

LEPTOSPIROSIS HUMANA: ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO Y AISLAMIENTOS DE CEPAS DE CANINOS A RAIZ DE UN CASO FATAL

HUMAN LEPTOSPIROSIS: EPIDEMIOLOGIC STUDY AND ISOLATION OF A STRAIN OF FATAL CASE FROM DOGS

R Caminoa¹, D Pássaro¹, V Schamunn¹, JC Garcia²,
N Fernandez³, ND Di Croce³

¹Laboratorio Central de Salud Pública Provincia de Buenos Aires,
²Hospital de Magdalena, ³Zoonosis de municipalidad de Magdalena.

Resumen *La Leptospirosis es una zoonosis de gran difusión en el mundo producida por bacterias del género Leptospira. Dichas bacterias pertenecen taxonómicamente al orden Spirochaetales y presentan tres características esenciales: disposición helicoidal del citoplasma alrededor de un filamento axial, extrema flexibilidad y gran movilidad. El hombre es un hospedador accidental y final de la cadena epidemiológica pues la transmisión directa de persona a persona es rara. Las manifestaciones clínicas en los individuos afectados varían desde casos inaparentes hasta casos mortales. La enfermedad cursa con fiebre repentina, cefaleas escalofríos, mialgias, especialmente en las pantorrillas y muslos, con inyección conjuntival. Este cuadro puede agravarse, dando insuficiencia hepatorenal, trastornos meníngeos y respiratorios, hemorragias y muerte. El objetivo de este trabajo es informar las acciones realizadas y los resultados obtenidos a partir de un caso fatal ocurrido en la localidad de Magdalena, Provincia de Buenos Aires, Argentina en el verano del 2004.*

Abstract *Leptospirosis is a zoonosis of great diffusion in the world taken place by bacterias of the gender Leptospira. This bacterias belong taxonomically to the order Spirochaetales and they present three essential characteristics: helical disposition of the cytoplasm around a filament axial, extreme flexibility and great mobility. The man is an accidental and final host of the epidemic chain because person's direct transmission to person is strange. The clinical manifestations in the affected individuals vary from cases with no clinical signs until mortal cases. The illness studies with sudden fever, migraines chills, muscular pain, especially in the calves and thighs, with conjunctival injection. This signs can be increased, giving inadequacy hepatorenal, dysfunctions meninges and breathing, hemorrhage and death. The objective of this work is to inform the carried out actions and the results obtained starting from a fatal case happened in Magdalena's town, Buenos Aires Province, Argentina in the summer of the 2004.*

Palabras clave Leptospirosis-humano-canino

Key Words Leptospirosis-human-dog

INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una zoonosis de gran difusión en el mundo producida por bacterias del género *Leptospira*. Dichas bacterias pertenecen taxonomicamente al orden Spirochaetales y presentan tres características esenciales: disposición helicoidal del citoplasma alrededor de un filamento axial, extrema flexibilidad y gran movilidad. Estos movimientos son de 4 tipos: rotación, traslación, flexión y perforación en medios semisólidos. Esta propiedad sería la responsable de la penetración de las *Leptospiras* a través de la piel y mucosas. Debido a su extrema delgadez (0,1µm de espesor) atraviesan los filtros de membrana esterilizables con tamaño de poro de 0,22 µm.

El género *Leptospira* en la actualidad se divide en varias especies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. fainei*, *L. Weillii*, *L. inadai*, *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. parva* (16,17,18,19), pero desde el punto de vista serológico se mantiene la clasificación en 2 especies: *L. interrogans* agrupa a todas las *Leptospiras* patógenas y *L. biflexa* que reúne a todas las formas no patógenas de vida libre o acuícola.

La especie *L. interrogans* esta formada por 25 serogrupos que contienen a más de 250 serovares (1). Algunos serogrupos de *Leptospiras* están asociados a determinadas especies animales (*Canicola* a perros; *Pomona*, a cerdos, *Icterohaemorrhagiae* a las ratas y *sejroe* a bovinos). Aunque cada uno de estos serogrupos pueden infectar a otros hospedadores.

