

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Importancia de la confirmación microbiológica en un brote de leptospirosis humana en la ciudad de Villa Clara

Lic. Ana Margarita Obregón,<sup>1</sup> Lic. Carmen Fernández,<sup>2</sup> Lic. Islay Rodríguez,<sup>3</sup> Téc. José Rodríguez,<sup>4</sup> Dra. Norma Fernández,<sup>5</sup> y Téc. Gloria Enrique<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se creó un grupo multidisciplinario encargado de confirmar la existencia de leptospirosis humana en la provincia Villa Clara, en la cual a finales del mes de junio de 1997, se produjo un incremento considerable de casos febriles con síntomas y signos compatibles con enfermedades como dengue hemorrágico y leptospirosis humana. El Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras del Instituto "Pedro Kourí", organizó como estrategia de trabajo un conjunto de técnicas directas e indirectas de diagnóstico que sirvieran para confirmar el problema de salud presentado. Como resultados finales, se obtuvieron que los serogrupos Ballum, Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae, fueron los de mayor porcentaje de aparición entre los casos estudiados. Un total de 7 casos presentaron infección activa, fueron positivos por el método de hemaglutinación pasiva. Los 4 casos graves estudiados por hemaglutinación pasiva y por microaglutinación fueron positivos. Resultaron negativos por estas 2 técnicas, los sueros de los 3 pacientes con síndrome febril de etiología desconocida. Las 3 muestras obtenidas de la autopsia de un fallecido fueron reactivas por examen directo en campo oscuro y tinción de la inmunoperoxidasa. Los monosueros de las personas fallecidas fueron altamente reactivos por hemaglutinación pasiva (títulos desde 1-10 y hasta 1-640). Fueron tipados 2 hemocultivos como Ballum; 2 orinas y 1 hemocultivo fueron positivos por reacción en cadena de la polimerasa. De esta forma se ofreció una respuesta rápida a las autoridades de salud pública del Viceministerio de Higiene y Epidemiología de Cuba, al confirmarse microbiológicamente la existencia de la enfermedad, y se sugirió la posibilidad de aplicar la vacuna de producción nacional vax SPIRAL en el área afectada.

**DeCS:** LEPTOSPIROSIS/ diagnóstico; LEPTOSPIROSIS/ epidemiología; TECNICAS MICROBIOLÓGICAS/ métodos; BROTES DE ENFERMEDADES.

La leptospirosis humana puede considerarse como una enfermedad de focalidad natural, existen numerosos animales domésticos y salvajes como reservorios, que son los responsables (junto con otros factores) de la difusión de la enfermedad y de la aparición de epidemias muy frecuentes en determinadas épocas del año, principalmente en los meses de abundantes lluvias.<sup>1</sup>

Desde el punto de vista clínico, la leptospirosis humana desarrolla un cortejo muy amplio de signos y síntomas, los cuales son también muy frecuentes en numerosas enfermedades virales y bacterianas como: dengue hemorrágico, hepatitis y neumonías.

En numerosas ocasiones el diagnóstico clínico se hace muy difícil y necesita la confirmación microbiológica para declarar un caso como positivo.<sup>1</sup>

En Cuba, desde 1981, con la puesta en marcha del programa de control y prevención de la leptospirosis, en la red nacional, se aplica únicamente la técnica serológica de hemaglutinación pasiva (HA) para el diagnóstico de esta enfermedad.

El Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del IPK, desde 1995 ha desarrollado numerosas investigaciones encaminadas a

<sup>1</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología.

<sup>2</sup> Máster en Ciencias. Doctora en Ciencias Veterinarias.

<sup>3</sup> Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología.

<sup>4</sup> Técnico en Microbiología.

<sup>5</sup> Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Microbiología.

