

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK)

CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA DE CEPAS AISLADAS DE PACIENTES CON LEPTOSPIROSIS HUMANA EN CUBA

Lic. Islay Rodríguez González,¹ Lic. Ana M. Obregón,² Téc. José E. Rodríguez,³ Dra. Carmen Fernández,⁴ Lic. Arelys Arzola,⁵ y Lic. Berta Victoria⁶

RESUMEN

Se estudiaron 204 cepas de leptospiras, obtenidas a partir de hemocultivos de pacientes con leptospirosis humana, procedentes de diferentes regiones del país. Mediante las pruebas de determinación de especie se halló que todas pertenecían al complejo patogénico *Leptospira interrogans*, y al caracterizarlas hasta serogrupo usando 13 sueros hiperinmunes se detectó que los de mayor circulación fueron Ballum, Pomona y Canicola. Por primera vez se encontraron los serogrupos Pyrogenes, Autumnalis y Betaviae, no aislados con anterioridad en pacientes con leptospirosis humana en Cuba. Estos resultados relacionan a los ratones, cerdos y perros como principales reservorios de esta entidad y contribuyen al perfeccionamiento de la vacuna cubana contra la leptospirosis humana.

DeCS: LEPTOSPIRA/isolation & purification; LEPTOSPIRA INTERROGANS/isolation & Purification; LEPTOSPIRA/diagnosis; LEPTOSPIRA/immunology.

La leptospirosis, actualmente una de las zoonosis de mayor difusión en Cuba y en el mundo, es causada por el complejo *Leptospira interrogans* sensu lato.^{1,2} El hombre se infecta al ponerse en contacto directo o indirecto con la orina de roedores, cerdos, bovinos y perros, que son los animales más frecuentemente involucrados en la transmisión de la enfermedad.¹

El cultivo bacteriológico 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 de la cepa infectante.³⁻⁶

Los resultados de los aislamientos son esenciales para los estudios epidemiológicos.

¹ Licenciada en Microbiología. Máster en Ciencias. Aspirante a Investigador. Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL). IPK.

² Licenciada en Microbiología. Máster en Ciencias. Investigadora Auxiliar. LNRL. IPK.

³ Técnico A en Microbiología. LNRL. IPK.

⁴ Doctora. en Medicina Veterinaria. Máster en Ciencias. Investigadora Auxiliar. LNRL. IPK.

⁵ Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora. LNRL. IPK.

⁶ Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora. LNRL. IPK.

gicos, en los que se desea determinar la presencia de leptospiras en la naturaleza y posibles reservorios de cepas que puedan estar afectando al hombre y los animales, así como los principales serogrupos y serovares circulantes en un área determinada. Ello permitirá entonces la formulación de preparados vacunales efectivos contra esta entidad.^{3,4}

En Cuba, los trabajos de identificación y clasificación de cepas de leptospiras han resultado escasos, se han limitado a cepas aisladas de animales y algunos estudios de pacientes, por lo que con este trabajo se decidió realizar por primera vez la caracterización serológica de un amplio grupo de cepas de leptospiras, aisladas de hemocultivos de pacientes con leptospirosis humana, procedentes de diferentes regiones del país.

MÉTODOS

Durante los años 1996-2000 fueron recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras del IPK un total de 228 aislamientos de leptospiras, enviados desde diferentes regiones del país. De ellos, 127 procedían de Holguín, 65 de Villa Clara, 15 de Ciudad de La Habana, 13 de Las Tunas, 5 de Matanzas, 2 de Pinar del Río y 1 de Granma. Después de comprobar su pureza por el método Examen Directo en Campo Oscuro (EDCO), las cepas fueron subcultivadas en medio selectivo para leptospiras (Korthoff modificado + suplemento SVAT)^{3,4} inoculadas a razón de 0,1 mL por cada 5 mL de medio e incubadas a 28-30 °C. Los cultivos fueron observados cada 5 días macro y microscópicamente por EDCO. Para su identificación como cepas patógenas se les realizó la prueba de la 8-azoguanina y el crecimiento a temperatura de 13 °C.⁴

Una vez identificadas las cepas se procedió a la caracterización serológica mediante la técnica de Microaglutinación de Serogrupos con Antígenos Vivos (MAT). Se usaron los sueros hiperinmunes o policlonales correspondientes a 13 serogrupos del complejo *L. Interrogans* (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Ballum, Pyrogenes, Hebdomadis, Tarassovi, Sejroe, Australis, Grippotyphosa, Bataviae, Autumnalis y Shermani). Para ello se aplicó el procedimiento descrito en los Lineamientos para el Control de la leptospirosis, editado por el Comité de Expertos de la OMS.³

RESULTADOS

Al realizar las pruebas de determinación de especie al grupo de cepas en estudio se halló que todas pertenecían al complejo patogénico *L. Interrogans*, ya que respondían negativamente a éstas.

