

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Confirmación microbiológica de 2 brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba

Lic. Islay Rodríguez González,¹ Dra. Carmen Fernández Molina,² Lic. Ana Margarita Obregón,³ Lic. Yarelys Zamora Martínez,⁴ Téc. José E. Rodríguez Silveira,⁵ Lic. Nadia M. Rodríguez Preval,⁶ Dr. Denis Berdasquera Corcho⁷ y Dra. Alina Llop Hernández⁸

RESUMEN

Se estudiaron muestras clínicas de 293 pacientes con sospechas de leptospirosis, para la confirmación microbiológica de estos eventos, durante los meses de octubre-diciembre de 2005 cuando se produjeron en Cuba 2 brotes epidémicos en humanos. Se analizaron sueros de pacientes, tanto en la fase aguda como convaleciente, así como hemocultivos realizados antes del comienzo del tratamiento con antibióticos. Para el diagnóstico serológico se emplearon técnicas convencionales (hemaglutinación pasiva y microaglutinación de serogrupos) y de avanzada o de diagnóstico rápido (Lepto tek Dri-Dot, Lepto-Cuba, Látex-India, Lepto tek Lateral Flow). Dentro del brote I se confirmaron por las pruebas serológicas 26 % (22/84) de los individuos estudiados, y a partir de hemocultivos 25 % (5/20), mientras que en el brote II se confirmaron serológicamente 48 casos de 162 estudiados (30 %), y se obtuvo aislamiento de leptospiras en 6 casos de 27 procesados (22 %). Las principales serovariedades encontradas serológicamente fueron Canicola, Ballum, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Los métodos de diagnóstico rápido fueron herramientas útiles como pesquisa en los casos más graves o de edad pediátrica. Se confirmó que la causa de los 2 eventos epidemiológicos ocurridos fue la infección por leptospiras patógenas, lo que contribuyó a la toma de medidas higiénico-sanitarias en las 2 provincias.

Palabras clave: Leptospirosis, brotes epidemiológicos, diagnóstico.

La leptospirosis es considerada hoy día como una enfermedad infecciosa emergente en diversos países, mientras en otros es identificada como reemergente, dada la frecuencia de brotes epidemiológicos ocurridos durante los últimos 10 años.¹⁻⁴

El espectro de la enfermedad humana causada por leptospiras es extremadamente amplio, puede variar desde una infección subclínica hasta un

síndrome severo de infección multiorgánica con elevada mortalidad.^{1,5}

Esta enfermedad en Cuba tiene un comportamiento endémico-epidémico con un carácter cíclico-estacional, donde se registra históricamente la mayor morbilidad durante los meses de agosto a diciembre. Las principales dificultades confrontadas en la prevención y el control de la leptospirosis han estado asociadas con la alta

¹ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciado en Microbiología. Investigador Agregado. Profesor Instructor.

² Máster en Ciencias. Doctora en Medicina Veterinaria. Investigadora Auxiliar. Profesor Instructor.

³ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Auxiliar. Profesor Instructor.

⁴ Máster en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora. Profesora Instructora.

⁵ Técnico en Microbiología.

⁶ Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.

⁷ Especialista de II Grado en Epidemiología. Investigador Agregado. Profesor Asistente.

⁸ Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Titular y de Mérito. Profesora Titular y Consultante.

infestación de roedores, presencia de perros y cerdos en las ciudades, deficiente tratamiento de los residuales pecuarios y limitada disponibilidad de medios de protección, así como el régimen de lluvia.⁶

El comportamiento de esta entidad en Cuba ha estado enmarcado en 3 etapas bien diferenciadas: la primera (entre 1980 y 1990) presentó una tendencia ligeramente ascendente, la segunda (de 1991 a 1994) se caracterizó por un marcado aumento del número de casos, mientras que durante la tercera etapa (de 1995 a 2002), se observó una franca reducción, la cual se mantuvo hasta 2004, pues durante 2005 el número de casos se incrementó.⁷

Durante los meses de octubre-diciembre de 2005 se produjeron 2 eventos epidemiológicos en humanos, en 2 provincias cubanas. Según las manifestaciones clínicas presentadas en los diferentes pacientes, y tomando en consideración las situaciones epidemiológicas existentes, unido a las abundantes precipitaciones ocurridas con anterioridad, después de un largo período de sequía, llevaron a pensar que se trataba de leptospirosis, por lo que el Laboratorio Nacional de Referencia de Leptospiras (LNRL) del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) como parte de un grupo multidisciplinario especializado, se propuso realizar la confirmación microbiológica de estos eventos en cada una de las provincias implicadas.

