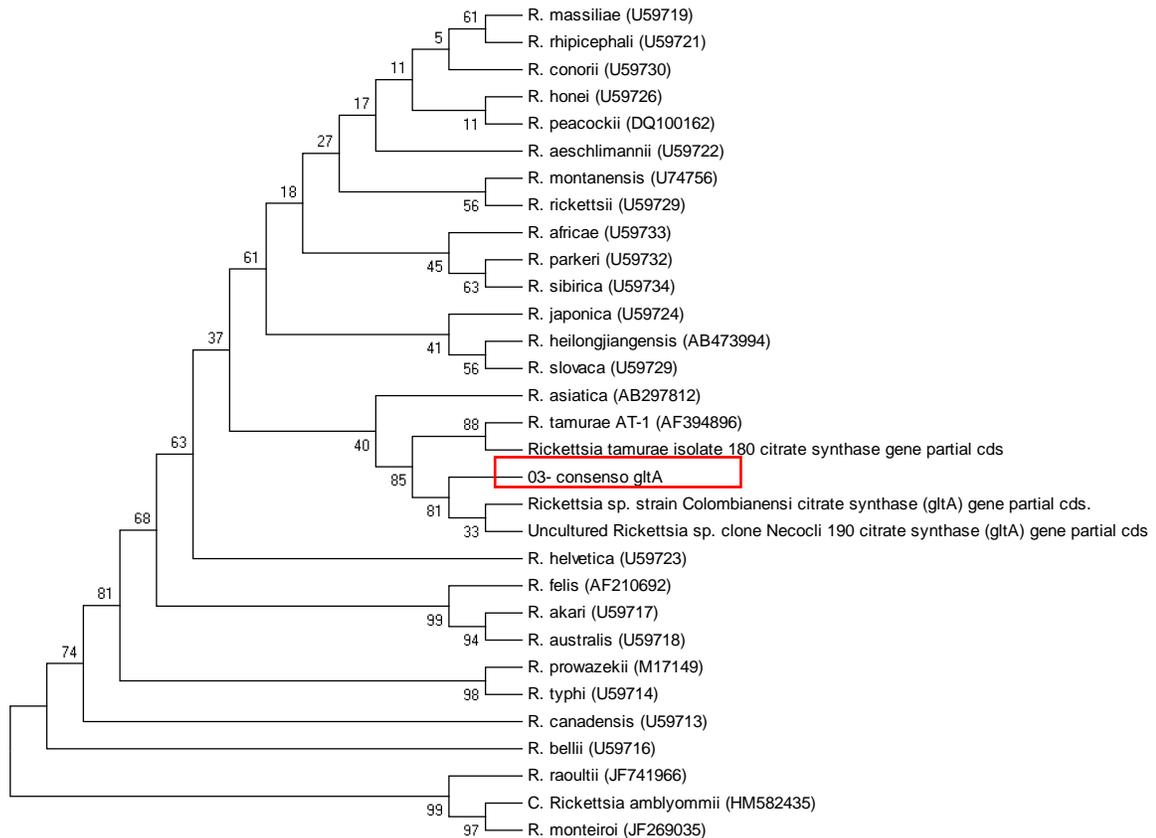


Figura 12. Relaciones filogenéticas del gen *gltA* de la muestra 18 (consenso 03 *gltA*). La historia evolutiva fue inferida por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo del 3 parámetro de Tamura. (Tamura., 1992). Se calcularon los valores *bootstrap* para 1000 réplicas. Los Análisis evolutivos se realizaron en MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La secuencia incluida se muestra en el recuadro rojo.

La secuencia nucleotídica del gen *gltA* para el grupo 19 presentó las mismas condiciones del grupo 18. El porcentaje de identidad con *Rickettsia* sp. clon Necoclí fue de 99%. Las secuencias nucleotídicas del gen *gltA* de los grupos 18 y 19 fueron idénticas entre sí.

La secuencia nucleotídica del gen *ompB* del grupo 19 fue 100% idéntica con *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi* reportada en Córdoba (acceso Genbank JF905456 y JF905457) (figura 13).

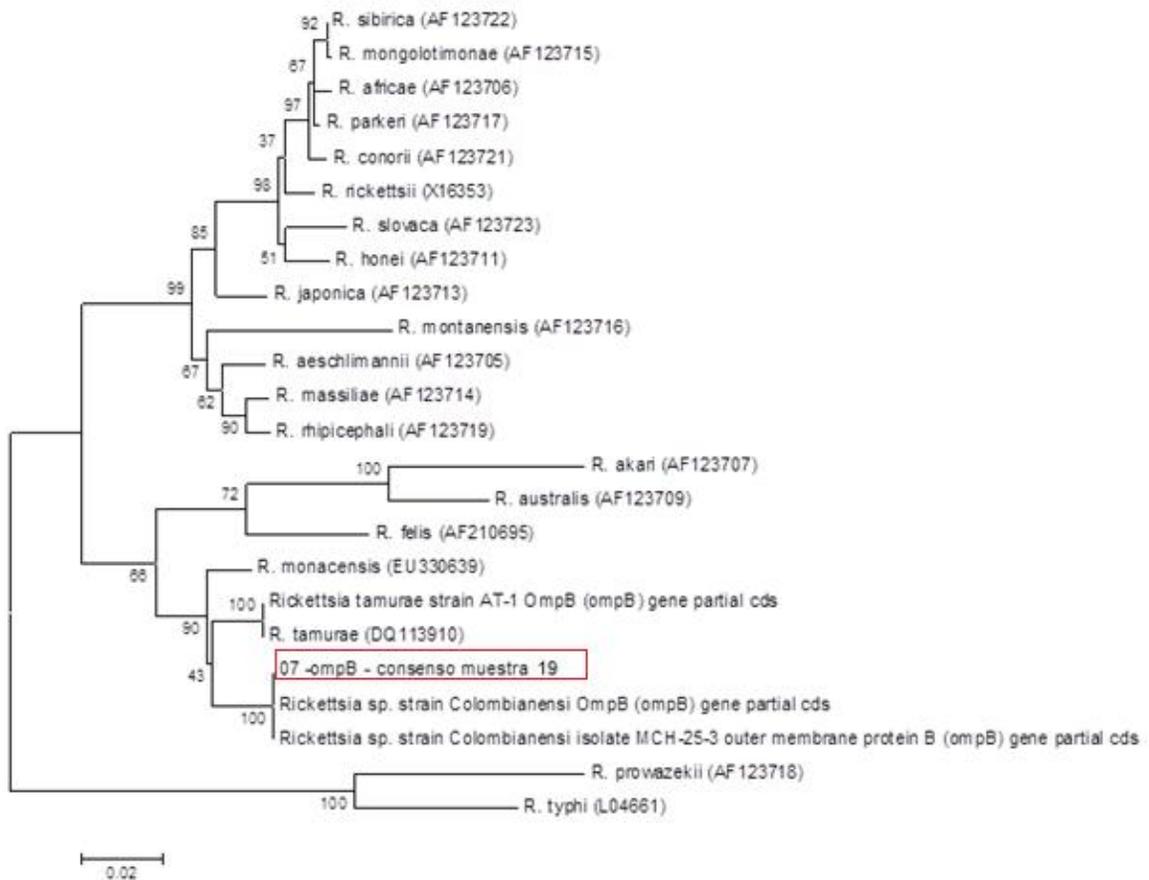


Figura 13. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva se dedujo con el uso del método de máxima probabilidad con base en el modelo de 3 parámetros de Tamura (Tamura., 1992). El análisis incluyó 24 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 679 posiciones en el último conjunto de datos. El Análisis evolutivo se realizó en MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). La secuencia incluida se muestra en el recuadro rojo

La secuencia nucleotídica del gen *ompA* de la muestra 19, presentó una identidad del 100% con *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi* (figura 14). Miranda *et al.* encontraron en garrapatas del genero *Amblyomma* recolectadas de iguanas y de vegetación, a las que se les hizo amplificación del gen *gltA* mediante PCR-RT, amplificación de los genes *gltA*, *ompA* y *ompB* por PCR convencional, secuenciación y estudios filogenéticos, 96,4%, 99,4% y 95,6% de identidad en los

genes *gltA*, *ompA* y *ompB*, respectivamente con *R. tamurae*. Los datos se encuentran depositados en el Gen Bank bajo los números de acceso JF905456, JF905458 y JF905457. (Miranda *et al.*, 2012)