Los resultados de la caracterización serológica de las cepas se detallan en la tabla.

Al determinar la frecuencia porcentual de aparición de cada uno de los serogrupos resultantes se determinó que el serogrupo Ballum estaba presente en el 55,70 % (127/228) de las cepas estudiadas, Pomona en el 22,80 % (52/228), Canicola 14,03 % (32/228), Icterohaemorrhagiae 1,75 % (4/228), Pyrogenes 1,31 % (3/228), Tarassovi 1,31 % (3/228), Australis 0,87 % (2/228), Hebdomadis 0,87 % (2/228), Sejroe 0,43 % (1/228), Autumnalis 0,43 % (1/228) y Bataviae 0,43 % (1/228).

DISCUSIÓN

Las especies de leptospiras patógenas para el hombre se encuentran ubicadas

TABLA. Resultados de la caracterización serológica por MAT de las cepas estudiadas, según su procedencia.

Procedencia	No. de cepas estudiadas	Serogrupo	No. de cepas por serogrupo
Holguín	127	Ballum	82
		Pomona	24
		Canicola	19
		Pyrogenes	1
		Australis	1
Villa Clara	65	Ballum	32
		Pomona	20
		Canicola	4
		Tarassovi	3
		Icterohaemorrhagiae	2
		Hebdomadis	2
		Pyrogenes	1
Ciudad de La Habana	15	Australis	1
		Canicola	5
		Pomona	4
		Ballum	3
		Icterohaemorrhagiae	2
Las Tunas	13	Pyrogenes	1
		Ballum	7
		Pomona	4
Matanzas	5	Canicola	2
		Ballum	3
		Canicola	2
		Bataviae	1
Pinar del Río	2	Autumnalis	1
Granma	1	Sejroe	1

taxonómicamente dentro del complejo *L. Interrogans*,² por lo que son válidos los resultados encontrados al realizar las pruebas de determinación de especie a los aislamientos en estudio, ya que todos provenían de muestras de sangre humana.

Los resultados de la caracterización serológica mostraron que en diferentes regiones del país circulan serogrupos comunes como: Ballum, Pomona y Canicola, aunque se encuentran algunos específicos en determinadas regiones. De forma general se detectaron 11 serogrupos diferentes y prevaleció Ballum, seguido por Pomona y Canicola como los principales, aunque también se encontraron otros serogrupos que no habían sido aislados de pacientes con leptospirosis humana en Cuba como:

Pyrogenes, Autumnalis y Bataviae. Estos dos últimos fueron aislados y precharacterizados en una misma región, mientras que el primero fue aislado en tres regiones diferentes pertenecientes al occidente, centro y oriente del país.

Sobre los hallazgos del estudio debe mantenerse una estrecha vigilancia microbiológica, epidemiológica y epizootiológica, pues estas cepas podrían formar parte de la estructura antigénica de nuevas formulaciones vacunales, tanto de uso humano como veterinario. Internacionalmente se informan con frecuencia nuevos serovares de leptospirosis,⁷ lo que hace que la taxonomía de este grupo bacteriano se mantenga en un constante cambio, como consecuencia también del surgimiento e incorpora-

ción de nuevos métodos que permiten dirigir el estudio de las cepas a niveles moleculares.⁸⁻¹⁰

En Cuba hasta el comienzo de la década del '90, los principales grupos de riesgo eran inmunizados con una vacuna soviética constituida por serovares de los serogrupos *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Pomona* y *Hebdomadis*.¹¹ A causa del ascenso brusco de casos de leptospirosis que se produjo en el país por la reducción en la importación y aplicación de este producto, se decidió la elaboración de la primera vacuna cubana contra esta entidad a partir de 1994 y se utilizaron para ello cepas autóctonas. No debe dejar de mencionarse que en algunas de las regiones estudiadas, los principales grupos de riesgo han sido inmunizados con este preparado vacunal constituido por los serovares *Copenhageni*, *Canicola* y *Mozdok* pertenecientes a los serogrupos *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* y *Pomona* respectivamente.¹² Esto pudiera explicar la alta prevalencia del serogrupo *Ballum*, el cual no integra hasta el momento, la batería antigénica de dicho inmunógeno. Quizás ésta pudiese ser también la causa de que el serogrupo *Icterohaemorrhagiae* haya sido aislado en menor proporción.