MÉTODOS

MUESTRAS

Fueron estudiadas muestras de sueros y hemocultivos de 293 individuos con sospechas de leptospirosis humana, de ellos 104 procedentes del Brote I y 189 del Brote II.

Las muestras de sueros fueron tomadas al comienzo de los síntomas de cada uno de los pacientes, y en algunos se tomó una segunda muestra de suero a intervalos de 7-10 d después de haber tomado la primera.

Las muestras de sangre para realizar hemocultivos fueron tomadas durante el pico febril de cada paciente, antes del comienzo del tratamiento con antibióticos.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Métodos serológicos convencionales

Hemaglutinación pasiva (HA): se realizó e interpretó según lo reportado en el Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis Humana en Cuba, utilizando como antígeno la sustancia sensibilizante de eritrocitos (ESS) producido por la Empresa LABIOFAM.⁶

Microaglutinación de serogrupos con antígenos vivos (MAT): la metodología empleada, así como la interpretación de los resultados aparecen descritas en los *Lineamientos para el Control y Prevención de la Leptospirosis*, editado por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud.⁸ Se utilizó como dilución inicial del suero 1:10.⁹

Métodos de diagnóstico rápido

Lepto tek Dri-dot: fue utilizado el paquete comercial Lepto Tek Dri-Dot (*Organon Teknika*) siguiendo las instrucciones de su productor.

Lepto-Cuba: se utilizó el reactivo látex acoplado a 4 antígenos de leptospira, elaborado en el LNRL del IPK, y nombrado Lepto-Cuba.¹⁰ Se mezclaron 10 mL del reactivo con 10 mL del suero problema sobre una tarjeta de aglutinación, esta se agitó suavemente durante 3 min como máximo, y se procedió a la lectura, resultó positivo aquel donde se observó aglutinación franca en sobrenadante claro.

Látex-India: para esta prueba se utilizaron partículas de látex sensibilizadas con proteínas purificadas de leptospiras, elaboradas previamente en el Centro Colaborador OPS/OMS para la Vigilancia, Docencia, Investigación y Diagnóstico en Leptospirosis de Port Blair, Islas Andaman-Nicobar, La India. De manera general, sobre una tarjeta de aglutinación se mezclaron 10 mL de las partículas de látex y 5 mL del suero problema, esta se agitó con movimientos rotativos durante 30 s, finalizó entonces con la lectura de la reacción a partir de la aparición de aglutinaciones francas en sobrenadante claro.

Lepto tek Lateral Flow: se utilizó el paquete comercial Lepto Tek Lateral Flow (*Organon*

Teknika) siguiendo las instrucciones de su productor.

Métodos bacteriológicos

Hemocultivo

Se aplicó la metodología que se describe en el Programa Nacional de Prevención y Control de la Leptospirosis Humana en Cuba,⁶ con algunas modificaciones. Se utilizaron 2 frascos pequeños con tapa de goma y retapa metálica por paciente, cada frasco contenía medio de cultivo selectivo para leptospiras, los cuales fueron preparados en el LNRL del IPK. Puncionando la tapa de goma de cada uno de los frascos, con la misma aguja que se realizó la extracción de sangre al paciente, se adicionaron 1 y 2 gotas de esta, respectivamente, en cada frasco. Los frascos inoculados fueron transportados rápido al LNRL para su procesamiento.

CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS CASOS

Criterios de positividad

Se consideró caso positivo de leptospirosis a todo individuo en el que se obtuvo uno de los criterios siguientes:⁶

- Aislamiento de leptospira a partir de hemocultivo.
- Seroconversión o incremento de título (4 veces) en sueros pareados por HA y/o MAT.

- Título significativo por HA ($\geq 1:80$) y/o MAT ($\geq 1:160$) al estudiar una única muestra de suero, y reactividad en pruebas de diagnóstico rápido.

Se consideró caso negativo de leptospirosis al que no mostró los resultados anteriores al estudiar un hemocultivo o un par de sueros.

Criterios de reactividad

Se consideró caso reactivo a leptospirosis cuando se obtuvo uno de los criterios siguientes:⁶

- Incremento inferior a 4 veces del título por HA y/o MAT en sueros pareados.
- Títulos no significativos por HA ($\leq 1:80$) y/o MAT ($\leq 1:160$) y/o reactividad en pruebas de diagnóstico rápido en una única muestra de suero.

Se consideró caso no reactivo de leptospirosis cuando no se obtuvo reactividad serológica en las pruebas utilizadas al emplear una única muestra de suero.

RESULTADOS

La duración media entre el comienzo de los síntomas y la toma de la primera muestra de suero para ambos brotes fue de 3,1 d, y el rango estuvo entre 0-7 d.

Los resultados mediante las pruebas serológicas y bacteriológicas en las muestras estudiadas aparecen reflejados en la tabla.

TABLA. Resultados de la aplicación de las pruebas serológicas y bacteriológicas a las muestras procedentes de los individuos con sospechas de leptospirosis en los 2 brotes epidémicos

Brote	Pruebas serológicas				Prueba bacteriológica		Total casos positivos
	Caso positivo	Caso negativo	Caso reactivo	Caso no reactivo	Caso positivo	Caso negativo	
I	26 % (22/84)	1 % (1/84)	20 % (17/84)	53 % (44/84)	25 % (5/20)	75 % (15/20)	26 % (27/104)
II	30 % (48/162)	3 % (5/162)	30 % (49/162)	37 % (60/162)	22 % (6/27)	78 % (21/27)	29 % (54/189)

La seroprevalencia de anticuerpos a leptospiras, mediante los diferentes métodos serológicos, fue de 44 % (39/104) en el Brote I, y 60 % (97/189) en el Brote II, lo que demuestra el nivel de exposición de los individuos estudiados a fuentes contaminadas por leptospiras.

Las principales serovariedades de leptospiras detectadas serológicamente en estos pacientes fueron, en orden decreciente, Canicola, Ballum, Icterohaemorrhagiae y Pomona.

Los aislamientos de leptospiras se encontraban caracterizándose desde el punto de vista serológico y molecularmente, en el momento en que se redactó el presente trabajo.

DISCUSIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica muy frecuente en Cuba y otros países tropicales, sin embargo, en ocasiones es subdiagnosticada por causa de los síntomas no específicos asociados a la infección, y a las dificultades relacionadas con su diagnóstico; se necesita entonces de la implementación de ensayos simples, confiables, rápidos y económicos.^{1,5}

La detección de una respuesta inmune temprana continúa siendo difícil por los métodos existentes en la actualidad, esta baja sensibilidad temprana explica que no se hayan detectado anticuerpos en todos los pacientes investigados con sospechas clínico-epidemiológicas, teniendo en cuenta la corta duración entre la aparición de los síntomas o signos y la toma de la primera muestra de suero.

En ocasiones los picos en los títulos de anticuerpos no son detectados hasta 2-3 semanas después del comienzo de la infección.^{4,5}

En esta investigación el diagnóstico inicial se realizó por medio de la técnica de HA. En los casos graves o con alguna complicación clínica, así como en los casos de edad pediátrica se aplicaron también métodos de diagnóstico rápido para el pesquiasaje, esto permitió ofrecer una respuesta oportuna al personal médico de asistencia y apoyar de esta forma la toma de decisiones terapéuticas. Se conoce que la orientación y aplicación de un tratamiento con antibióticos es correcto aun antes de conocer la respuesta del diagnóstico

microbiológico, porque puede tardar hasta semanas-meses, siempre que exista la sospecha clínico-epidemiológica de la infección.⁵

Para la confirmación de caso es necesario el trabajo con pares de sueros, mecanismo que dificulta aún más la investigación; factores como este pueden ocasionar un subregistro de algunos casos positivos a leptospirosis.^{1,5,6}

Las pruebas rápidas han sido utilizadas también en Cuba a pacientes con sospechas de leptospirosis no asociados a brotes epidémicos. Se ha demostrado siempre su aplicabilidad y utilidad.^{11,12} El diagnóstico confirmatorio en el presente trabajo fue realizado por la técnica MAT como método de referencia internacional, utilizando los serovares de mayor circulación en el país. Se comprobó la existencia de correspondencia entre las serovariedades encontradas como posibles agentes infectantes y las ya reportadas como principales en Cuba a partir de aislamientos y serología,¹³ lo que sugiere una vez más que el serogupo Ballum debe incluirse en la vacuna cubana de uso en humanos, e incrementar también el número de individuos inmunizados con esta vacuna.

El aislamiento de leptospiras a partir de los hemocultivos es de gran importancia, pues aunque no ofrece un diagnóstico temprano de la infección, sino retrospectivo, permite su confirmación, así como conocer con exactitud cuál es la serovariante de leptospira responsable de la infección y circulante en cada región geográfica. El empleo de la metodología modificada permitió disminuir el grado de contaminación en los cultivos, y además la nueva presentación garantiza una transportación más segura hacia el LNRL en el IPK.

La aplicación y combinación de las principales pruebas disponibles para el diagnóstico microbiológico de la leptospirosis humana, permitió realizar el diagnóstico y la confirmación de los casos de leptospirosis, lo que contribuyó a la confirmación clínico-epidemiológica y microbiológica de los 2 brotes presentados en las 2 provincias cubanas, y esto a su vez contribuyó a la toma de medidas higiénico-sanitarias en cada región implicada, que ayudaron al control y prevención de la enfermedad en cada territorio.

Microbiological confirmation of two emergent outbreaks of human leptospirosis in Cuba

SUMMARY

Clinical samples from 293 patients with suspicion of leptospirosis were studied for the microbiologic confirmation of these events, in October-December 2005, when there were 2 outbreaks in humans, in Cuba. Sera samples of patients in acute phase and during convalescence, as well as hemocultures performed before the beginning of the antibiotic therapy, were analyzed. Conventional techniques (passive hemagglutination test and serogroups hemagglutination), and advanced or fast diagnosis techniques (Lepto tek Dri-Dot, Lepto-Cuba, Latex-India, Lepto tek Lateral Flow) were used for serologic diagnosis. In outbreak I, 26 % of the studied cases were confirmed by serological tests (22/84), and 25 % (5/20) through hemocultures; whereas in outbreak II, 48 of the 162 studied cases (30 %) were serologically confirmed, and it was possible to obtain isolation of leptospire in 6 of the 27 processed cases (22 %). The main serovariants found by serology were Canicola, Ballum, Icterohaemorrhagiae, and Pomona. The rapid diagnosis methods were useful screening tools in the most severe cases or at pediatric ages. The two epidemiologic events were caused by pathogenic leptospire infection, which contributed to the adoption of hygienic-sanitary measures in both provinces.

Key words: Leptospirosis, epidemiologic outbreaks, diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):296-326.
2. Suárez M, Martínez R, Posada PE, Vidal I, Bravo F, Sánchez A. Brote de leptospirosis humana en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32(1): 13-8.
3. Obregón AM, 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.
4. Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajan M, Braga S, et al. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9(6):702-7.
 5. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne: MediSci; 1999
 6. Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional de Prevención y Control de la leptospirosis humana. Cuba: MINSAP; 1998.
 7. Cruz R. Estrategia cubana para el control y prevención de la leptospirosis en Cuba. *Rev Latinoam Microbiol* 2002;44 (Supl.):SD5.
 8. WHO-ILS. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: WHO; 2003.
 9. Hartskeerl RA, Smits HL, Korver H, Goris MGA, Terpstra WJ, Fernández C, et al. International course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. La Habana: Palcograf; 2006.
 10. Obregón AM, Fernández C, Rodríguez I, Balbis Y, Martínez B, Rodríguez J. Sistema de aglutinación con látex para el diagnóstico rápido de la leptospirosis en Cuba. *Rev Panam Salud Publica* 2004;16(4):259-65.
 11. Rodríguez I, Fernández C, Llerena C, Victoria B, Rodríguez JE, Obregón AM. Lepto dipstick: resultados de su aplicación al diagnóstico rápido de la leptospirosis humana. *Rev Cubana Med Trop* 2002;54(1):44-7.
 12. Martínez B, Obregón AM, Fernández C, Rodríguez J, Rodríguez I. Lepto tek lateral flow: un método para el diagnóstico rápido de la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2005;43(1).
 13. Rodríguez I, Obregón AM, Rodríguez JE, 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.

Recibido: 29 de noviembre de 2006. Aprobado: 12 de diciembre de 2006.

Lic. *Islay Rodríguez González*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía, km 6 ½, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: islay@ipk.sld.cu