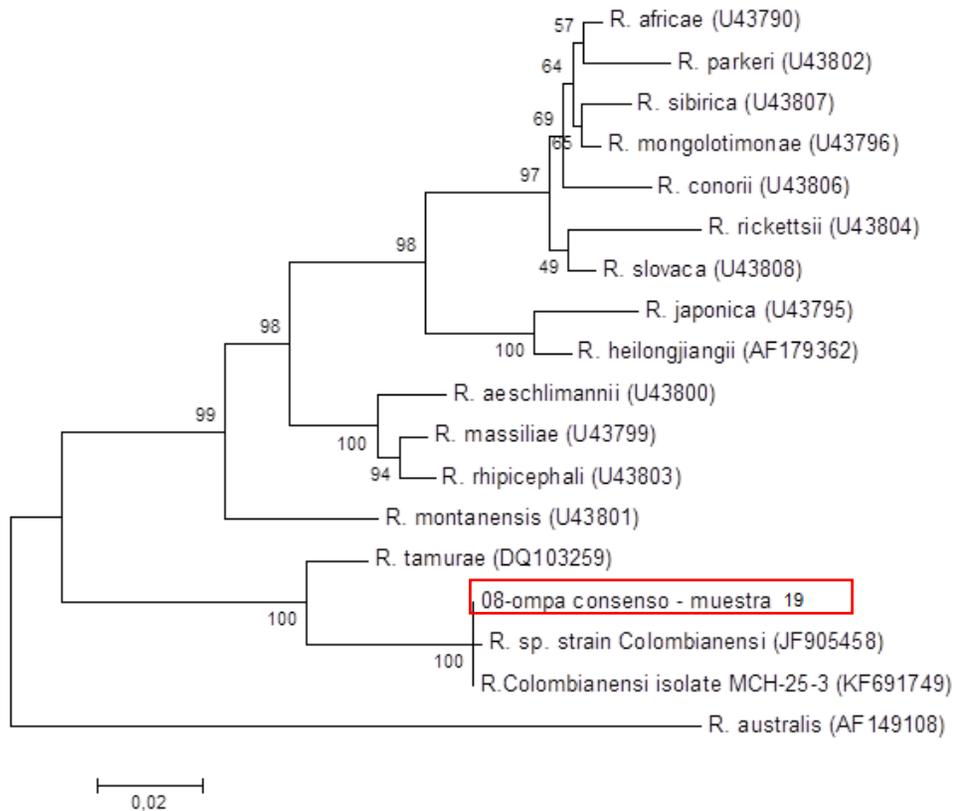


Figura 14. Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. La historia evolutiva se dedujo mediante el método de máxima probabilidad con base en el modelo de 3 parámetros de Tamura (Tamura., 1992). El análisis incluyó 18 secuencias de nucleótidos. El análisis evolutivo se realizó en MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

De los múltiples ectoparásitos infectados por rickettsias del GFM, las garrapatas son los principales vectores de este grupo. En el presente estudio se detectó infección por rickettsias, solamente en el género *Amblyomma*, lo cual se corresponde con los resultados reportados por Kelly en 2006 (Kelly., 2006). La

especie *A. cajennense* es reportada como vector de *R. rickettsii* especialmente en América del Sur (Sexton *et al.*, 2002). Las garrapatas del perro *Rh. sanguineus* y *D. nitens*, que son encontradas frecuentemente en équidos, también han sido reportadas como vectores de *R. rickettsii* (Labruna., 2009; Parola *et al.*, 2001; Blair *et al.*, 2014). En Argentina se reportó la presencia de *R. massiliae* en *Rh. sanguineus* (Cicuttin *et al.*, 2004) y en un estudio realizado en Brasil se aisló *R. bellii* en garrapatas *A. ovale* (Pacheco *et al.*, 2008).

En las últimas décadas especies nuevas de rickettsia con patogenicidad desconocida han sido identificadas en diferentes especies de artrópodos. No hay aún evidencia de la patogenicidad de *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi*, ni de su posible transmisión a los humanos. *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi* fue descrita por Miranda *et al.* en el Municipio de Los Córdoba (Miranda *et al.*, 2012) y por primera vez es reportada en el departamento del Meta. Esta rickettsia está estrechamente relacionada con *R. tamurae*, cuyo ADN fue aislado del área de inflamación en el sitio de mordedura de garrapata en un paciente japonés (Imaoka *et al.*, 2011).

Los resultados del presente estudio contribuyen con información básica e importante sobre la dinámica de las rickettsiosis en el departamento del Meta; con ellos se abre la puerta para nuevos estudios sobre la distribución, epidemiología y posible papel patógeno de esta cepa de *Rickettsia*.

4.5.4. Consideraciones generales

El departamento del Meta no cuenta con laboratorios de referencia especializados en el diagnóstico de entidades nosológicas como leptospiras, hantavirus y rickettsias, por lo que las técnicas de laboratorio empleadas en este trabajo, con excepción de los ELISA para dengue, fueron realizadas en instituciones de otras ciudades.

En el estudio se logra demostrar la circulación de agentes etiológicos del SFA no palúdico que no son de notificación obligatoria en Colombia, como son hantavirus y rickettsias; además se demuestra la importancia de las leptospiras como agente causal de este síndrome y se comprueba que la infección por esta bacteria es subdiagnosticada en el departamento del Meta. También se confirma que el virus Dengue es el principal agente causal del SFA en este importante departamento de la orinoquia colombiana.

Este trabajo es la base para otras investigaciones principalmente en los municipios en donde se recolectaron las garrapatas infectadas con rickettsias y en los municipios de procedencia de los pacientes que tuvieron diagnóstico para alguna de las etiologías estudiadas. De esta forma se llama la atención de las entidades a cargo de la salud pública de mejorar el diagnóstico del paciente febril sin foco infeccioso para así lograr un tratamiento oportuno. Con base en signos, síntomas y epidemiología acompañantes del SFA algunos autores han propuesto algoritmos interesantes para la aproximación sindromática a la luz de la clínica para el debido estudio y diagnóstico del SFA (Cortes *et al.*, 2016; Mattar *et al* 2014).

Este trabajo demuestra que en la orinoquia colombiana, son de gran valor los estudios enfocados en la metodología de la vigilancia sindrómica ya que dentro del espectro de las enfermedades febriles agudas, ciertamente deben existir patógenos que no son investigados de rutina por la carencia de recursos y por el desconocimiento de su existencia y que son de impacto para la salud pública.

Muchas investigaciones han dado por sentado la existencia directa o indirecta de agentes infecciosos que forman parte del conjunto de enfermedades emergentes y re-emergentes. Estudios de seroprevalencia realizados en el IIBT, han permitido detectar la circulación de agentes infecciosos como hantavirus y *Rickettsia* sp. en el departamento de Córdoba, que tiene condiciones climáticas y sociales muy similares a las del Meta.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se hace imprescindible el establecimiento de proyectos de investigación encaminados a la identificación de agentes etiológicos causantes del SFA, además de iniciar programas de control y monitoreo epidemiológico en humanos con el fin de evitar la aparición de casos clínicos de estas zoonosis. Para evitar o mitigar los efectos que se presenten por estas enfermedades, las autoridades de salud nacionales y locales deben dar un lugar prioritario a la vigilancia de enfermedades emergentes y re-emergentes, con la puesta en marcha de un conjunto de medidas que permitan disminuir los efectos devastadores de estos eventos. Entre ellas, promover la investigación aplicada al diagnóstico oportuno y tratamiento, prevención de factores de riesgo, así como crear una estructura para el seguimiento de los agentes causales a fin de tomar decisiones de una manera oportuna y eficaz.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- ❖ Se corrobora que el dengue y la leptospirosis son las principales causas del SFA no palúdico en el departamento del Meta, por lo que se requiere del fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica y de laboratorio para la prevención y el control de las mismas.
- ❖ Se demuestra por primera vez, la circulación de hantavirus y rickettsia como agentes etiológicos del SFA no palúdico en el departamento del Meta, lo que sugiere el subregistro de estas entidades.
- ❖ La presencia de coinfecciones ocasionadas por los virus Dengue, Hantavirus, Rickettsias y Leptospiras hace que estas patologías pasen inadvertidas por el personal médico al estar solapadas por la infección causada por los virus del dengue.
- ❖ La transmisión de las infecciones estudiadas en el Meta se favorece con las condiciones epidemiológicas existentes; sin embargo, no existe un patrón clínico que permita diferenciarlas por lo que se debe alertar y reforzar la vigilancia sindrómica nacional.
- ❖ Se evidencia la presencia de *Rickettsia* sp. cepa *Colombianensi* en garrapatas del género *Amblyomma* como vector potencial de la fiebre manchada en el departamento del Meta, lo que corrobora hallazgos anteriores realizados en la región y brinda nuevas luces sobre la epidemiología de esta infección en el Meta, Colombia.

RECOMENDACIONES

Recomendaciones

- ❖ Alertar a las autoridades y profesionales de la salud pública, así como a los estudiantes de medicina de la región de la relevancia de estos resultados en la vigilancia sindrómica en el departamento.
- ❖ Diseñar nuevas investigaciones ecoepidemiológicas para establecer el papel de los reservorios y vectores dentro de la epidemiología de las rickettsiosis, leptospirosis y la hantaviriosis en el departamento del Meta.
- ❖ Continuar con los estudios de diagnóstico molecular en pacientes con SFA del departamento del Meta para la determinación directa de los agentes etiológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Abarca K, Oteo J. Aproximación clínica y principales rickettsiosis transmitidas por garrapatas presentes en Latinoamérica. *Rev Chil Infectol* 2014; 31 (5): 569-76.
- Acosta C, Gómez I. Biología y métodos diagnósticos del Dengue. *Rev Biomed* 2005; 16:113-37.
- Acosta J, Urquijo L, Díaz A, Sepúlveda M, Mantille G, Heredia D, *et al.* Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero-marzo de 2006. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2006;11:177-92.
- ADEX, OPS, IICA. Memorias de Taller: Implicancias de la nueva Normativa de los Estados Unidos de Norte América contra el Bioterrorismo y bases para la elaboración de un plan nacional de acción para afrontarla, 15 de julio de 2003 Lima –Perú.
- Agudelo P, Restrepo B, Arboleda M. Situación de la leptospirosis en el Urabá antioqueño colombiano: estudio seroepidemiológico y factores de riesgo en población general urbana. *Cad Saúde Pública* 2007; 23(9):2094-2102.
- Agudelo P. Leptospirosis: Diagnóstico serológico. *Rev CES Med* 2005; 19 (1): 37-41.
- Alemán A, Iguarán H, Puerta H, Cantillo C, Mills J, Ariz W, *et al.* Primera evidencia serológica de infección por Hantavirus en roedores, en Colombia. *Rev Salud Pública* 2006;8(Sup 1):1-2.
- Angerami RN, Resende MR, Feltrin AF, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RS, *et al.* Brazilian spotted fever: A case series from an endemic area in southeastern Brazil, clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:252-54.
- Aria L, Guillen A, Rojas A, Acosta M, Roig C, Meza T *et al.* Concordancia de antígenos de dengue en el ELISA de captura (MAC ELISA) en el IICS-UNA. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2010; 8 (2): 34-38.