A pesar de la importancia que presenta el aislamiento y caracterización de cepas de leptospirosis, no solo desde el punto de vista epidemiológico y de la formulación de preparados vacunales, sino también por la asociación que se puede establecer entre éstas con determinados cuadros clínicos, no se ha podido implantar este estudio en todas las provincias del país, dadas las características especiales que tiene el hemocultivo que requiere medios de cultivos específicos, muy ricos y fácilmente contaminables, así como largos períodos de incubación por la lenta velocidad de crecimiento de esta bacteria.^{1,3,4} Es por ello que no se cuenta con investigaciones anteriores

similares en extensión al presente estudio. El trabajo de Regalado y colaboradores durante el período de 1987 a 1989, al aislar y caracterizar 22 cepas de leptospirosis a partir de muestras de sangre humana, conjuntamente con otras cinco aisladas de agua y suelo, provenientes de Ciego de Ávila, Camagüey, Holguín y Las Tunas, hallaron que éstas pertenecían a los serogrupos *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Australis*, *Canicola* y *Hebdomadis*.¹³ Posteriormente, Saltarén, durante 1996 al elaborar sueros hiperinmunes contra diferentes serogrupos de leptospirosis, estudió 20 cepas obtenidas de hemocultivos en la provincia de Holguín y resultaron *Ballum*, *Canicola* y *Pomona* los únicos serogrupos encontrados. [Saltarén A. Agrupación serológica de cepas de leptospirosis por el método de aglutinación microscópica con sueros hiperinmunes (trabajo para optar por el título de Máster en Ciencias). C. de La Habana. Instituto "Pedro Kouri", 1996.]

Como es conocido, las leptospirosis se encuentran habitualmente en determinadas especies animales, lo que les confiere el estado de huésped o reservorio.⁴ Según los resultados obtenidos puede pensarse que las principales especies relacionadas con la enfermedad en estas regiones son los ratones, cerdos y perros, que se corresponden fundamentalmente con los serogrupos *Ballum*, *Pomona* y *Canicola* respectivamente. Esto constituye una llamada de alerta desde el punto de vista epidemiológico y epizootológico, que facilita dirigir una serie de medidas de control hacia estos grupos.

El presente trabajo contribuye al conocimiento de la epidemiología de la zoonosis de referencia en Cuba, por constituir el primer estudio de un amplio número de cepas de leptospirosis aisladas en seres humanos y provenientes de diferentes regiones del país.

SUMMARY

204 strains of leptospire were obtained from the hemocultures of patients with human leptospirosis from different regions of the country. On using the species identification tests, it was found that all of them belonged to the *Leptospira interrogans* pathogenic complex and on characterizing them up to serogroup by using 13 hyperimmune sera, it was detected that Ballum, Pomona and Canicola had the highest circulation. For the first time, the Pyrogenes, Autumnalis and Betaviae serogroups, which had not been previously isolated in patients with human leptospirosis in Cuba, were found. According to these results, rats, pigs and dogs are the main reservoirs of this entity and they contribute to the improvement of the Cuban vaccine against human leptospirosis.

Subject headings: LEPTOSPIRA/isolation & purification; LEPTOSPIRA INTERROGANS/isolation & purification; LEPTOSPIROSIS/diagnosis; LEPTOSPIROSIS/immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mc Clain JB. Leptospirosis. En: Cecil RF, Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC. Tratado de Medicina Interna. 19 ed. México, DF: Mc Graw-Hill, 1994;vol 2:2067-69.
2. Baranton G, Old IG. The spirochaetes: a different way of life. Bull Inst Pasteur 1995;93:63-95.
3. WHO. Guidelines for the control of leptospirosis. 1982. (Publication Científica; No. 67).
4. Tersptra WJ, Hartskeerl RA, Smith HL, Korver H. International course in laboratory techniques for the diagnosis of leptospirosis. Amsterdam: KIT (Royal Tropical Institute), 2000.
5. Mazzonelli J. Técnicas actuales de laboratorio de diagnóstico de leptospirosis. Rev Lab 1984;77(457):9-18.
6. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995;172(1):281-5.
7. Korman TM, Globan MS, Smythe LD. Leptospirosis in a returned traveller: isolation of a new *Leptospira* serovar. NZ J Med 1997;27:716.
8. Ramadas P, Meerrarani S, Venkatesha MD, Senthikumar A, Nachimuthu K. Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. Int J Syst Bacteriol 1997;47(2):575-6.
9. Brown PD, Levett PN. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. J Med Microbiol 1997;40(2):173-81.
10. Letocart M, Baranton G, Perolat P. Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. J Clin Microbiol 1997;35(1):248-53.
11. Cruz R, Rodríguez P, López C, Atienzar E, Abreu J, Aldana F. Reactogenicidad a la vacuna humana antileptospirósica en Cuba. Rev Cubana Hig Epid 1986;24(4):407-12.
12. Martínez R, Obregón AM, Pérez A, Baly A, Díaz M, Baró M. Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. Rev Cubana Med Trop 1998;50(2):159-66.
13. Regalado JD, López C, Saltarén A, Atienzar E. Identificación de cepas de *Leptospira* de distintas procedencias. Rev Cubana Med Trop 1992;44(1):33-6.

Recibido: 20 de diciembre de 2000. Aprobado: 13 de septiembre de 2001.

Lic. *Islay Rodríguez González*. Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí». Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.