El hombre es un hospedador accidental y final de la cadena epidemiológica pues la transmisión directa de persona a persona es rara. Las manifestaciones clínicas en los individuos afectados varían desde casos inaparentes hasta casos mortales. La enfermedad cursa con fiebre repentina, cefaleas escalofríos, mialgias, especialmente en las pantorrillas y muslos, con inyección conjuntival. Este cuadro puede agravarse, dando insuficiencia hepatorenal, trastornos meníngeos y respiratorios, hemorragias y muerte.

Los datos de laboratorio indican eritrosedimentación acelerada superior a 50 mm durante la primera hora, neutrofilia y discreta plaquetopenia, entre otros.

El diagnóstico final se realiza con la ayuda del laboratorio específico que incluye: aislamiento del agente con técnicas y medios de cultivo especiales, y serología específica para Leptospirosis.

En Argentina las comunicaciones sobre aislamientos no son frecuentes. En el período 1934-1996 se aislaron a partir de muestras de animales y humanas cepas pertenecientes a los serogrupos

Icterohaemorrhagiae, *Canicola*, *Pomona*, *Ballum*, *Grippotyphosa*, *Bataviae*, *Sejroe*, *Pyrogenes*, *Tarassovi* y otras *L. interrogans* no identificadas. En el mismo período se aislaron numerosas cepas de la especie *biflexa* de fuentes ambientales (4).

La transmisión se realiza a través del contacto con orina o elementos contaminados con ella (agua, barro, alimentos, vegetales) de animales infectados. Las *Leptospiras* se reproducen en los riñones de los animales, se eliminan con la orina contaminando el medio desde donde otros animales susceptibles se infectan.

La reactividad serológica en perros urbanos de distintas localidades de la Republica Argentina, indica valores que oscilan entre el 10 y el 60% (3, 4, 5, 6, 9, 11). En esta especie pocos animales son diagnosticados clínicamente porque la infección pasa inadvertida por sus dueños. Estos desconocen que poseen perros eliminadores de *Leptospiras* y sólo el análisis de laboratorio puede demostrarlo.

El objetivo de este trabajo es informar las acciones realizadas y los resultados obtenidos a partir de un caso fatal ocurrido en la localidad de Magdalena, provincia de Buenos Aires, Argentina en el verano del 2004.

MATERIALES Y METODOS

A principios de enero del año 2004 se recibe en el Departamento Infectocontagiosos del Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires, una muestra de suero, proveniente del Hospital Municipal de Magdalena. La muestra correspondía a un individuo masculino de 28 años de edad, con diagnóstico clínico de Leptospirosis.

El paciente domiciliado en la zona urbana de la localidad de Magdalena, obitó a las pocas horas de habersele realizado la extracción.

En nuestro laboratorio se realizaron los análisis correspondientes y se confirmó serológicamente la presunción diagnóstica.

Magdalena es una localidad distante a 50 km al sur de la ciudad de La Plata, capital de la provincia de Buenos Aires sobre la ruta provincial nº 11. Posee una población de 16.495 habitantes (6), la actividad económica principal es agrícola ganadera, con una tasa de prevalencia de Leptospirosis humana de 6,06/100.000 en la población total y de 13,5/100.000 en la población masculina (10).

Para realizar el estudio del caso se planificaron las tareas epidemiológicas conjuntas con el Departamento de Zoonosis de la mencionada localidad: se confeccionó una ficha epidemiológica con datos de la enfermedad para casos humanos y otra para los datos de los cánidos convivientes en la casa del

occiso. Se buscaron rastros, presencia o evidencia de roedores en el domicilio del enfermo y lugares donde había concurrido durante los últimos 15 días al inicio de los síntomas.

Se obtuvieron muestras de suero de 39 familiares y vecinos asintomáticos. Del total de las personas examinadas a 23 se les pudo realizar una segunda extracción sanguínea para la obtención de suero (a los 7 días de realizada la primer toma de muestra). Se extrajeron muestras simples de sueros de 69 caninos y 2 muestras de orina de perro para el cultivo en un intento de aislamiento de *Leptospiras* (los sueros se mantuvieron a -19 °C hasta la realización de las pruebas serológicas.)

Las pruebas serológicas realizadas fueron:

a) Antígeno termoresistente (Ag TR)

Este antígeno se realizó cultivando una cepa de *Leptospira interrogans* sv *pomona*, Pomona en 500 ml de medio Tween Albúmina 80 (EMJH) por 10 días a 30 °C. Se agregó formol al 1% y se centrifugó a 10.000 revoluciones. Luego de 2 lavados con solución salina buferada (PBS) se recolectó en 20 ml de la misma solución. Esta concentración de leptospiras muertas por formol, se calentó a baño María de 100 °C durante 30 min con agitación manual continua. Una vez a temperatura ambiente, se llevó a una concentración del tubo n° 10 de la escala de Mc Farland con PBS. Se mantuvo a 4 °C hasta su utilización (7).

Para realizar la prueba se colocó sobre un espejo 25 µl de suero problema con 25 µl del Ag TR, se homogenizó con un palillo plástico realizando una aureola de 25 mm de diámetro. Con movimientos continuos rotatorios se mantuvo la reacción durante 4 minutos, realizando la lectura a ojo desnudo.

Una reacción positiva se manifestó con la formación de grumos en la mezcla suero-antígeno. El líquido sobrenadante quedó claro y la agitación suave por balanceo del espejo no rompió los grumos formados en el borde de la gota. La reacción negativa fue aquella en que la suspensión suero-antígeno queda con aspecto levemente lechoso y la agitación suave no revela la presencia de grumos. Como testigo se utilizó paralelamente la misma prueba con un suero positivo y otro negativo.

b) Prueba de microaglutinación con antígenos vivos (MAT)

Se enfrentó cada suero a una batería de antígenos de *Leptospiras* consistente en cultivos vivos de *Leptospiras* sembrados en medio EMJH, con un

desarrollo de 7 a 15 días, se utilizó la microtécnica, utilizando microplacas descartables en PST de 96 pocillos fondo en U (1).

La dilución de los sueros en PBS fue de 1/50 para sueros humanos y 1/100 para los sueros caninos. A los sueros reactivos se le realizaron diluciones en PBS en progresión geométrica de 2. Cada reacción fue acompañada con un testigo negativo de cada antígeno de *L. interrogans* empleado. Luego de homogeneizar la mezcla de antígeno-suero, se incubó durante 60 min a 37 °C en una incubadora para 8 placas. La lectura se realizó colocando 3 µl de la mezcla Antígeno-Suero sobre portaobjeto y se observó con microscopio binocular con 160x y condensador de fondo oscuro húmedo. Se consideró reactiva positiva aquella reacción que aglutinaba el 50% o más de leptospiras respecto al testigo negativo (200 leptospiras por campo).

Los antígenos empleados para enfrentar los sueros humanos fueron con las siguientes serogrupos (cepas entre paréntesis): australis (Ballico), ballum (Castellon 3), Icterohaemorrhagie, (RGA), canicola (Hound Utrech IV), pomona (Pomona), grippotyphosa (Moskva V), bataviae (swart), wolffi (3705 o Hardjoprajitno), pyrogenes, (Salinem), y tarassovi (Perepelicin).

Serogrupo	Serovar	Cepa
AUSTRALIS	Australis	Ballico
BALUM	Castellonis	Castellon 3
BATAVIAE	Bataviae	swart
CANICOLA	Canicola	Hound Utrech 4
GRIPPOTYPHOSA	Grippotyphosa	Moskva 5
ICTEROHAEMORRHAGIAE	Icterohaemorrhagiae	RGA
POMONA	Pomona	Pomona
PYROGENES	Pyrogenes	Salinem
SEJROE	Wolffi	3705
TARASSOVI	Tarassovi	Perepelicin

Para los sueros caninos se utilizaron los antígenos: Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes y Tarassovi (3).

Para los urocultivos se eligieron dos caninos que tuvieron el mayor título a la MAT. Uno perteneciente al enfermo y otro a un vecino. La extracción de la orina se realizó por punción vesical, previo rasurado, desinfección de la zona post umbilical, en la línea media del abdomen, con jeringa de 5 ml y aguja 50/8 estériles.

Se tomaron 3 ml de orina e inmediatamente se colocaron 0,5 ml en un frasco ampolla violado con tapa de goma conteniendo 5 ml de medio Fletcher. Se mantuvo a temperatura ambiente hasta la llegada

al laboratorio, 24 h después de la extracción. Se sembraron alícuotas de 0,5 ml a 3 tubos conteniendo 7 ml de medio EMJH con 200 µg/ml de 5-Fluorouracilo (5 FU) y a otros 3 tubos con medio Fletcher se incubaron a 30 °C hasta la observación de desarrollo. Estas se realizan semanalmente en fresco tomando 30 µl, entre portaobjetos y cubre objetos con condensador de fondo oscuro húmedo y un aumento de 25 x de objetivo y 10x de ocular.

Inmediatamente de la observación del desarrollo se repicaron en medio EMJH y se enviaron para su tipificación al Laboratorio del Departamento de Leptospirosis de DILACOT- SENASA.

RESULTADOS

El paciente fallecido mostró síntomas compatibles con leptospirosis: cefaleas, ictericia, mialgias generalizadas, fiebre superior a 39 °C, neumonía e insuficiencia respiratoria. En los lugares frecuentados por el mismo no se evidenciaron rastros de roedores.

Muestras humanas

Se estudiaron 40 personas, salvo el caso guía, todos sin evidencia de síntomas clínicos. Del total estudiado, en 23 (57,5 %) se les pudo realizar una segunda muestra serológica a los 7 días. En el primer análisis resultaron positivas 5 muestras (12,5%) a la prueba con el antígeno TR y 4 (10%) a la MAT. En el análisis de la segunda muestra de la paciente con suero MAT negativa y el TR positivo, la misma resultó positiva a ambas pruebas. (ver Grafico 1)

Muestras serológicas caninas

Se realizaron dos estudios

Grupo 1: Muestras de caninos que convivían con el enfermo con muestras de caninos de los vecinos del caso: Se estudiaron 19 caninos obteniéndose 12/19 (63,15%) de seroreactividad (Cuadro 1).

Grupo 2: Muestras de caninos del resto de la población de Magdalena):

Se extrajo sangre a 51 perros obteniéndose 6/51 (11,76%) de seroreactividad (Cuadro 1).

Urocultivos

Observación directa de las 2 orinas con fondo oscuro: se pudo apreciar escasa cantidad de elementos leptospiriformes móviles en ambas muestras.

Cultivos de orina: en ambos cultivos de orina se apreció un desarrollo de leptospirosis a los 25 y 30 días de incubación respectivamente. Ambas cepas pertenecen al serogrupo Canicola.

DISCUSIÓN

La leptospirosis humana rural se asocia al contacto con la orina del ganado durante las actividades propias del manejo animal, al contacto con la orina de los roedores, y la inmersión en aguas contaminadas, en cambio las fuentes de contaminación en las zonas urbanas son, las inundaciones, los roedores y el contacto accidental con orina de perros infectados, entre otras (11). En este estudio se trataría de un brote humano con punto de partida en la contaminación accidental con orina de caninos que convivían estrechamente con la familia.

De los cinco familiares del enfermo, tres (su esposa y dos de sus hijos de 1 y 3,5 años de edad fueron reactivos serológicamente pero asintomáticos. La esposa acostumbra estar descalza y los niños juegan en el patio de cemento, muchas veces también descalzos donde los perros depositan sus deyecciones. Es de hacer notar que el menor de un año gateaba en el mismo patio.

A los tres pacientes positivos al TR, se les administró ampicilina por vía oral durante 7 días.

El caso guía de 28 años de edad falleció con síntomas y título compatibles con Leptospirosis a los 5 días de iniciados los síntomas.

A pesar de que otros caninos del barrio fueron eliminadores de Leptospiras no ocasionan enfermos aparentes.

Se logró aislar dos cepas a partir de orina de caninos pertenecientes al serogrupo Canicola.

Todos los perros serológicamente reactivos, fueron tratados con oxitetraciclina 25 mg/kg en un intento de evitar la diseminación de leptospirosis por la orina.

Una vez más se demuestra que la precocidad en el diagnóstico de la enfermedad permite realizar el estudio del foco, determinar el origen del mismo, encontrar otros pacientes infectados, y realizar medidas preventivas y de educación para la salud para evitar la ocurrencia de otros enfermos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo desean agradecer la muy buena predisposición de los pobladores de la ciudad de Magdalena ante las tareas a campo realizadas por los profesionales y técnicos. También hacer extensivo el mismo especialmente al municipio de Magdalena que puso a disposición el traslado de los profesionales del Ministerio de Salud a la mencionada localidad. No queremos olvidar mencionar la colaboración en la lectura crítica y ayuda en la redacción del presente trabajo a los Sres. Med Vet. Alejandro Lozano, Bioq. Cesar Gatti y Bact. Analia Sencini, Dr. Oscar Linzitto y Dr. Nestor Stanchi.

Tabla I Prueba de MAT en perros de Magdalena: Grupos 1 y 2

	reactivos %	No reactivos %
Machos	6/10 60	3/27 11,11
Hembras	6/9 66,66	3/24 12,5
Total	12/19 63,15	6/51 11,76

Gráfico I Prueba de MAT en pacientes humanos de Magdalena

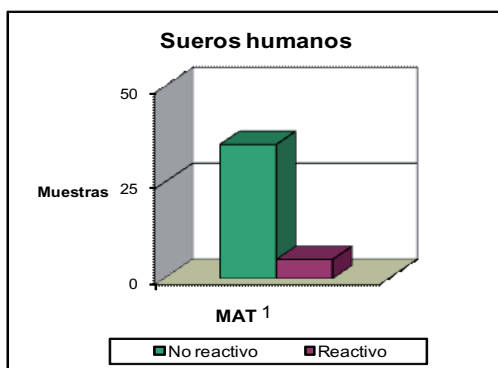


Tabla II. Caninos Magdalena Grupo 1

Grupo etareo	Positivos/examinados (%)		
	Machos	Hembras	Total
<1	0/0	1/1 (100)	1/1 (100)
1	1/1 (100)	½ (50)	2/3 (66.66)
2 a 3	1/3 (33.33)	1/1 (100)	2/4 (50)
4 a 5	2/4 (50)	0/1	5/7 (71.42)
6 a 7	0/0	0/1	0/1
8 a 13	0/0	0/0	0/1
Sin Datos	2/2 (100)	0/0	2/2 (100)
Total	6/10 (60)	6/9 (66,66)	2/2 (100)

Gráfico 2. Caninos de Magdalena. Grupo 1.

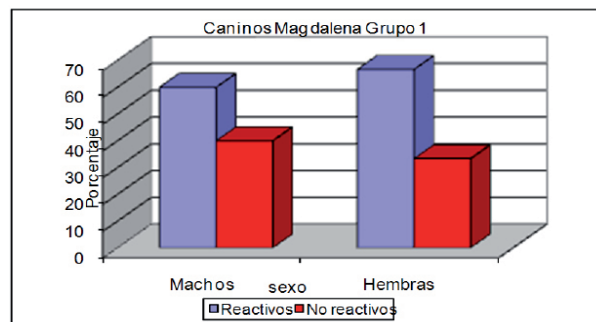
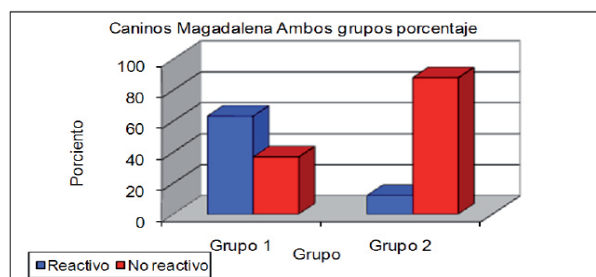


Tabla III Caninos Magdalena Grupo 2

grupo etareo	Positivos/examinados (%)		
	Machos	Hembras	total
<1	0/5	0/6	0/11
1	0/5	0/1	0/6
2 a 3	0/4	2 de 7 (28,57)	2 de 11 (18,18)
4 a 5	3/5 (60)	0/5	3 de 10 (30)
6 a 7	0/5	1 de 5 (20)	1 de 10 (10)
8 a 13	0/3	0/0	0/3
total	3 de 27 (11,11)	3 de 24 (12,5)	6 de 51 (11,76)



BIBLIOGRAFIA

- Levett, PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbio. Rev., 14(2):296-326.
- Arias R, Obregón Ana y Fernández Carmen. 2002. Taxonomía de las Leptospiras. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Habana, Cuba.
- Faine S. "Guideliness for the control of Leptospirosis W.H.O. Genova 1982
- Ribeiro MA, Cliquet MG, Santos MGS. "Leptospirosis: A problem for transfusion medicine?". Comunicación en el 2º Congreso Argentino de Zoonosis 13 al 17 de abril de 1998.
- Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnostico. Manual de Leptospirosis . Comision Cientifica Permanente de Leptospirosis. 1994.
- Farace M, Zanini F, Labbè J. Estudio serológico de Leptospirosis en población canina de Buenos Aires y Usuahia. Tierra del Fuego. Argentina. En Libro de Resúmenes de 2º Congreso Argentino de Zoonosis y 1º Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina 14 al 17 de abril de 1998. Buenos Aires

- Caminoa R, Bergagna H. Leptospirosis canina en Neuquen. Estudio epidemiológico durante 1996. En Libro de Resúmenes de 2º Congreso Argentino de Zoonosis y 1º Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Informe sobre Leptospirosis en la República Argentina 14 al 17 de abril de 1998. Buenos Aires
- Datos epidemiológicos obtenidos de sitio web Casa de la Provincia de Buenos Aires.
- Mazzonelli J, Dorta de Mazzonelli G, Maillux M. Recherches sur les Antigenes des Leptospires En Stuttgart Tropenmed Parasit. 26: 35-42, 1975
- Caminoa R, Alt M. Técnicas de laboratorio para el diagnóstico de Leptospirosis. Acta Bioquím. Clin. Lat XVIII 2,353-365, 1984.
- Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky-Colli C. Leptospira interrogans en una población en Rev. Panam Salud Publica. 1997, 2(2):102-5.
- Caminoa R. Leptospirosis periodo 2002 - 2003 en prensa.
- Seijo A, Draghi G, Dorta de Mazzonelli G, Mazzonelli J, Stiebel C, Argento E, Caminoa R,

Deodato Bl. Informe sobre leptospirosis en la Republica Argentina. Comision científica sobre Leptospirosis de Republica Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicacion monografica N°3.. Fundación Mundo Sano. Buenos Aires. Octubre de 2002.

12. Caminoa R, Marino F, Di Lorenzo C, Mombiela A, Soncini A, Diorio J, Pássaro D. Hallazgos de anticuerpos contra *Leptospira* en caninos de diferentes barrios de la ciudad de La Plata. En Comunicaciones libres (posters) Actas del I congreso Bonaerense de Zoonosis de 2003. La Plata.

16. Brenner DJ, Kaufman AJ, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *L. alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Inter J Of Systematic Bacteriology*, 49:839-858.

17. Quinn PJ, Markey BK, Cater ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Editorial. Blackwell Science Ltd. 178-179.

18. Pérolat, P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Merien F, Serrano MS. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov. isolated from pigs in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:851-858

19. Holt JG, Hrieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, Ed., Baltimore, USA. 9th edición. 27-37.