Armien B, Pascale J, Munoz C, Lee S, Choi K, Avila M *et al*. Incidence Rate for Hantavirus Infections without Pulmonary Syndrome, Panama. *Emerg Infect Dis* 2011;17: 1936-39.

Arroyave E, Londoño A, Quintero J, Agudelo P, Arboleda M, Díaz F, Rodas J. Etiología y caracterización epidemiológica del síndrome febril no palúdico en tres municipios del Urabá antioqueño, Colombia. *Biomédica* 2013;33(Supl.1):99-107.

Avellaneda R. Fiebre hemorrágica con síndrome renal: a propósito de un caso. *Nefrología* 2012; 32 (1): 131-2.

Baquero M, Gómez A, Hernández P. Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira sp*. *Rev Med Vet* 2010;19:101-11.

Barrera S, Martínez S, Tique V, Miranda J, Guzmán C, Mattar S. Seroprevalencia de Hantavirus, Rickettsia y Chikungunya en población indígena del municipio de Tuchín, Córdoba. *Infectio* 2015; 19 (2):75-82

Barros-Battesti D, Arzua M, Bechara G. Garrapatos de Importancia Médico-Veterinaria da Regiao Neotropical: Um Guia Ilustrado para Identificação de Especies. International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases, Sao Paulo, 2006.

Bello S, Rodríguez M, Paredes A, Mendivelso F, Walteros D, Rodríguez F, Realpe ME. Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de leptospirosis humana en Colombia, 2007-2011. *Biomedica* 2013; 33:153-60.

Bermúdez S, Pulido M, Andrade R. Seroprevalencia de *Leptospira spp* en caninos y humanos de tres barrios de Tunja, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 2010; 15(3):2185-93.

Blanco P, Arroyo S, Corrales H, Pérez J, Álvarez L y Castellar A. Evidencia serológica de infección por hantavirus (*Bunyaviridae: Hantavirus*) en roedores del Departamento de Sucre, Colombia. *Rev Salud Pública* 2012; 14 (5): 755-764.

Blair P, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M *et al.* Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11):4961-67.

Caino H, Scaglia J, Curcio F, Siquiroff G. Leptospirosis. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* 2006; 1(3): 30-36.

Cardona M, Moros R, López E, Pérez J, Hernández R. Diagnóstico de Leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. *Rev Soc Ven Microbiol* 2008; 28: 24-30.

Carvalho de Oliveira R, Cordeiro-Santos M, Guterres A, Fernandes J, de Melo AX, João G, *et al.* Rio Mamore Virus and Hantavirus Pulmonary Syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2014;20(9):1568-70.

Castro M, Machain C, Loroño M, Salazar M. Respuesta inmune e inmunopatogenesis en las infecciones con el virus del dengue. *Gaceta Médica de México* 2013; 149: 531-40.

Centers for Disease control and prevention. Hantavirus Pulmonary Syndrome-United States: Updated Recommendations for Risk Reduction 2002;51:1-10.

Centers for Disease control and prevention. Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) 2015 Case Definition.- Division of Communicable Disease Control Infectious Diseases Branch - Surveillance and Statistics Section.

Centers for Disease control and prevention. Epidemiologic Summary of Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) in California, 2001 – 2008.

Céspedes M , Ormaeche M , Condori P , Balda L, Glenny M. Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de Dios, Perú 2003; 20(4):180-85.

Cespedes M, Chun M, Cano E, Huaranca I, Atoche H, Ortiz H *et al.* Prevalencia de anticuerpos contra leptospira en personas asintomáticas y en perros de chancay, Lima 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2007; 24(4): 343-49.

Chapman A, Bakken J, Folk S, Paddock C, Bloch K, Krusell A, *et al.* Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis –United States: A practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep* 2006;55:1-27.

Chen LF, Sexton DJ. What's new in Rocky Mountain spotted fever? *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22:415-32.

Chinchilla A, Cordero R, Sáenz E. Leptospirosis en humanos. *Rev Cost de Ciencias Médicas* 1996; 17 (2): 41-60.

Cicuttin G RVM, Jado I, Anda P. Primera detección de *Rickettsia massiliae* en la ciudad de Buenos Aires. Resultados preliminares. *Rev Argentina Zoonosis* 2004;1:8 -10.

Cinco M, Delneri D, Banfi E. Immunodominant antigens recognized by the human immune response to infection by organisms of the species *Leptospira interrogans* serogroup Australis. *FEMS Microbiol Immunol* 1992; 89:287-98.

Cortés J, Romero L, Aguirre C, Pinzón L, Cuervo S. Enfoque clínico del síndrome febril agudo en Colombia. *Infectio* 2017; 21(1): 39-50.

DANE, Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Información estadística, aproximaciones 2005-2020. 2005.

Dantas-Torres F. Rocky mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis* 2007;7:724-32.

Díaz J, Cataño J. Fiebre manchada de las montañas rocosas: ni tan manchada ni tan montañosa como pensábamos. *Infectio* 2010; 14(4): 264-76.

Duran C, Lanza T, Plata J. Fisiopatología y diagnóstico del dengue. *Rev Med Hondur* 2010; 78(3): 113-68.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization; 2003.

Ferreira M, Nishioka A, Santos T, Santos R, Santos P, Rocha A. Hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: clinical aspects of three new cases. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2000; 42 (1): 41-46.

Ferro B, Rodríguez A, Pérez M, Travi B. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* en habitantes de barrios periféricos de Cali. *Biomédica* 2006; 26:250-57.

Field J, Seijo J. Rickettsiosis en baja california. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son* 2011;28(2):44-50.

Flannery B, Pereira MM, Velloso L, Carvalho C, De Codes LG, Orrico G, *et al.* Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:657-63.

Gegúndez M, Lledó L. Infección por hantavirus y otros virus transmitidos por roedores. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(8):492-500.

Georgia Epidemiology report. Leptospirosis: A waterborne zoonotic disease of global importance 2006; 22(8).

Gobernación del Meta, 2016. (Disponible en: <http://www.meta.gov.co/es/el-meta/identificacion-del-departamento/>). (Visita del 19 de enero de 2016).

Góngora A, Parra J, Aponte L, Gomez L. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. En grupos de población de Villavicencio, Colombia. *Rev Salud Publica* 2008; 10 (2): 269-78.

Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao M, *et al.* Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001;69(8):4958-68.

Guglielmone A, Beati L, Barros-Battesti D, Labruna M, Nava S, Venzal J, *et al.* Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol* 2006;40:83-100.

Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: New paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2005;2:1-10.

Guzmán M, Vásquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue, Rev Cubana Med Trop 2002;54(3):180-88.

Guzmán M, García G, Kouri G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. Rev Panam Salud Pública 2006; 19(3):204-15.

Guzmán M, Halstead, S Artsob H, Buchy Ph, Farrar J, Duane J Gubler D et al. Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol 2010 Dec;8(12 Suppl):S7-16.

Guzmán C, Mattar S, Levis S, Pini N, Figueiredo T, Mills J, Salazar J. Prevalence of antibody to hantaviruses in humans and rodents in the Caribbean region of Colombia determined using Araraquara and Maciel virus antigens Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2013; 108(2): 167-71.

Hartskeerl R, Collares M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. Clinical Microbiology and Infection 2011; 17:494-501.

Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernández J, Parra E, *et al.* Rocky Mountain spotted fever, Colombia. Emerg Infect Dis 2007a;13:1058-60.

Hidalgo M, Sánchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker DH, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group rickettsiae in a rural area of Colombia. Am J Trop Med Hyg 2007b; 77:378-80.

Hidalgo M, Lizarazo D, Ovalle MV, Parra E, Vera M, Porras A, *et al.* Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. Inf Quinc Epidemiol Nac 2007c;12:371-5.

Hidalgo M, Niño N, González C, Vesga J, Orejuela L, Sánchez R *et al.* Las rickettsias como agentes etiológicos de entidades febriles no diagnosticadas en Colombia. Ediciones Uniandes, 2008.

Hidalgo M, Faccini-Martínez A, Valbuena G. Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. Biomédica 2013;33 (Supl.1):161-78.

Imaoka K, Kaneko S, Tabara K, Kusatake K, Morita E. The First human case of *Rickettsia tamurae* infection in Japan. *Case Rep Dermatol* 2011; 3: 68-73.

Iglesias A, Bellomo C, Martinez V. Síndrome Pulmonar por Hantavirus en Buenos Aires 2009-2014. *Medicina (Buenos Aires)* 2016; 76:1-9.

Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos enfoque sindrómico para el diagnóstico de laboratorio durante brotes. Lima, Perú; 2005. Serie de normas técnicas N° 42.

Instituto Nacional de Salud. Informe de vigilancia virológica en Colombia, 2006-2010. Bogotá: 2010.

Instituto Nacional de Salud. Comportamiento Epidemiológico del Dengue en Colombia año 2011. Boletín epidemiológico semanal (semana epidemiológica número 17 de 2011). Bogotá, Colombia.

Instituto Nacional de Salud. Manual para obtención y envío de muestras para análisis de eventos de interés en salud pública. República de Colombia, INS, Subdirección Red Nacional de Laboratorios 2012.

Instituto Nacional de Salud. Comportamiento Epidemiológico del Dengue en Colombia año 2013. Boletín epidemiológico semanal (semana epidemiológica número 17 de 2013). Bogotá, Colombia 2013.

Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 50 de 2015 . Bogotá, Colombia 2015.

Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica número 30 de 2016. Bogotá, Colombia 2016.

Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en salud pública: Leptospirosis Colombia 2016: 1-30.

Jacob P, Schmeling M, Chiani Y, Landolt N, Scialfa E, Fusco S *et al.* Evaluación de un panel reducido de cepas de leptospirosis para el diagnóstico en humanos por microaglutinación (MAT). *Salud pública Mex* 2015; 57 (5): 419-25.

Jonsson C, Figueireido T, Vapalahti O. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23 (2): 412–41.

Kelly DJ, Carmichael JR, Booton GC, Poetter KF, Fuerst PA. Novel spotted fever group rickettsiae (SFGR) infecting *Amblyomma americanum* ticks in Ohio, USA. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1063:352-5.

Labruna M, Whitworth T, Horta M, Bouyer D, McBride J, Pinter A *et al.* Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 90–98.

Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009;1166(1):156-66.

Lanciotti R, Calisher C, Gubler D, Chang G, Vorndam A. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-51.

Lau C, Smythe L, Weinstein P. Leptospirosis: An emerging disease in travelers. *Travel Med Infect Dis* 2010; 8: 33-39.

Lin L, Decker CF. Rocky mountain spotted fever. *Dis Mon* 2012; 58:361-69.

Londoño F, Díaz J, Agudelo-Flórez P, Levis S, Rodas JD. Genetic evidence of hantavirus infections in wild rodents from northwestern Colombia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2011;11: 701-8.

Londoño A, Levis S, Rodas J. Hantavirus como agentes emergentes de importancia en Suramérica. *Biomédica* 2011;31:451-64.

MacNeil A, Ksiazek T, Rollin P. Hantavirus Pulmonary Syndrome, United States, 1993–2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(7): 1195-1201.

Malagón J, Padilla J, Rojas D. Guía de Atención Clínica Integral del paciente con Dengue. *Infectio* 2011; 15 (4):293-301.

Martínez E. Dengue. *Estudios avanzados* 2008; 22 (64): 33-52.

Mas M, Vázquez M, Vomero A, Pandolfo S, Dall'Orso P, Prego J. Síndrome pulmonar por hantavirus. Primeros casos pediátricos reportados en Uruguay. Rev Med Urug 2009; 25: 116-123.

Mattar S, Parra M. Serologic Evidence of Hantavirus Infection in Humans, Colombia. Emerg Infect Dis 2004; 10(12): 2263-4.

Mattar S, Puerta H, Cantillo C, Peña J. Hantavirus y Otros virus hemorrágicos. Revista CES MEDICINA 2007;21 supl 1 : 21-40.

Mattar S, Arrieta G. Enfermedades emergentes y reemergentes: importancia de las enfermedades transmitidas por vectores. Infectio 2008; 12 s1: 3-4.

Mattar S, Garzón D, Tadeu L, Faccini-Martinez A, Mills J. Serological diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome in a febrile patient in Colombia. International J Infect Dis 2014;25: 201–3.

Meites E, Jay M, Deresinski S, Shieh W, Zaki Sh, Tompkins L, Smith S. Reemerging Leptospirosis, California. Emerg Infect Dis 2004; 10 (3): 406-12.

Mercado M. Informe del evento Dengue año 2013. Bogotá, D.C: Instituto Nacional de Salud 2012.

Mesa G, Rodríguez I, Teja J. Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud pública en las Américas. Rev Panam Salud Pública/Pan Am j Public Helath 2004; 15: 285-87.

Ministerio de Salud y Protección Social, OPS. Propuesta de abordaje sindrómico de Zoonosis con potencial epidémico. República de Colombia. Octubre 31 de 2012.

Ministerio de Salud y Protección Social. Manual para la obtención y envío de muestras para el análisis de eventos de interés en salud pública. 2011

Ministerio de Salud y Protección Social. Situación del dengue en Colombia, semana 1 de 2008 a semana 8 de 2013. Dirección de epidemiología y demografía 2013.

Miranda A, Flórez S, Mattar S. Alta seroprevalencia de rickettsiosis en trabajadores del campo en el municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2002;7:71-5.

Miranda J, Sánchez L, Amaya K, Máttar S. Primera prueba serológica de *Rickettsia* sp. del grupo de la fiebre manchada en el departamento del Meta. *Biomédica* 2011;31(Supl):103-13.

Miranda J, Portillo A, Oteo J, Mattar S. *Rickettsia* sp. Strain *Colombianensi* (Rickettsiales: *Rickettsiaceae*): A New Proposed *Rickettsia* Detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) From Iguanas and Free-Living larvae ticks from vegetation. *J Med Entomol* 2012; 49(4):960-5.

Monsalve S, Mattar S, González M. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev MVZ Córdoba* 2009;14(2):1762-73.

Moreno B, Díaz Y, Cisneros J, de Díaz G, Pascale J, García M *et al.* Evaluación de ELISA de captura para NS1 como nueva herramienta del diagnóstico temprano de la infección por Dengue en Panamá 2013; 34: 8-13.

Nascimento E, Hottz E, Garcia T, Bozza F, Marques E, Barratt S. Emerging Concepts in Dengue Pathogenesis: Interplay between Plasmablasts, Platelets and Complement in Triggering Vasculopathy. *Critical Reviews™ in Immunology* 2014; 34(3):227–40.

Naranjo M. Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la leptospirosis. (Tesis doctoral). La Habana: Instituto Finlay 2010.

Navarrete J, Acevedo J, Huerta E, Torres J, Gavaldón D. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y leptospira en la población de Jáltipan, Veracruz. *salud pública de México* 2006; 48 (3) : 220-28.

Navarrete J, Rivas B, Grajales C, Gonzalez C, Marín M, Carmona E *et al.* *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2015; 67 (2): 150-64.

Ningal S, Kothule M, Jadhav N ,Kadam S , Katare Y , Hapse S. A review on leptospirosis. *World J Pharmacy Pharm Sci* 2015; 4 (9): 1531-43.

Obregón A, Fernández, C, Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández N, Enrique G. Importancia de la confirmación microbiológica en un brote de leptospirosis humana en la ciudad de Villa Clara. *Rev Cubana Med Trop* 2003;55(2):96-9.

Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Rodríguez J, Martínez B. Lepto Dip Stick y Lepto Dri Dot técnicas útiles en el diagnóstico rápido de la Leptospirosis humana en Cuba. *Rev Bioquímica* 2004;29(No. especial): 90.

Obregón A. Sistemas serológicos rápidos y su impacto en el diagnóstico de la leptospirosis humana en Cuba. (Tesis doctoral). La Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" 2009.

Obregón A, Fernández C, Martínez I, Llop A, Rodríguez I, Rodríguez J. Sistemas serológicos rápidos utilizados para la pesquisa de leptospirosis humana en Cuba, *Rev Cubana Med Trop* 2011;63(3):239-45.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Cap. 2.1.9 Leptospirosis. 2014.Paris: [Internet]. Disponible en:

<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-online/>

Oliveira S, Lopes B. Dengue: A review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis* 2004;8(6):390-98.

Organización Panamericana de la Salud. Hantavirus en las Américas, Guía para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control. Cuaderno Técnico No 47.OPS 1999.

Oteo J, Nava S, de Sousa R, Mattar S, Venzal J, Abarca K *et al*. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (1): 54-65.

Pacheco R, Rosa S, Richtzenhain L, Szabó M, Labruna M. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from southern Brazil. Rev MVZ Córdoba 2008;13(2):1273-79.

Padilla J, Rojas D, Sáenz R. Dengue en Colombia: Epidemiología, de la Remergencia a la Hiperendemia. Ed Los autores. Bogotá 2012.

Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis 2001;32(6):897-928.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev. 2005; 18:719-56.

Plan vial Departamental del Meta 2009-2018. Villavicencio, Meta junio 2009.

Puerta H, Cantillo C, Mills J, Hjelle B, Salazar J, Mattar S. Hantavirus del nuevo mundo ecología y epidemiología de un virus emergente en Latinoamérica. MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66: 343-56.

Pulido A, Carreño G, Mercado M, Ramírez P. Situación epidemiológica de la leptospirosis humana en Centroamérica, Suramérica y el Caribe. Univ. Sci 2014;19 (3): 247-64.

Quitán H, Parra J, Góngora A, Parra J, Gallego J, Aponte L. Seroprevalencia de infección por *Leptospira* spp. en auxiliares y veterinarios de consultorios de pequeños animales de Villavicencio (Colombia). Salud Uninorte 2009; 25(1): 47-55.

Ramírez A, Escandón P, Cortés JA, Rodas JD, Hidalgo M. Detección Molecular de *Rickettsia* spp. (Da Rocha-Lima, 1916) en Garrapatas Recolectadas en Tres Regiones de Colombia. Act Méd Cost 2013; 55:83-4.

Ramos C, García H, Villaseca J. Fiebre hemorrágica y síndrome de choque por dengue. Salud pública de México 1993; 5(1): 39-55.

Regiones colombianas: Región Orinoquia. Bogotá; 2005. Fecha de consulta: 28 de diciembre de 2015. Disponible en: <http://www.todacolombia.com/geografía/regionesnaturales.html>

- Reyna M, Romero L, Gante A. Manifestaciones cutáneas del dengue. Reporte de caso y revisión de literatura. *Rev Med Invest* 2014; 2(1): 23-7
- Rodríguez C, Recalde D, González M, Padilla L, Quintero, J, Gallego, *et al.* Manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio, de una serie de casos febriles agudos con diagnóstico presuntivo de infección por el virus dengue. Quindío-Colombia. *Infectio* 2016;20 (2) : 84-92.
- Rodríguez I, Obregón A, Rodríguez J, Fernández C, Arzola A, Victoria B. Caracterización serológica de cepas aisladas De pacientes con leptospirosis humana en cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2002;40(1):11-5.
- Rodríguez I, Rodríguez J, Fernández C. Alcalinización de la orina humana para el aislamiento experimental de leptospiras. *Rev Cubana Med Trop* 2005;57(1):55-6.
- Rodríguez Y, Rodríguez I, Zamora Y, Rodríguez J, Valdés Y, Echevarria E *et al.* Detección de ADN de leptospiras en tejidos frescos de fallecidos en Cuba, 2008-2011 , *Rev Cub Med Trop* 2013; 65(2): 211-22
- Romero M, Sánchez J, Hayek L. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima. *Rev Salud pública* 2010; 12(2):268-75.
- Roux V, Fournier PE, Raoult D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2058-65.
- Roux, V, Raoult, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 4 (50 Pt): 1449–55.
- Rúa G, Suárez C, Chauca J, Ventosilla P, Almanza R. Modelado del efecto de la variabilidad climática local sobre la transmisión de dengue en Medellín (Colombia) mediante análisis de series temporales. *Biomédica* 2013; 33 (supl 1): 142-52.