<sup>6</sup> Técnico de Laboratorio.

buscar y aplicar nuevos y útiles métodos directos e indirectos de diagnóstico de leptospirosis humana, entre ellos el examen directo en campo oscuro (EDCO), tinciones, cultivo y tipaje, microaglutinación (MAT, siglas en inglés), ELISA, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) y técnicas de hibridización del ADN. Todas estas metodologías están en el presente disponibles en el LNRL.<sup>2-6</sup>

En el mes de junio de 1997 en la provincia de Villa Clara, ciudad de Santa Clara, se produjo un incremento considerable de casos febriles con síntomas y signos compatibles con enfermedades como dengue hemorrágico, leptospirosis humana, etc. En el área afectada existían factores epidemiológicos predisponentes que hacían pensar que la enfermedad que estaba circulando era la leptospirosis humana y que esta entidad era la causa de las muertes reportadas por las autoridades de salud pública de la ciudad de Santa Clara.

Con la realización de este trabajo los autores se propusieron confirmar microbiológicamente si el brote epidémico ocurrido en la provincia de Villa Clara, era de leptospirosis humana.

## MÉTODOS

### MUESTRAS

Fueron estudiadas 244 muestras procedentes de 215 pacientes. De ellas existían: 18 pares de sueros de pacientes con sospecha de leptospirosis y hospitalizados, 171 monosueros de pacientes ambulatorios con sospecha de la enfermedad, 4 pares de sueros de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad, ingresados y en estado crítico o muy grave, 3 monosueros de pacientes con síndrome febril de etiología desconocida, 1 muestra de tejido de hígado, 1 muestra de tejido de riñón y una muestra de tejido de pulmón, obtenidas de la autopsia de un fallecido. De este caso y otro fallecido, 2 sueros. Además un total de 16 muestras de orina y 5 muestras de sangre para el cultivo. Todas las muestras fueron recibidas y estudiadas en el laboratorio de leptospirosis del IPK, en el período comprendido desde los meses de junio y julio de 1997. El criterio para la selección de las

muestras usadas en cada técnica aparece descrito en los lineamientos para el control de la leptospirosis, editado por el comité de expertos de la OMS.<sup>1</sup>

### MÉTODOS ANALÍTICOS

#### *Métodos bacteriológicos rápidos*

Examen directo en campo oscuro (EDCO): metodología descrita en los Lineamientos para el Control y la Prevención de Leptospirosis humana, editado por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>1</sup>

Tinción de la inmunoperoxidasa: técnica descrita por Terpstra WJ y otros.<sup>2</sup> Se usaron antisueros policlonales de referencia, correspondientes a los serogrupos: Pomona, Canicola, Ballum e Icterohamorrhagiae.

#### *Métodos bacteriológicos convencionales*

Cultivo: después de observadas cada siembra, cada 5 d, en aquellas donde haya existido crecimiento, se procedió a realizar subcultivos en medios de Korthof enriquecido, los cuales fueron examinadas durante 40 d. No se descartó ninguna siembra hasta después de los 45 d de haberse inoculado.<sup>1</sup>

Clasificación de los cultivos: se utilizó la técnica de MAT con antisueros policlonales específicos de serogrupos de leptospirosis. La metodología realizada aparece descrita en los Lineamientos para el Control y Prevención editado por la OMS.<sup>1</sup>

#### *Métodos serológicos convencionales*

Técnica serológica de MAT: la metodología realizada aparece descrita en los Lineamientos para el Control de la leptospirosis editado por la OMS.<sup>1</sup>

Técnica serológica de hemaglutinación pasiva (HA): la metodología seguida aparece reportada.<sup>1</sup> Se utilizó el antígeno ESS producido nacionalmente por LABIOFAM.

#### *Métodos de avanzada*

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): el ADN de las muestras fue liberado por métodos

térmicos y osmóticos. Se utilizaron los cebadores Lep-1 y Lep-2 específicos para amplificar un fragmento de 631 pares de bases (pb) correspondientes al gen ARN ribosomal 16-s de *Leptospira interrogans*.<sup>5,6</sup>

Hibridación ADN/ADN (HAN): el producto amplificado fue identificado a través de la HAN mediante la sonda Lin-2 complementaria a la región variable V-2 del mismo gen. En los experimentos se utilizaron, como controles positivos cultivos de cepas de referencia de los 13 serogrupos más frecuentes encontrados en Cuba de *Leptospira interrogans* y como control negativo uno de *Leptospira biflexa*.<sup>5,6</sup>

## RESULTADOS

Un total de 7 casos fueron positivos por el método de HA, de los 18 estudiados, detectándose infección activa, o sea, la presencia de anticuerpos de la clase IgM. A su vez 4 monosueros fueron reactivos de los 171 pacientes sospechosos ambulatorios.