Sánchez G, Gómez J, Quintero L, Castaño M. Características Clínicas y epidemiológicas de la leptospirosis en el departamento del Quindío, 2005-2006. *Infectio* 2008; 12 (2): 325-31.

SEDES. Normas de diagnóstico y manejo del dengue. Ministerio de salud y deportes. Bolivia. 2009.

Sexton D, Kaye K. Rocky mountain spotted fever. *Medical Clinics of North America* 2002;86(2):351-60.

Siuce J, Calle S, Pinto Ch, Pacheco G, Salvatierra G. Identificación de Serogrupos Patógenos de *Leptospira* en Canes Domésticos. *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(4): 664-75.

Suarez R, Hidalgo M, Niño N, Gonzalez C, Vesga J, Orejuela E *et al.* Las Rickettsias como agentes etiológicos de entidades febriles no diagnosticadas en Colombia. Universidad de los Andes. Bogotá 2008.

Suárez R. Aspectos socioculturales en la subsistencia y reproducción del dengue y del *Aedes aegypti*: una discusión sobre la importancia de la investigación en la antropología médica. *Boletín de Antropología de la Pontificia Universidad Javeriana* 2000;6:33-44.

Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 1992; 9:678-87.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725-29.

Terassini F, Barbieri FS, Albuquerque S, Szabó MPJ, Camargo LMA, Labruna MB. Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazon forest. *Ticks Tick Born Dis* 2010; 1:194-6.

The Center for Food security and public health and Institute for international cooperation in animal biologics. Hantavirus. 2009. <http://goo.gl/MospJv>

Troyes L, Fuentes L, Troyes M, Canelo L, García M, Anaya E *et al.* Etiología del síndrome febril agudo en la provincia de Jaén, Perú 2004-2005. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2006;23(1): 5-11.

Ubicación Geográfica de Colombia [consultado el 15 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.todacolombia.com/geografia-colombia/ubicacion-geografica.html>

Usme J, Gómez A, Gallego J. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. *Salud Uninorte* 2012; 28 (1): 1-15.

UTMB, Infectious Diseases Reference Laboratory, Department of Pathology. IFA procedure for detection of antibodies to *Rickettsia rickettsii*. Galveston, Texas, 2003.

Vargas F, Garcia V, Céspedes M, palomino M, Ayala T. Seroprevalencia y factores asociados con leptospirosis en pacientes con síndrome febril en ayacucho, Perú 2005. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2008; 25(2): 190-94.

Venzal J, Nava S. El género *Rickettsia* como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. *Rev Med Urug* 2011; 27: 98-106.

Walker D. Los desafíos en el diagnóstico, la investigación y la concientización sobre las rickettsiosis en América Latina. *Acta Médica Costarricense* 2013; 55:4-6.

Zhenqiang B, Pierre B, Formently C, Cathy R. Hantavirus Infection: a review and global update. *J infect Developing Countries* 2008; 2 (1):3-23.

Zunino E, Pizarro R. Leptospirosis, Puesta al día. *Rev Chil Infect* 2007; 24 (3): 220-26.

ANEXOS

Anexo 1. Cartel que se ubico en los pasillos del servicio de urgencias del HDV

¿Tiene uno de estos síntomas?

Dolor de Cabeza

Salpullido

Dolor Muscular

FIEBRE

Dolor Articular

¿Convive o tiene contacto con algunos de estos animales?

Ratones

Zancudos

Garrapatas

Iría tener una de estas enfermedades

- ✓ Dengue
- ✓ Leptospirosis
- ✓ Rickettsiosis
- ✓ Hantavirosis

Mayor información en el laboratorio clínico.

Anexo 2. Consentimiento informado

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
GRUPO DE INVESTIGACIONES SOBRE MICROBIOLOGIA
CONSENTIMIENTO INFORMADO



VIGILANCIA DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSANTES DE SINDROMES FEBRILES AGUDOS EN EL DEPARTAMENTO DEL META, COLOMBIA

Debido a la susceptibilidad de enfermedades como dengue, malaria, rickettsiosis, leptospirosis, leishmaniasis, chagas, fiebres hemorrágicas entre otras a los cambios climáticos se hace importante realizar vigilancia epidemiológica para proporcionar datos actualizados que permitan tomar medidas de control y prevención. En el departamento del Meta, se desconocen datos de incidencia y Prevalencia, del impacto potencial, la trascendencia, la vulnerabilidad de enfermedades como rickettsiosis, leptospirosis, Hantavirus y datos actualizados de serotipos circulantes del dengue. Se le pide participar en la investigación sobre la VIGILANCIA DE AGENTES INFECCIOSOS CAUSANTES DE SINDROMES FEBRILES AGUDOS EN EL DEPARTAMENTO DEL META, COLOMBIA , dirigida por Liliana Sanchez, docente de microbiología de la facultad de medicina de la Universidad Cooperativa de Colombia, sede Villavicencio.

¿Cuál es el propósito de este consentimiento informado?

El propósito de este consentimiento informado es para ayudarle a entender las características del estudio, de tal modo que usted tenga la libertad de elegir si desea participar o no; la decisión debe ser tomada voluntariamente. Si luego de leer este documento presenta algunas dudas, solicite al personal del estudio que le explique para poder obtener una información clara y precisa que le permita tener el conocimiento acerca del estudio a realizar; el personal del estudio está en la total obligación de explicarle y proporcionarle toda la información que usted requiera para el buen entendimiento de este.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo de este estudio es vigilar los agentes infecciosos causantes de síndromes febriles en el departamento del Meta, Colombia

¿Cuál es la importancia del estudio?

Las infecciones por *Rickettsia*, *Leptospira* y *Hantavirus* son consideradas actualmente un problema de salud en Colombia por ser enfermedades subdiagnosticadas ya que no son sospechadas primero por la inespecificidad de los hallazgos clínicos los cuales son compartidos con otras enfermedades de tipo febril lo que favorece el enmascaramiento de dichas enfermedades, además de la dificultad en el diagnóstico por la falta de tecnología y de pruebas de fácil acceso a los laboratorios locales.

En Colombia los estudios son pocos y en la ciudad de Villavicencio aún no se encuentra documentado ninguno, a pesar de la existencia de los factores asociados a la transmisión y desarrollo de la enfermedad y los síntomas relacionados con la misma.

¿Cuáles son los posibles riesgos?

Este estudio no implica ningún riesgo físico o psicológico para usted. Sus respuestas no le ocasionarán ningún riesgo ni tendrán consecuencias para su situación financiera, su empleo o su reputación.

Se tomara una muestra de 5mL de sangre por venopunción en la fosa antecubital de su brazo no dominante. Las muestras serán tomadas en tubo vacío sin anticoagulante (al 5 día), se dejaran coagular y el suero resultante será congelado a -70°C hasta su uso. Los sueros deben ser pareados con intervalo de 15 días. Si usted no se encuentra hospitalizado se le buscara en su lugar de residencia. Se puede generar una leve molestia en el sitio de la punción y en ocasiones muy esporádicas se pueden causar hematomas, que pueden tratarse fácilmente. Es importante anotar que no hay riesgo de adquirir enfermedades contagiosas por esta vía, porque siempre se usa material nuevo, estéril y desechable.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en el estudio clínico?

El principal beneficio que usted recibirá por la participación en este estudio será la relacionada con la determinación del agente etiológico de su síndrome febril; además, todos los esfuerzos que se realicen en obtener los resultados que respondan a la situación planteada contribuirán con los servicios de salud en el conocimiento, prevención y tratamiento de la enfermedad.

Confidencialidad del participante.

Las únicas personas que sabrán que usted participó en el estudio somos los miembros del equipo de investigación. Nosotros no divulgaremos ninguna información sobre usted, o proporcionada por usted durante la investigación. Cuando los resultados de la investigación se publiquen o se discutan en

conferencias, no se incluirá información que pueda revelar su identidad. Nadie fuera del equipo de investigación tendrá acceso a su información sin su autorización escrita. Si durante el diligenciamiento de la encuesta o posterior a ella usted tiene alguna duda puede contactarse con el investigador que conduce este proyecto: Liliana Sánchez, teléfono: _____ correo electrónico: ____liliana.sanchez@campusucc.edu.co

Su participación en esta investigación es voluntaria. Su decisión de participar o no en este proyecto no afectará sus relaciones actuales o futuras con la Universidad Cooperativa de Colombia sede Villavicencio (facultad de medicina); ni con el Hospital Departamental de Villavicencio. En el momento que solicite información relacionada con el proyecto los investigadores se la proporcionarán.

Consentimiento del sujeto del estudio.

He leído y escuchado satisfactoriamente las explicaciones sobre este estudio y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Estoy enterado de los riesgos y beneficios potenciales de participar en este estudio y sé que puedo retirarme de él en cualquier momento.

Autorizo el uso de la información para los propósitos de la investigación.

Yo estoy de acuerdo en participar en este estudio.

Nombre del participante: _____

Firma: _____

Número de identificación: _____

Testigo: _____

Firma: _____

Número de identificación: _____

Nombre del investigador: _____

Firma: _____

Número de identificación: _____

Anexo 3. Encuesta aplicada a los pacientes con síndrome febril agudo que participaron en el estudio

SEROPREVALENCIA DE SINDROMES FEBRILES EN PACIENTES DEL DEPARTAMENTO DEL META



NOMBRE: _____

SEXO: F ___ M___ EDAD: _____ OCUPACION: _____

DIRECCION: _____ BARRIO: _____

TIEMPO DE RESIDENCIA EN LA VIVIENDA: _____ ESTRATO _____

ZONA: RURAL ___ URBANA ___ CELULAR: _____ TELEFONO: _____

NUMERO TELEFONICO DE DOS FAMILIARES:

A CONTINUACION RESPONDA

1. ¿Hace cuánto tiempo se iniciaron los síntomas actuales?

2. Pertenencia étnica

- Indígena _____
- ROM, Gitano _____
- Raizal _____
- Palenquero _____
- Negro ,Mulato, Afrocolombiano _____
- Otros: _____

3. ¿Ha tenido contacto con ratas en los últimos días?

- Si _____
- No _____

4. ¿Hay presencia de ratas en su vivienda?

- Si ___

- No ___

5. ¿Usted ha tenido contacto con ganado en los últimos días?

- Si ___

- No ___

6. ¿tiene mascotas en su hogar?

- No ___

- Gato ___

- Perro ___

- Bovinos _____

- Equinos _____

- ¿Otros? _____ ¿Cuál (es)? _____

7 ¿Hubo contacto con animales enfermos en los últimos 6 meses?

- Si ___

- No ___

- ¿Cuál (es)? _____

8 Antecedentes de actividades deportivas, de baño o pesca en los últimos 30 días antes del comienzo de los síntomas en:

- Si: ___

- No: ___

- Represas

- Lago/ laguna

- Rio

- Arroyo

9 ¿Hubo inundaciones en la zona en los últimos 30 días?

- Si ___

- No ___

10 ¿Hubo contacto con aguas estancadas durante los últimos 30 días?

- Si ___

- No ___

11 ¿Cuál es su fuente de agua?

- Acueducto
- Rio
- Pozo comunitario
- Tanque de almacenamiento

12 ¿Hay alcantarillas destapadas cerca del domicilio o sitio de trabajo?

- Si__
- No__

13 ¿Disposición de residuos sólidos se realiza por?

- Recolección ____
- Disposición de las basuras alrededor de su casa ____

14 Tiempo de almacenamiento de la basura en casa (cada cuanto pasa el carro de la basura) antes de la disposición final cuanto tiempo almacena la basura en su casa?

- 1-3 días
- 4-7 días
- Más de 7 días

15 ¿Se ha desplazado en los últimos 15 días?

- Si: __
- No: __

16 ¿Antecedentes de dengue?

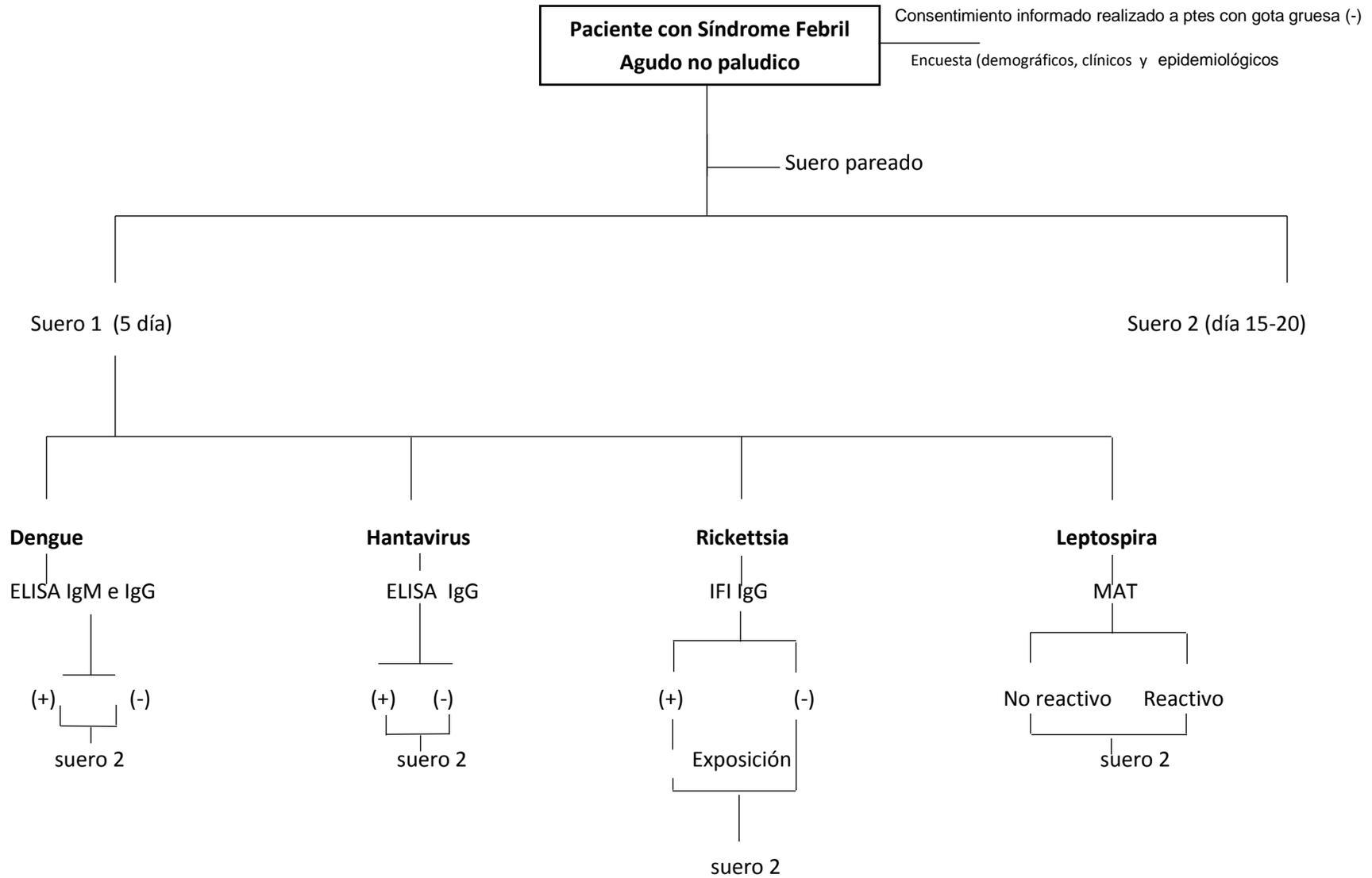
- Si: __
- No: __

17 ¿Algún familiar o conviviente ha tenido sintomatología de dengue en los últimos 15 días?

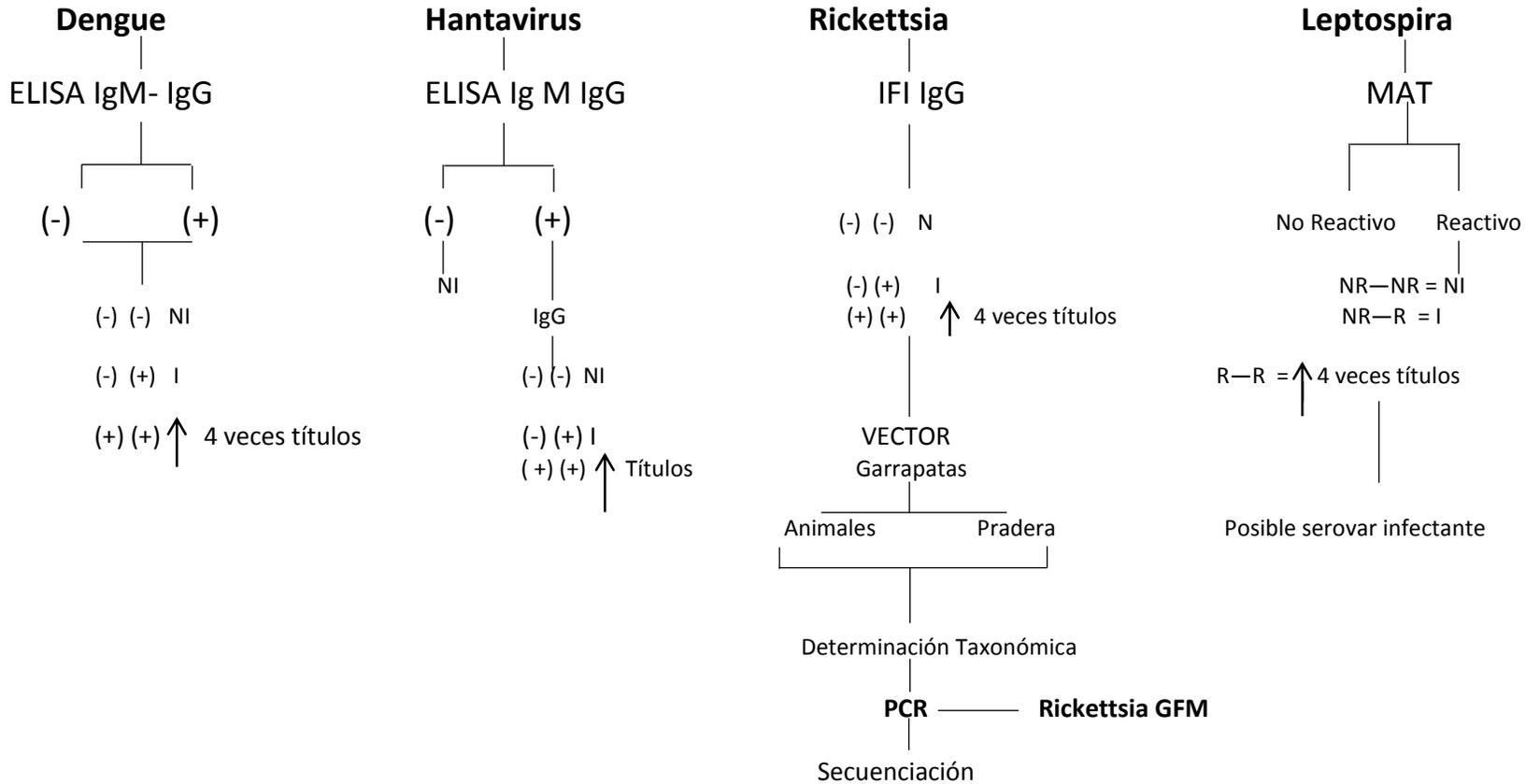
- Si: __
- No: __

18 A continuación se mencionaran algunos síntomas, por favor marque con una x lo que usted haya presentado

Anexo 4. Algoritmo de trabajo



SUERO 2



Anexo 5.

Factores asociados para dengue de pacientes con síndrome febril agudo no palúdico en el Departamento del Meta, Colombia.

VARIABLE	Dengue		No dengue		OR	Mínimo	Máximo	p
	N	%	N	%				
Sexo								
Hombre	23	46,9	26	53,1	1,14	0,73	1,78	0,56
Mujer	21	41,2	30	58,8				
Oficio								
Campo	1	12,5	7	87,5	0,25	0,04	1,6	>0,05
Estudiante	28	50	28	50	-			
Hogar	6	42,9	8	57,1	0,9	0,2	2,4	>0,05
Profesional	3	42,9	4	57,1	0,9	0,4	2,1	>0,05
Varios	6	40	9	60	0,8	0,4	1,6	>0,05
Procedencia								
Villavicencio	36	50	36	50	2,5	0,96	6,4	0,053
Otro municipio	8	28,6	20	71,4				
Diagnóstico								
Leptospira	18	62,1	11	37	2,8	1,16	6,9	0,02
Ninguno	26	36,6	45	63,4				
Factores de riesgo								
Contacto con ratas	11	52,4	10	47,6	1,5	0,58	4,03	0,38
Contacto con ganado	6	28,6	15	71,4	0,43	0,15	1,23	0,11
Contacto con garrapatas	5	50	5	50	1,3	0,35	4,84	0,69
Mascotas	22	48,9	23	51,1	1,44	0,65	3,18	0,37
Contacto con animales enfermos	2	22,2	7	77,8	0,33	0,07	1,7	0,17
Actividades acuáticas								
Si	13	39,4	20	60,6	0,76	0,32	1,76	0,52
No	31	46,3	36	53,7				

VARIABLE	Dengue		No dengue		OR	Mínimo	Máximo	p
Exposición a inundaciones	9	34,6	17	65,4	0,59	0,23	1,49	0,26
Contacto con aguas estancadas	14	45,2	17	54,8	1,07	0,46	2,5	0,88
Fuente de agua								
Acueducto	42	43,3	55	56,7	0,4	0,03	4,4	0,52
Pozo, río o tanque de almacenamiento	2	66,7	1	33,3				
Alcantarillas destapadas	10	38,5	16	61,5	0,74	0,3	1,8	0,51
Disposición de basuras								
1	33	45,8	39	54,2	0,77	0,31	1,9	0,55
2	11	39,3	17	60,7				
Tiempo de almacenamiento de basura								
1 a 3 días	43	45,7	51	54,3	4,2	0,5	38,5	>0,05
Más de 4 días	1	16,7	5	83,3				
Desplazamiento	18	52,9	16	47,1	1,7	0,75	3,99	0,2
Antecedente familiar de dengue	30	42,3	41	57,7	0,78	0,33	1,9	0,58
Síntomas								
Cefalea	41	45,1	50	54,9	1,6	0,4	6,96	0,5
Mialgias	33	44,6	41	55,4	1,1	0,45	2,7	0,84
Artralgias	27	43,5	35	56,5	0,95	0,42	2,2	0,91
Vómito	29	48,3	31	51,7	1,6	0,69	3,5	0,29
Dolor abdominal	30	45,5	36	54,5	1,2	0,52	2,8	0,68
Exantema	29	44,6	36	55,4	1,1	0,47	2,5	0,87
Dificultad respiratoria	12	38,7	19	61,3	0,73	0,31	1,7	0,48
Dolor retroocular	30	52,6	27	47,4	2,3	1,01	5,2	0,05
Diarrea	27	62,8	16	37,2	3,97	1,72	9,2	0,01

Factores asociados a la leptospirosis en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico del departamento del Meta, Colombia.

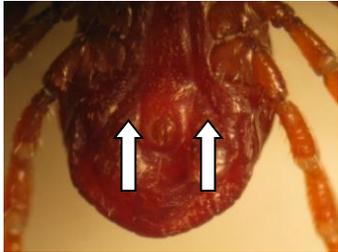
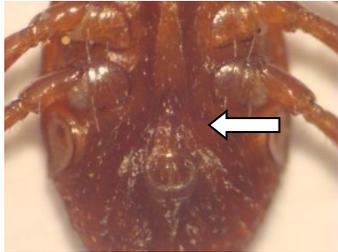
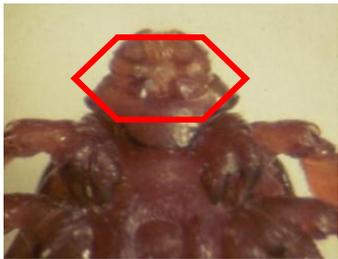
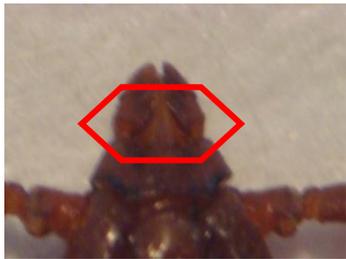
VARIABLE	Leptospirosis		No leptospirosis		OR	Mínimo	Máximo	p
	N	%	N	%				
Sexo								
Hombre	14	28,6	35	71,4	1,04	0,44	2,47	0,93
Mujer	15	29,4	36	70,6				
Oficio								
Campo	2	25,0	6	75,0	0,8	0,2	4,6	>0,05
Estudiante	16	28,6	40	71,4	-			
Hogar	4	28,6	10	71,4	1,0	0,3	3,7	>0,05
Profesional	2	28,6	5	71,4	1,0	0,18	5,7	>0,05
Varios	5	33,3	10	66,7	1,3	0,4	4,2	>0,05
Procedencia								
Villavicencio	23	31,9	49	68,1	1,7	0,62	4,8	0,3
Otro municipio	6	21,4	22	78,6				
Diagnóstico								
Dengue	18	40,9	26	59,1	2,8	1,16	6,9	0,02
Ninguno	11	19,6	45	80,4	-			
Factores de riesgo								
Contacto con ratas	8	38,1	13	61,9	1,7	0,62	4,68	0,3
Contacto con ganado	8	38,1	13	61,9	1,7	0,62	4,68	0,3
Contacto con garrapatas	2	20	8	80	0,58	0,12	2,9	0,51
Mascotas	19	42,2	26	57,8	3,29	1,33	8,13	0,05
Contacto con animales enfermos	2	22,2	7	77,8	0,68	0,13	3,5	0,64
Actividades acuáticas								
Si	7	21,2	26	78,8	0,55	0,21	1,5	0,23
No	22	32,8	45	67,2				
Exposición a inundaciones	9	34,6	17	65,4	1,43	0,55	3,7	0,46

VARIABLE	Leptospirosis		No leptospirosis		OR	Mínimo	Máximo	p
Contacto con aguas estancadas	9	29,0	22	71,0	1,0	0,4	2,6	0,05
Fuente de agua								
Acueducto	27	27,8	70	72,2	0,2	0,02	2,2	>0,05
Pozo, rio o tanque de almacenamiento	2	66,6	1	33,3				
Alcantarillas destapadas	6	23,1	20	76,9	0,67	0,24	1,9	0,44
Disposición de basuras								
1	23	31,9	49	68,1	0,58	0,21	1,63	0,3
2	6	21,4	22	78,6				
Tiempo de almacenamiento de basura								
1 a 3 días	29	30,9	65	69,1	0,69	0,6	0,79	0,11
Más de 4 días	0	0,0	6	100,0				
Desplazamiento	9	26,5	25	73,5	0,83	0,33	2,1	0,69
Antecedente familiar de dengue	53	74,6	18	25,4	0,56	0,22	1,4	0,21
Síntomas								
Cefalea	25	27,5	66	72,5	0,47	0,12	1,91	0,28
Mialgias	25	33,8	49	66,2	2,8	0,87	9,03	0,075
Artralgias	21	33,9	41	66,1	1,9	0,75	4,9	0,17
Vómito	19	31,7	41	68,3	1,4	0,57	3,42	0,47
Dolor abdominal	21	31,8	45	68,2	1,5	0,59	3,9	0,39
Exantema	24	36,9	41	63,1	3,5	1,2	10,3	0,017
Dificultad respiratoria	14	45,2	17	54,8	2,97	1,19	7,36	0,017
Dolor retroocular	20	35,1	37	64,9	2,04	0,82	5,1	0,12
Diarrea	19	44,2	24	55,8	3,7	1,5	9,2	0,04

Factores asociados para infecciones por hantavirus y rickettsia en pacientes con síndrome febril agudo no palúdico en el departamento del Meta, Colombia.

VARIABLE	Otras		No otras		OR	Mínimo	Máximo	p
Acueducto	4	4,1	93	95,9	0,13	0,01	1,5	>0,05
Pozo, río o tanque de almacenamiento	0	0,0	3	100,0				
Alcantarillas destapadas	2	7,7	24	92,3	3,0	0,4	22,5	0,26
Disposición de basuras								
1	3	4,2	69	95,8	0,85	0,09	8,55	0,89
2	1	3,6	27	96,4				
Tiempo de almacenamiento de basura								
1 a 3 días	3	3,2	91	96,8	6,1	0,53	69,3	0,1
Más de 4 días	1	16,7	5	83,3				
Desplazamiento	1	2,9	33	97,1	0,64	0,06	6,4	0,7
Antecedente familiar de dengue	3	4,2	68	95,8	1,24	0,12	12,4	0,86
Síntomas								
Cefalea	4	4,4	87	95,6	1,05	1,0	1,09	0,5
Mialgias	3	4,1	71	95,9	1,06	0,11	10,6	0,96
Artralgias	4	6,5	58	93,5	1,1	1,0	1,14	0,11
Vómito	4	6,7	56	93,3	1,07	1,0	1,15	0,96
Dolor abdominal	2	3,0	64	97,0	0,5	0,1	3,7	0,5
Exantema	4	6,2	61	93,8	1,1	1,0	1,13	0,13
Dificultad respiratoria	3	9,7	28	90,3	7,3	0,7	73,1	0,05
Dolor retroocular	4	7,0	53	93,0	1,1	1,0	1,2	0,07
Diarrea	3	7,0	40	93,0	4,2	0,4	41,9	0,19

Anexo 6. Esquemas de identificación taxonómica de las garrapatas

Esquema para identificación de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	
♂ MACHOS	♀ HEMBRAS
 <p>Surco post-anal claramente marcado. Machos con 2 placas adenales</p>	 <p>Surco post-anal claramente marcado</p>
 <p>Gnatosoma corto, base del capítulo hexagonal</p>	 <p>Gnatosoma corto, base del capítulo hexagonal</p>
 <p>Coxa I con dos espinas largas, palpos tan largos como el hipostomum.</p>	 <p>Coxa I con dos espinas largas, palpos tan largos como el hipostomum.</p>
 <p>Presencia de festones</p>	 <p>Presencia de festones</p>

Esquema para identificación de *Rhipicephalus microplus*

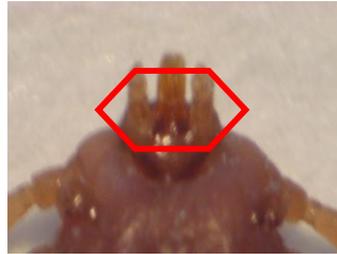
♂ MACHO

♀ HEMBRA



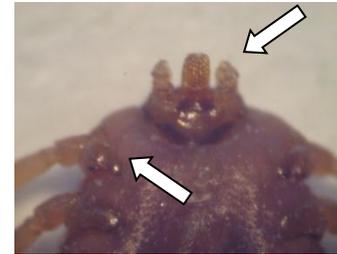
Surco post-anal ausente
Machos con 4 placas adenales

Surco post-anal ausente



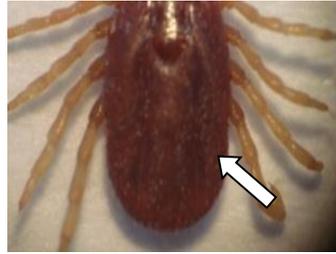
Gnatosoma corto, base del capítulo hexagonal

Gnatosoma corto, base del capítulo hexagonal



Coxa I con dos espinas largas, palpos tan largos como el hipostomum.

Coxa I con dos espinas muy pequeñas, palpos más cortos que el hipostomum. Sin festones.



Sin festones

Sin festones

ESQUEMA PARA IDENTIFICACION DE *Dermacentor nitens*

♂

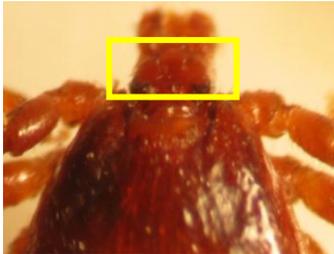
♀



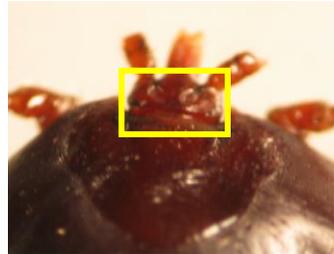
Surco postanal claramente marcado



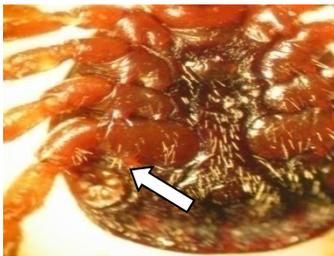
Surco postanal claramente marcado



Gnatosoma corto, base del capítulo rectangular
Ojos presentes



Gnatosoma corto, base del capítulo rectangular
Ojos presentes



Peritrema en forma de disco de teléfono



Peritrema en forma de disco de teléfono

Esquemas de identificación de género de ninfas y larvas.

Ninfas de *Amblyomma* sp



Gnatosoma largo, 4 pares de patas, sin orificio genital.



Gnatosoma largo, 4 pares de patas, sin orificio genital.

Larvas de *Amblyomma* sp



Gnatosoma largo, 3 pares de patas, sin orificio genital.



Gnatosoma largo, 3 pares de patas, sin orificio genital.

Larvas



Gnatosoma corto, 3 pares de patas, sin orificio genital.



Gnatosoma corto, 3 pares de patas, sin orificio genital.

Ninfas



Gnatosoma corto, 4 pares de patas, sin orificio genital.



Gnatosoma corto, 4 pares de patas, sin orificio genital.

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA
DEL AUTOR SOBRE EL
TEMA DE TESIS**

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS

PUBLICACIONES

- **Sánchez L**, Perez N, Pavas N. Dengue: una causa frecuente de síndrome febril agudo en el Departamento de El Meta, Colombia. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 2017; 16(2):255-266
- **Sánchez L**, Mattar S, Contreras V. Primer caso de síndrome hemofagocítico asociado con posible infección con *Rickettsia* spp. del grupo de las fiebres manchadas, Meta, Colombia. *Infectio*. 2017;21(3):192-194
- **Sánchez L**, Mattar S, Rodríguez I, Rodríguez D, Tique V. First serological evidence of Hantavirus infection in humans from the Orinoquia region of Colombia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016; 20 (5): 507-508
- Gómez C, Faccini A, Botero C, Lozano M, **Sánchez L**, Miranda J *et al.* Probable case of spotted fever group rickettsial infection in a new suspected endemic area, Colombia. *Journal of Infection and Public Health* 2017; 10: 353-356
- **Sánchez L**, Mattar S, Rodríguez I, Rodríguez D, Tique V. Infección por hantavirus en pacientes de Villavicencio, Colombia. *Biomédica* 2015;35 (4):91
- Miranda J, **Sánchez L**, Amaya K, Mattar S. Primera prueba serológica de *Rickettsia* sp. del grupo de la fiebre manchada en el departamento del Meta. *Biomedica* 2011;31(Supl):103-13

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

- Encuentro Nacional de Semilleros de Investigación 2014 Villavicencio, Colombia
- Encuentro Nacional de Semilleros de Investigación 2015 Cali, Colombia
- Encuentro Nacional de Semilleros de Investigación 2016, Cúcuta, Colombia
- XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical 2015, Santa Marta, Colombia

**PUBLICACIONES DEL AUTOR
NO RELACIONADAS CON EL
TEMA DE TESIS**

PUBLICACIONES DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON EL TEMA DE

TESIS

- **Sánchez L**, Pavas N, Rojas A, Perez N. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad en pacientes de Villavicencio, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2016;68(1): 40- 50.
- Martínez P, **Sánchez L**, Mattar S. Carbapenemase KPC-2 in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from two clinics from Villavicencio, Colombia. *Braz j infect dis.* 2014;18(1):100–101
- **Sánchez L**. Microbiología y Deporte. *IMPETUS* 2013; 7(8): 89- 93
- Pérez N; Baquero H, Rojas S, Torres H, Forero L, **Sánchez L et al.** *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina asociado a la comunidad en la Orinoquía colombiana: reporte de casos. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo* 2010; 10(3): 181-191.
- **Sánchez L**, Mattar S, González M. Cambios climáticos y enfermedades Infecciosas: nuevos retos epidemiológicos. *MVZ Córdoba* 2009: 14 (3): 1876-1885
- **Sánchez L**, Ríos R, Mattar S. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados en una clínica de Villavicencio, Colombia. *Infectio* 2008; 12 (3): 193-200
- **Sánchez L**, Estupiñan D, Reyes K, Acosta A. Bacterias anaerobias presentes en surco gingival de pacientes con prótesis parcial fija. *NOVA* 2008; 6 (10): 14-19

- Becerra F, Galindo A, Patiño M, **Sánchez L**, Lorente A, Del Portillo P *et al.* Secuenciación de un fragmento amplificado del gen *rpoB* en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. *Medicas UIS* 2003; 17: 107-111
- **Sánchez L**, Londoño D, Arango A, Mattar S. In vitro Activity of antituberculous Agents Against *M. tuberculosis* Isolates from Bogota D.C (Colombia) Evaluated by the E Test. *Diagnost Microbiol Infect Dis* 1999; 35 (1).
- Poutou R, **Sánchez L**, Díaz K, Mattar S. Mecanismos de Resistencia bacterianos a los antibióticos B lactámicos. *Medicas UIS* 1999; 13:172-7
- Mattar S, **Sánchez L**, Perez D, Arango A, Pardi R, Muelle C. In vitro activities of cefepime and other B lactams antibiotics against clinical isolates from a Colombian teaching Hospital. 1998; 42:550-52