Los 4 casos graves e ingresados fueron estudiados por HA para detectar infección activa y por MAT para conocer el posible serogrupo infeccioso. Todos los casos resultaron positivos por ambas técnicas. Por HA seroconvirtieron de no reactivo a reactivo con títulos que fluctúan desde 1-80 y hasta 1-640. Por MAT de no reactivo a reactivo con títulos que están en el rango desde 1-40 hasta 1-320. Los serogrupos encontrados por MAT fueron: Icterohamorrhagiae, Canicola y Pomona.

Resultaron negativos por HA y MAT los sueros de los 3 pacientes con síndrome febril de etiología desconocida.

Las 3 muestras obtenidas de la autopsia de un fallecido fueron reactivas por EDCO y tinción de la inmunoperoxidasa. De este caso y 2 más, también fallecidos, fueron estudiados monosueros por la técnica de HA, las cuales resultaron reactivas con títulos de 1/10 hasta 1/160, respectivamente. Sin embargo, por la MAT el primer caso fue no reactivo y el segundo reactivo al serogrupo Canicola con un título de 1/160.

Las 5 muestras de sangre, procedentes de los casos ingresados, fueron cultivadas microbiológicamente. Resultaron positivas 2. Se tiparon con

antisueros policlonales y fueron ubicadas dentro del serogrupo Ballum.

Las 16 orinas y los 5 hemocultivos fueron estudiados por PCR. Fueron positivas 2 orinas y 1 hemocultivo, tipado serológicamente por MAT dentro del serogrupo Ballum.

Todos las muestras amplificaron fragmentos de 631 pb. Se mostró señal radioactiva por la HAN utilizando la sonda Lin-2. Ambos métodos permitieron identificar a la especie *Leptospira interrogans* en estas 3 muestras. Resultados similares fueron obtenidos con los cultivos de referencia patógena. Al estudiar las cepas *Leptospira biflexa* de referencia, se obtuvieron resultados negativos.

## DISCUSIÓN

La detección de anticuerpos aglutinantes por diferentes métodos serológicos aplicados al diagnóstico de esta enfermedad, se ve afectada por una terapia agresiva, temprana e indicada antes de la toma de la primera muestra, aunque la respuesta individual de cada persona, también es un importante factor que influye en la detección de estas inmunoglobulinas.<sup>3</sup>

El comportamiento de la respuesta inmune a la leptospirosis es diferente de un organismo a otro. Cuando una persona se pone en contacto por vez primera con las leptospiras, desarrolla una diversidad de síntomas y signos que son diferentes si se comparan con las de otro paciente. De ello depende muy directamente la virulencia y la carga antigénica de la cepa infectante.<sup>3</sup>

Es muy común que existan concomitando en la naturaleza diferentes serogrupos, con sus serovariantes, que a su vez son excretadas al medio ambiente por diferentes reservorios (salvajes o domésticos) portadores de la enfermedad. La infección en el humano es muy probable que se produzca por más de un serogrupo circulante. Si estos serogrupos no están representados en la batería de antígenos usados en la técnica aplicada para la búsqueda de anticuerpos, resultará imposible identificar y clasificar serológicamente el caso en estudio.<sup>3</sup>

Factores como estos, pueden haber influido en los resultados de este trabajo. Por los estudios

epizootiológicos realizados en el área afectada, se reportó un alto índice de infestación por roedores (ratas), animales domésticos abandonados (perros callejeros) y de equinos que son utilizados como medio de transportación urbana, sin embargo, la reactividad por HA no se comportó de igual manera; de todos los casos estudiados solamente fueron encontrados 11 positivos.

La confirmación de un caso de leptospirosis humana, implica obligatoriamente alertar a las autoridades de salud, y así ejecutar todas las normas epidemiológicas para la búsqueda de nuevos casos. La confirmación se realiza por los métodos establecidos por la OMS y el grupo de expertos en leptospirosis.<sup>1</sup>

Los procedimientos técnicos empleados para la liberación del ADN genómico, tanto por la PCR y el HAN, resultan más sencillos y prácticos si se comparan con otros utilizados internacionalmente.<sup>5,6</sup>

Particularmente la sonda Lin-2 (secuencia no reportada en la literatura), fue diseñada en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba. Es específica para marcar el ADN de las cepas patógenas de leptospiras. Se ha demostrado su alta especificidad en estudios donde se usan las cepas de referencia patógenas y saprófitas. Todo esto facilitó la identificación en las 3 muestras estudiadas de la presencia de la especie *L. interrogans*, porque su ADN fue previamente amplificado.

Con los resultados obtenidos se confirmó microbiológicamente la existencia de un brote de leptospirosis humana en la provincia de Villa Clara. Fueron aplicados métodos de diagnóstico directos e indirectos, lo cual permitió brindar una respuesta rápida a las autoridades de salud pública (MINSAP) de Cuba. También estos resultados resultan tener una marcada importancia epidemiológica porque a partir de ellos se sugirió al MINSAP, la aplicación de la vacuna cubana vax SPIRAL en la zona afectada, como parte de las medidas contenidas en el Plan de Acción Emergente aplicado al nivel nacional durante el año 1997.

## SUMMARY

A multidisciplinary group was created to confirm the existence of human leptospirosis in the province of Villa Clara where by the end of June, 1977, there was a considerable increase of febrile cases with symptoms and signs consistent with diseases such as hemorrhagic dengue and human leptospirosis. The National Laboratory of Reference of Leptospire from "Pedro Kourf" Institute, organized a set of direct and indirect diagnostic techniques as a working strategy that would serve to confirm this health problem. As a final result, it was observed that the Ballum, Pomona, Canicola and Icterohaemorrhagiae serogroups showed the highest percentage of appearance among the studied cases. A total of 7 cases had active infection, since they were positives by the passive hemoagglutination method. The four severe cases studied by passive hemoagglutination and microagglutination were positive. Sera from the 3 patients with febrile syndrome of unknown etiology were negative by these 2 techniques. The 3 samples obtained from the autopsy of a dead were positive by direct exam in dark field and staining of immunoperoxidase. The monosera of the dead subjects were highly reactive by passive hemagglutination (titers from 1-10 and up to 1-640). 2 hemocultures were typified as Ballum; 2 urines and 1 hemoculture were positive by polymerase chain reaction. In this way, a fast answer was given to the health public authorities from the Viceministry of Hygiene and Epidemiology of Cuba on confirming microbiologically the existence of the disease. It was suggested to administer the Cuban vax SPIRAL vaccine in the affected area.

**Subject headings:** LEPTOSPIROSIS/ diagnosis; LEPTOSPIROSIS/ epidemiology; MICROBIOLOGICAL TECHNIQUES/ methods; DISEASE OUTBREAKS.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faine S. Guidelines for the Control and Prevention of Leptospirosis.. Geneva:WHO; 1982. Off set publication no. 67.
2. Terpstra WJ, Korver H. Immunoperoxidase staining of leptospire in blood and urine. Zbl Bak Hyg I Abt Orig A 1992;254:534-9.
3. Terpstra WJ. Leptospirosis on the African continent. Proceeding of a CEC-STD 3. Research Meeting. Harare. Zimbabwe. 1992.
4. Gravekamp C, Terpstra WJ. Detection of all species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol Submitted. 1992.
5. Hookey JV. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16s ribosomal DNA. Microbiol Letters 1992;90:267-74.
6. Johansson KE. Oligonucleotide probes complementary to 16s rRNA. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. II. Academic Press. Inc. Edit. J. G. Tully and S. Razin. A-Z. 1996. 29.

Recibido: 15 de mayo de 2002. Aprobado: 19 de febrero de 2003.  
Lic. Ana Margarita Obregón. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu