



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPERANZA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS**  
**MENCION: MEDICINA PREVENTIVA**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE TECNICAS DIAGNOSTICAS DE**  
**LEPTOSPIROSIS CANINA**

**AUTOR**

**BsC Yosena Chiani**

**Tesis para Optar al grado de**  
**MASTER *SCIENTIAE* EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Esperanza- Argentina**

**-2013-**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPERANZA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS**  
**MENCION: MEDICINA PREVENTIVA**  
**DESARROLLO Y VALIDACION DE TECNICAS DIAGNOSTICAS DE**  
**LEPTOSPIROSIS CANINA**

**AUTOR. BsC Yosena Chiani**

**DIRECTOR. BsC, MSc Bibiana Vanasco**

**CODIRECTOR. BsC, PhD Javier Lottersberger**

**MIEMBROS DEL JURADO**

**Dr. Pablo Beldomenico**

**Dr. Sergio Guerrero**

**MV MSc Silvia Gervasoni**

**Tesis para Optar al grado de**  
**MASTER *SCIENTIAE* EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Esperanza- Argentina**

**-2013-**

**A mis hijos Franco y Paula...**

*"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un  
esfuerzo total es una victoria completa."*

*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMIENTOS

- A la directora de la tesis BsC, MSc Bibiana Vanasco por estar siempre presente, por su paciencia, aliento, colaboración y todo su apoyo.
- Al codirector de la tesis BsC, PhD Javier Lottersberger, por su colaboración y apoyo técnico y científico.
- A mi compañera de trabajo MSc Maria Fernanda Schmeling por reemplazarme en el trabajo del laboratorio, por su comprensión y colaboración.
- A Paulina Jacob por estar siempre presente cuando lo necesite.
- A la Jefa del laboratorio del Instituto Nacional de Referencia “Dr. E. Coni”, MSc Gabriela Kusnierz por el apoyo que me brindo.
- A la Dra Susana Imaz por brindarme sus conocimientos.
- A Juan Manuel Rudi por reemplazarme en el trabajo cuando lo necesite.
- A todos mis compañeros del laboratorio por su comprensión y colaboración.
- A la dirección y personal del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. E. Coni”.
- A mis compañeros de Maestría, porque con ellos compartí momentos inolvidables.
- A mis Padres por su apoyo y por estar siempre que los necesito. Gracias!!
- Finalmente agradezco mi esposo Fernando y mis hijos Paula y Franco, por su continuo estímulo, su apoyo en todo momento, su comprensión y por dedicarme su tiempo. Gracias por estar ahí!!

## INDICE GENERAL

<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Objetivos Generales</b> .....	3
<b>1.2. Objetivos Específicos</b> .....	4
<b>CAPITULO 2. REVISION BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>2.1. Generalidades</b> .....	6
<b>2.2. Agente Etiológico</b> .....	7
2.2.1. <u>Taxonomía</u> .....	7
2.2.2 <u>Morfología. Crecimiento y Cultivo</u> .....	8
2.2.3 <u>Antígenos de Superficie</u> .....	11
<b>2.3. Epidemiología</b> .....	15
<b>2.4. Leptospirosis en caninos</b> .....	17
2.4.1. <u>Período de Incubación</u> .....	18
2.4.2. <u>Patogenia de la Enfermedad</u> .....	19
2.4.3. <u>Signos clínicos</u> .....	21
<b>2.5. Diagnóstico</b> .....	22
2.5.1. <u>Técnicas de detección del microorganismo</u> .....	23
2.5.1.1. Examen directo en campo oscuro .....	23
2.5.1.2. Inmunofluorescencia directa, Inmunohistoquímica y tinciones histológicas especiales.....	24
2.5.1.3. Cultivo de Leptospiras.....	25
2.5.1.4. Técnicas de Biología molecular .....	27
2.5.2. <u>Técnicas de detección serológicas</u> .....	29
2.5.2.1. Microaglutinación (MAT).....	29

2.5.2.2. Antígeno termorresistente (TR) .....	32
2.5.2.3. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	33
2.5.2.4. Otros métodos serológicos.....	38
<b>2. 6. Conceptos estadísticos y epidemiológicos .....</b>	<b>39</b>
2.6.1. <u>Sensibilidad y Especificidad</u> .....	39
2.6.2. <u>Curva de eficacia diagnóstica</u> .....	39
2.6.3. <u>Estadístico <i>Kappa</i> (<math>\kappa</math>)</u> .....	40
2.6.4. <u>Estadístico <i>J</i> de Youden</u> .....	41
2.6.5. <u>Valores Predictivos (VPP y VPN)</u> .....	41
2.6.6. <u>Factor de riesgo. Odds Ratio (OR)</u> .....	42
<b>CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Criterio de definición de casos .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2. Muestras de Suero.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3. Enzimoimmunoensayos .....</b>	<b>45</b>
3.3.1. <u>Obtención de antígenos</u> .....	45
3.3.2. <u>Determinación de las condiciones óptimas y evaluación de la actividad biológica del ELISA IgG</u> .....	47
3.3.3. <u>Interpretación de los Resultados</u> .....	48
<b>3.4. Test de Microaglutinación con antígenos vivos (MAT).....</b>	<b>49</b>
<b>3.5. Aglutinación microscópica con Antígeno Termorresistente (TR).....</b>	<b>50</b>
<b>3.6. Evaluación de las Pruebas diagnósticas y Epidemiología .....</b>	<b>50</b>
3.6.1. <u>Sensibilidad y Especificidad</u> .....	50
3.6.2. <u>Valores Predictivos Positivos (VPP) y Negativos (VPN)</u> .....	51
3.6.3. <u>Grado de Concordancia</u> .....	52

3.6.4. <u>Evaluación de los ELISAs IgG desarrollados</u> .....	52
3.6.5. <u>Evaluación del TR</u> .....	53
3.6.6. <u>Cálculo de factores de riesgo. Odd Ratio (OR)</u> .....	54
<b>CAPITULO 4. RESULTADOS</b> .....	55
<b>4.1. Desarrollo de los Enzimoimmunoensayos (ELISAs) IgG</b> .....	56
4.1.1. <u>Selección de la superficie de Inmunocaptura y estabilidad de lo pocillos sensibilizados</u> .....	56
4.1.2. <u>Condiciones óptimas definidas para cada uno de los ELISAs desarrollados</u> .....	56
<b>4.2. Evaluación de los ELISAs desarrollados</b> .....	58
<b>4.3. Evaluación del Test de Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR)</b> .....	63
<b>4.4. Comparación del TR y los métodos de ELISA desarrollados</b> .....	63
<b>4.5. Factores de riesgo</b> .....	66
<b>4.6. Descripción clínica-epidemiológica de los casos confirmados (n=85)</b> .	66
4.6.1. <u>Serovares más reaccionantes a la MAT</u> .....	67
4.6.2. <u>Edad</u> .....	67
4.6.3. <u>Antecedentes de vacunación</u> .....	68
4.6.4. <u>Signos clínicos</u> .....	68
<b>CAPITULO 5. DISCUSIÓN</b> .....	70
<b>CAPITULO 6. CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>CAPITULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	84
<b>CAPITULO 8. ANEXO</b> .....	110
8.1. Ficha clínico- epidemiológica de leptospirosis canina .....	111



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Escaneo micrográfico de electrones de alta resolución de <i>L. interrogans</i> serovar Copenhageni.....	9
<b>Figura 2.</b> Arquitectura de La membrana de leptospiras .....	10
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica de la estructura cristalina de LipL32.....	12
<b>Figura 4.</b> Dominios de unión a anticuerpos en LipL32.....	15
<b>Figura 5.</b> Escaneo micrográfico de electrones de la adhesión/invasión de una Leptospira patógena .....	20
<b>Figura 6.</b> Curva ROC para el ELISA Extractivo.....	59
<b>Figura 7.</b> Curva ROC para el ELISA-P1 .....	60
<b>Figura 8.</b> Curva ROC para el ELISA-P2.....	60
<b>Figura 9.</b> Curva ROC para el ELISA-Recombinante .....	61
<b>Figura 10.</b> Comparación de las Curvas ROC obtenidas para los cuatro ELISAs...	62
<b>Figura 11.</b> Diagrama de puntos del ELISA-Ext .....	63
<b>Figura 12.</b> Diagrama de puntos del ELISA-P1.....	63
<b>Figura 13.</b> Diagrama de puntos del ELISA-P2.....	64
<b>Figura 14.</b> Diagrama de puntos del ELISA-Rec.....	64

## RESUMEN DE TABLAS

<b>Tabla N°1.</b> Valores de Corte, Sensibilidad, Especificidad, AUC y VP para los ELISAs desarrollados (casos confirmados n=85, controles n=202).....	58
<b>Tabla N°2.</b> Comparación de valores de Kappa para el TR y los diferentes ELISAs, frente a la MAT .....	65
<b>Tabla N°3.</b> Sexo de los caninos estudiados y Positividad frente a MAT (n=287) .	66
<b>Tabla N°4.</b> Serovares más reaccionantes a la MAT (n=85) .....	67
<b>Tabla N°5.</b> Frecuencia de edad entre los casos confirmados (n=85).....	68
<b>Tabla N°6.</b> Presentación clínica de la enfermedad en casos confirmados (n=85)..	69

**ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AUC</b>	<i>(Area Under the Curve)</i> Área bajo la curva ROC
<b>CAAT</b>	<i>(Cross agglutination adsorption Test)</i> Ensayo de Adsorción de Aglutinación Cruzada
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DOC</b>	Densidad óptica corregida= DOP/DON
<b>DON</b>	Densidad óptica media del control negativo
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
<b>ELISA- Ext.</b>	ELISA con antígeno extractivo
<b>ELISA-P1</b>	ELISA con antígeno peptídico 1
<b>ELISA-P2</b>	ELISA con antígeno peptídico 2
<b>ELISA-REC</b>	ELISA con antígeno Recombinante
<b>EMJH</b>	Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris
<b>HPLC</b>	<i>(High performance liquid chromatography)</i> cromatografía líquida de alta performance
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IC95%</b>	Intervalo de confianza del 95%
<b>IgM, IgG</b>	Inmunoglobulinas M y G
<b>IMAC</b>	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i> cromatografía de iones metálicos inmovilizados
<b>LipL</b>	Lipoproteínas
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos

<b>MAT</b>	Test de aglutinación microscópica
<b>MLST</b>	( <i>Multilocus Sequence Typing</i> ) Tipificación por secuencia de multilocus
<b>MLVA</b>	( <i>Multi Locus VNTR Analysis</i> ) Análisis de VNTR de multilocus
<b>OR</b>	( <i>Odds ratio</i> ) Razón de momios o Razón de los Productos Cruzados
<b>P1</b>	Antígeno peptídico 1
<b>P2</b>	Antígeno peptídico 2
<b>PBS</b>	( <i>Phosphate buffered saline</i> ) Solución salina amortiguadora porfosfatos
<b>RFLP</b>	( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción
<b>REC</b>	Antígeno Recombinante
<b>RNLL</b>	Red Nacional de Laboratorios de leptospirosis
<b>ROC</b>	( <i>Receiver Operating Characteristics Curve</i> ) Característica operativa del Receptor o Curva de eficacia diagnóstica
<b>TFA</b>	Trifluoroacético
<b>TMB</b>	( <i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i> ) 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
<b>TR</b>	Test de macroaglutinación con antígeno termorresistente
<b>VNTR</b>	( <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> ) Número variable de repeticiones en tandem

## **RESUMEN**

Los objetivos del presente estudio fueron: Desarrollar Enzimoimmunoensayos para el serodiagnóstico de Leptospirosis Canina; Validar los ELISAs y el TR frente a la MAT y la presencia o no de signos clínicos; Conocer los serovares presumiblemente infectantes; Evaluar diferentes variables epidemiológicas. Los ELISAs Extractivo y P1 tuvieron un mejor desempeño y significativamente mejores AUC (0.868 y 0.902) que los ELISAs con P2 y Rec. Estos resultados permiten concluir que podrían ser utilizados

como una prueba complementaria a la MAT para el diagnóstico de leptospirosis canina. La baja sensibilidad (70.6%) y especificidad (76.7%) del TR nos indicarían que no podría ser utilizado como única prueba tamiz. En el análisis de factores de riesgo, los machos tuvieron mayor probabilidad de enfermar de leptospirosis (OR= 4.07). Los serogrupos presumiblemente infectantes más frecuentes fueron Icterohaemorrhagiae y Canicola. De los casos confirmados el 20% tenían antecedentes de vacunación y los signos clínicos más frecuentes fueron la Inyección Conjuntival y Síndrome renal. Los resultados del desarrollo y validación de métodos para el diagnóstico de la leptospirosis canina y los hallazgos clínicos-epidemiológicos de este estudio son útiles como antecedentes, aportan al conocimiento de la leptospirosis y contribuyen a la implementación de medidas de prevención y control adecuadas.

Palabras Claves: ELISA, MAT, TR, Caninos, Leptospirosis

## **SUMMARY**

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF DIAGNOSIS TECHNIQUES OF CANINE LEPTOSPIROSIS**

The objectives in this study were: To develop Enzyme Immunoassays for Canine Leptospirosis Diagnosis; To validate the ELISAs and the TR through MAT and the presence or absence of clinical signs; To know the presumably infectious serotypes; To assess different epidemiological variables. ELISAs Extractive and P1 performed better

and showed significantly better AUC (0.868 and 0.902) than ELISAs with P2 an Rec. From these results it is concluded that they can be suitable as an additional test to MAT for canine leptospirosis diagnosis. The low sensitivity (70.6%) and specificity (16.7%) seem to suggest it cannot be used as the only screening. In the risk factor analysis, males proved to be more likely to catch leptospirosis (OR= 4.07). The more frequent presumably infectious serogroups were Icterohaemorrhagiae and Canicola. Of all confirmed cases, 20% has a vaccination history and the more frequent clinical signs were bloodshot eyes and Renal Syndrome. Results for the development and validation of canine leptospirosis diagnosis methods and clinical-epidemiological findings can serve as antecedents, add to the knowledge of leptospirosis and contribute to the implementation of appropriate control and prevention measures.

Key Words: ELISA, MAT, TR, Canine, Leptospirosis

# INTRODUCCIÓN

1

## CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una de las zoonosis más difundida en todo el mundo y es causada por serovares de especies patógenas de *Leptospira* (Adler *et al.*, 2011). En los caninos es una de las principales enfermedades infecciosas de origen bacteriano. La leptospirosis canina fue descrita por primera vez en 1899, y es conocida como causa de enfermedad febril y enfermedades hepáticas y renales (Bolin, 1996).

Obtener un diagnóstico definitivo y precoz es de especial importancia debido a que la leptospirosis es una enfermedad zoonótica por lo cual un canino sirve como reservorio para otros caninos o para el hombre (Goldstein, 2010). La serología aparece como la principal herramienta para el diagnóstico de *Leptospira spp* en caninos (André-Fontaine, 2006). El diagnóstico de leptospirosis se realiza frecuentemente con el Test de Aglutinación Microscópica (MAT), la cual es reconocida como la técnica de referencia Internacional para el diagnóstico serológico (WHO, 2003). La MAT es una técnica específica, pero muy laboriosa, y requiere el mantenimiento de las leptospiras vivas, lo cual es potencialmente peligroso para los laboratoristas; además su interpretación es compleja y no es objetiva (Levett, 2001a).

Otra técnica utilizada es la Aglutinación Macroscópica con Antígeno Termorresistente (TR), la cual presenta muchos resultados falsos negativos (Regalado Segui *et al.*, 1990). En caninos existen muy pocos estudios (Lilenbaum *et al.*, 2002).

No se disponen, en el país, de métodos comerciales para el diagnóstico serológico de leptospirosis canina. Por esto, es necesario disponer de un método rápido, sensible y reproducible, que pueda ser usado en el diagnóstico de rutina en laboratorios de baja y mediana complejidad donde la MAT es difícil de implementar.



El enzimoimmunoensayo (ELISA) es una técnica simple, segura y fácilmente automatizable. Este método puede ser de gran utilidad como complemento de la MAT para el diagnóstico de la leptospirosis. Existen pocos estudios publicados de evaluación de ELISAs caninos. Además, en el país no existen desarrollos, ni reactivos comerciales disponibles de ELISAs en caninos.

En Argentina, la utilización del ELISA permitiría una mayor accesibilidad al diagnóstico y facilitaría la realización e interpretación en laboratorios de menor complejidad así como en el procesamiento de un alto número de muestras en un corto tiempo.

### **1.1. Objetivos Generales**

1.1.1. Desarrollar Enzimoimmunoensayos (ELISA) para el serodiagnóstico de Leptospirosis Canina.

1.1.2. Validar los ELISAs desarrollados en relación con la técnica de referencia Internacional para la confirmación serológica de los casos, la microaglutinación (MAT).

1.1.3. Validar la Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR) en relación con la técnica de referencia Internacional para la confirmación serológica de los casos, la microaglutinación (MAT)

1.1.4. Conocer los serovares presumiblemente infectantes.

1.1.5. Evaluar diferentes variables epidemiológicas: edad, sexo, antecedentes de vacunación, sintomatología clínica.

## **1.2. Objetivos Específicos**

1.2.1. Obtener Antígeno Extractivo y probar las condiciones de actividad biológica de los Péptidos sintéticos (P1 y P2) y del antígeno Recombinante para el desarrollo de los ELISAs.

1.2.2. Desarrollar ELISAs empleando los antígenos seleccionados.

1.2.3. Evaluar la Sensibilidad y Especificidad de los ELISAs desarrollados.

1.2.4. Evaluar la sensibilidad y especificidad del TR comparados frente a la MAT.

1.2.5. Comparar el método de TR con los ELISAs desarrollados y con la MAT para el diagnóstico de leptospirosis canina.

1.2.6. Determinar la proporción de serovares presumiblemente infectantes en el total de caninos reaccionantes a la MAT.

1.2.7. Evaluar si existen diferencias significativas para la variable sexo, entre casos confirmados y casos controles.

1.2.8. Estudiar la frecuencia de leptospirosis según la edad, antecedentes de vacunación y presentación clínica en casos confirmados.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---



## **CAPITULO 2. REVISION BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Generalidades**

La leptospirosis ha sido reconocida como un problema de salud pública mundial emergente debido a su incidencia creciente tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (Vijayachari *et al.*, 2008; Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). Es una enfermedad infecciosa causada por bacterias patógenas llamadas leptospiras. Estas bacterias son transmitidas directa o indirectamente desde los animales a los seres humanos siendo por tanto, una zoonosis (WHO, 2003). Las leptospiras infectan a muchos tipos de animales domésticos y salvajes. La leptospirosis tiene una amplia distribución geográfica, ocurre tanto en áreas urbanas como rurales de regiones con temperatura tropical y subtropical (Evangelista and Coburn, 2010). La incidencia anual varía dentro de un rango de 0.1-1 por 100.000 habitantes en climas templados hasta 10-100 por 100.000 habitantes en climas húmedos tropicales. Cuando se producen brotes, la incidencia de la enfermedad puede alcanzar más de 100 por 100.000 habitantes (WHO, 2003).

La leptospirosis es una enfermedad sistémica caracterizada por fiebre, insuficiencia hepática y renal, manifestaciones pulmonares y falla reproductiva (Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). Los signos clínicos son diversos y pueden variar desde una enfermedad pseudo gripal leve hasta una enfermedad severa, lo cual puede producir la muerte (Evangelista and Coburn, 2010). La leptospirosis también puede presentarse de manera similar a muchas enfermedades, como por ejemplo el dengue y otras enfermedades hemorrágicas virales (WHO, 2003).

## 2.2. Agente Etiológico

### 2.2.1. Taxonomía

La cepa Ictero N°1 del serovar Icterohaemorrhagiae fue el primer aislamiento de leptospira, la cual fue recuperada de un paciente con enfermedad de Weil's por Inada e Ido en 1915. Desde ese momento se han descrito aproximadamente 268 serovares patógenos (Brenner *et al.*, 1999).

El género *Leptospira* se dividió anteriormente en dos especies, *L. interrogans*, comprendiendo todas las cepas patógenas, y *L. biflexa*, que contenía las cepas saprófitas. *L. biflexa* fue diferenciada de *L. interrogans* por test bioquímicos. Ambas especies de leptospiras fueron divididas en numerosos serovares, definidos por aglutinación luego de la absorción cruzada con antígenos homólogos (Levett, 2004).

Los serovares que están antigénicamente relacionados han sido tradicionalmente relacionados en serogrupos. *L. interrogans* contiene más de 200 serovares y están agrupados en 23 serogrupos (Faine, 1982; Brenner *et al.*, 1999). Este sistema de clasificación se denomina fenotípico y actualmente es utilizado en epidemiología y clínica (Vinetz, 2001; Levett 2007).

La clasificación fenotípica de leptospira ha sido reemplazada por una genotípica, en la cual un número de genomoespecies incluyen todos los serovares de *Leptospira* spp. Esta clasificación está basada en el análisis de las secuencias del gen del 16s rRNA (Levett, 2004). Las genomoespecies de *Leptospira* no corresponden a las dos anteriores especies (*L. interrogans* y *L. biflexa*), y serovares patógenos y no-patógenos se encuentran en una misma especie (WHO, 2003). Además, la heterogeneidad genética

dentro de los serovares, resultante de la transferencia horizontal de genes, ha conducido al reconocimiento de cepas de diferentes especies que poseen el mismo antígeno-O y, por tanto pertenecientes al mismo serotipo (Levett, 2004). Así las especies de *Leptospira* no se pueden predecir por la identificación de un serovar.

Yasuda *et al.* (1987) reconocieron nuevas genomospecies patógenas: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. noguchi*, *L. santarosai* y *L. weilli*. Posteriormente Ramadass *et al.* (1992), identificaron una nueva especie, *L. kirschneri*. De allí que una nueva clasificación de *L. interrogans (sensu lato)* resultó del reconocimiento de siete genomospecies llamadas *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans (sensu stricto)*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilli*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. parva* y *L. illini*. Se definieron 17 genomospecies de *Leptospira* incluyendo además de las conocidas, *L. genomospecies 1*, *L. genomospecies 2*, *L. genomospecies 3*, *L. genomospecies 4* y *L. genomospecies 5* (Brenner *et al.*, 1999).

La re-clasificación de leptospiras sobre la base genotípica es taxonómicamente correcta y provee una fuerte base para el futuro entendimiento de estos organismos utilizando los datos genómicos (Brenner *et al.*, 1999). Sin embargo la clasificación molecular es incompatible con el sistema de serogrupos los cuales han sido utilizados por epidemiólogos y clínicos (Levett, 2004).

### 2.2.2. Morfología, Crecimiento y Cultivo.

Las leptospiras son bacilos helicoidales, móviles y obligadamente aerobios, y tienen 0.1 µm de diámetro y 6 a 12 µm de longitud. Se tiñen con debilidad con los colorantes con anilina. Debe utilizarse el microscopio de campo oscuro para poder observar leptospiras no teñidas (Levett, 2001a; Acha and Szifres, 2003) (Figura 1).

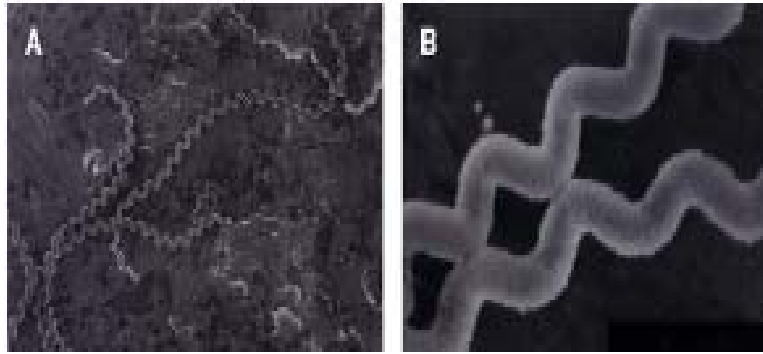


Figura 1: Escaneo micrográfico de electrones de alta resolución de *L. interrogans* serovar Copenhageni (Bharti *et al.*, 2003).

Debido a su forma helicoidal, las especies patógenas de leptospiras pueden penetrar la piel y las membranas mucosas y diseminarse a otros tejidos luego de la infección (Levett, 2001a).

Al igual que las bacterias Gram negativas, poseen tanto una membrana externa como una citoplasmática, separadas por un espacio periplasmático (Johnson and Harris, 1967; Haake and Matsunaga, 2002). Sin embargo, la capa de peptidoglicano está asociada con la membrana citoplasmática en lugar de la membrana externa. La envoltura externa, es fluida y lábil a diferencia de la membrana de las Gram-negativas, y rodea completamente el cuerpo de la célula (Johnson and Harris, 1967; Haake, 2000a; Haake and Matsunaga, 2002) (Figura 2).

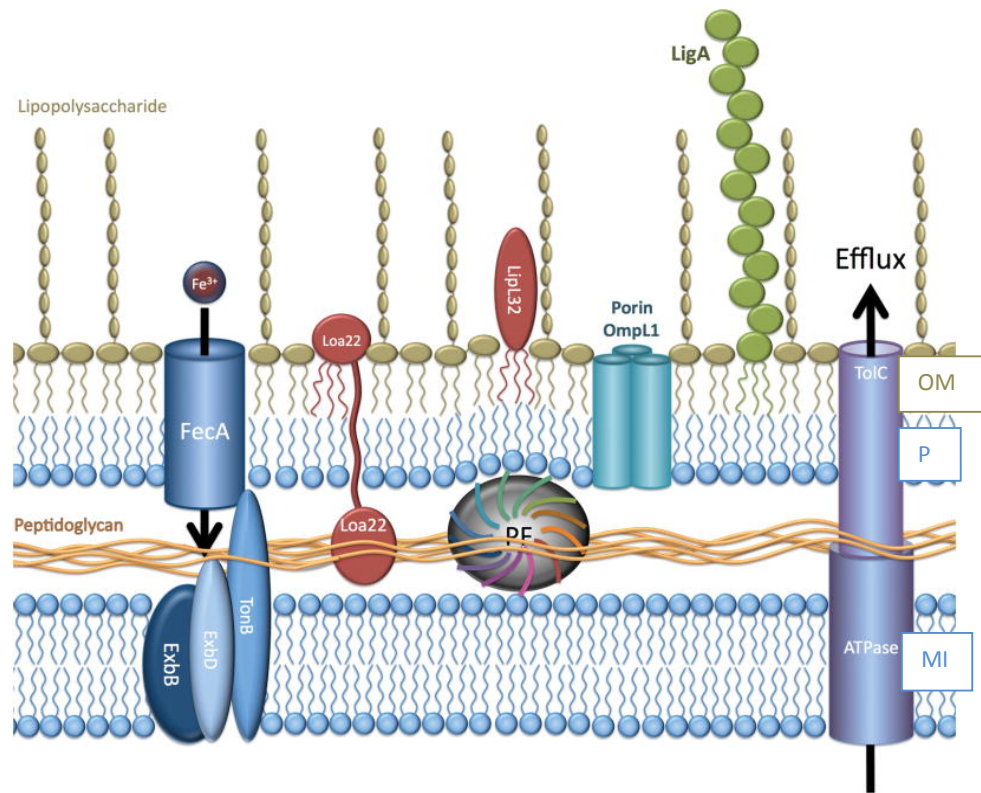


Figura 2: Arquitectura de la membrana de leptospiras. La membrana externa leptospiras contiene una mezcla de lipopolisacárido, lipoproteínas expuestas a la superficie y proteínas transmembrana. Las lipoproteínas de la membrana externa más abundantes son la LipL32 y Loa22. El flagelo periplasmático (PF) está localizado en el periplasma. FecA es un receptor T o B dependiente para citrato férrico y aerobactina. TolC forma un canal con ATPasa en la membrana citoplasmática. OM: Membrana Externa; P: Periplasma; IM: Membrana citoplasmática (Modificada de Haake and Matsunaga, 2010).

Las leptospiras son bacterias de crecimiento lento tanto en medios líquidos como en medios sólidos. La temperatura óptima de crecimiento es entre 28 y 30°C en medios suplementados con ácidos grasos de cadena larga como única fuente de carbono y energía, vitaminas B1 y B12, y sales de amonio (Adler and de la Peña Moctezuma,



2010). Su supervivencia depende de las condiciones ambientales en que se encuentren y son altamente sensible a la desecación. Su rango de pH óptimo es 6.2-8.0, pueden sobrevivir hasta 180 días en suelos húmedos y durante varios meses en superficies acuosas (aguas estancadas o de lento movimiento) (Levett, 2001a). No se multiplican fuera del huésped y por consiguiente para que se produzca un foco de leptospirosis es necesario que además de animales portadores, existan condiciones ambientales favorables para su sobrevivencia en el exterior (Acha and Szifres, 2003).

### 2.2.3. Antígenos de Superficie.

Además de los lipopolisacáridos (LPS), la membrana externa está formada por proteínas estructurales y funcionales. Una gran proporción de estas proteínas son lipoproteínas con relativa abundancia en la superficie celular: LipL32 > LipL21 > LipL41 (Johnson and Harris, 1967; Haake and Matsunaga, 2002; Cullen *et al.*, 2005). La expresión de algunas de estas lipoproteínas está regulada en el huésped, como una estrategia para evadir la respuesta inmune del huésped (Haake, 2000a).

Las lipoproteínas están involucradas en la patogénesis de la enfermedad, a través de su capacidad de desencadenar la respuesta inflamatoria del huésped (Haake, 2000a). Se demostró que la única lipoproteína que no está involucrada en la patogénesis es la LipL36 que disminuye su expresión luego de la entrada de la leptospira en el huésped (Barnett *et al.*, 1999).

La LipL32 fue identificada como la principal proteína de membrana externa y la más abundante en la superficie (Haake *et al.*, 2000b; Flannery *et al.*, 2001; Cullen *et al.*,

2002; Cullen *et al.*, 2005). Se expresa en altos niveles tanto en la infección como en el cultivo. En suero de humanos con leptospirosis se encontró una fuerte respuesta de anticuerpos a LipL32, esta respuesta fue mayor que la que evidenciaron otras proteínas de la membrana externa siendo el antígeno inmunodominante durante la infección (Haake *et al.*, 2000b; Guerreiro *et al.*, 2001). La antigenicidad de esta lipoproteína es mayor por su alto nivel de expresión en leptospirosis patógenas y por su modificación lipídica de su región amino Terminal, una propiedad conocida que mejora la antigenicidad en lipoproteínas de otras espiroquetas (Guerreiro *et al.*, 2001)

La LipL32 es una lipoproteína, con el componente proteico externo anclada en la membrana externa a través de los ácidos grasos unidos a una cisteína amino terminal (Haake, 2000a). La LipL32 adopta un plegado compacto y globular (Figura 3).

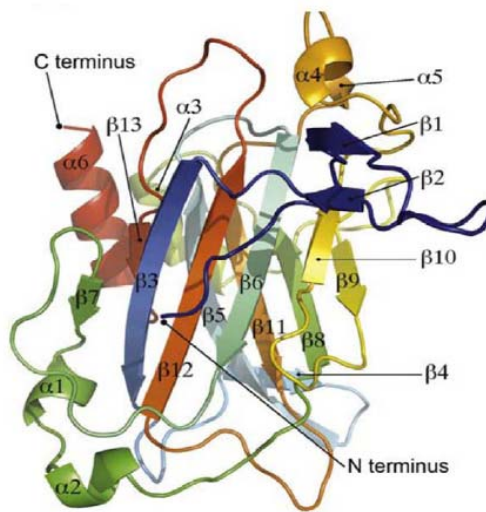


Figura 3: Representación gráfica de la estructura cristalina de LipL32 (Vivian *et al.*, 2009)

El gen de LipL32 está presente en especies patógenas, con un alto grado de conservación, pero no se la encontró en especies saprófitas (Haake *et al.*, 2000a; Zhang *et al.*, 2005). Existen evidencias que sugieren que LipL32 podría ser importante en la patogénesis (Haake *et al.*, 2000a), debido a que puede contribuir a la invasión y la colonización de los tejidos interactuando con la matriz extracelular. La LipL32 interactúa con el colágeno tipo IV del endotelio y también con la fibronectina del plasma dependiendo de la dosis. Estas interacciones son mediadas por la región C terminal de la LipL32 (Hauk *et al.*, 2008).

Sin embargo los hallazgos de Murray *et al.* (2009) demostraron que una mutación de la LipL32 no impidió el crecimiento normal de la leptospira, la infección aguda en hámster, la infección a través de las mucosas o la colonización de los túbulos renales del riñón en modelos animales. La idea de que LipL32 no es esencial es sorprendente, tanto por el alto costo de la célula de producir una proteína abundante como por la conservación de la secuencia de aminoácidos en una amplia gama de patógenos *Leptospira* spp. ( Haake *et al.*, 2004 ) Estos datos no identifican a la LipL32 como indispensable en la patogénesis, pero no se le excluye un importante rol en la interacción huésped-patógeno (Hauk *et al.*, 2009; Haake and Matsunaga, 2010).

La respuesta de anticuerpos a LipL32, en suero de humanos con leptospirosis fue mayor que la que evidenciaron otras proteínas de la membrana externa (Haake *et al.*, 2000b; Guerreiro *et al.*, 2001). Un reciente estudio demostró que la respuesta con IgM estuvo limitada al dominio C-terminal durante la fase aguda y convaleciente. Mientras que la respuesta de la IgG se modifica durante la infección. La respuesta a la región central durante la fase convaleciente se evidencia en la mayoría de los pacientes

mientras que la respuesta al dominio C-terminal se detecta en pocos pacientes tanto en la fase aguda como en la convaleciente (Hauk *et al.*, 2008; Vivian *et al.*, 2009). La LipL32 puede ser usada como antígeno para diagnóstico en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, siendo el dominio C-terminal como el principal objetivo inmunológico provocando una respuesta humoral IgM en todos los pacientes (Hauk *et al.*, 2008).

En células enteras, existe una baja accesibilidad de grandes moléculas como los anticuerpos a unirse a la LipL32. Esto evidencia un impedimento estérico producido por las cadenas laterales de los hidratos de carbono de los lipopolisacáridos que dominan la superficie celular de la leptospira y cubren los antígenos proteicos anclados a la membrana (Cullen *et al.*, 2005).

Por otra parte, Lottersberger *et al.* (2009) han identificado, mediante mapeo de epitopes utilizando péptidos sintéticos, las regiones antigénicas mínimas: aminoácidos 151-177 (epitope 1: AAKAKPVQKLDDDDDGDDTYKEERHNKYNS) y 181-204 (epitope 2: YNSLTRIKIPNPPKSFDDLKNIDTKKLVRG.). Estas regiones se encuentran en el extremo C-terminal descrito como el dominio más inmunogénico de LipL32 (Hauk *et al.*, 2008) (Figura 4). Coincidentemente Hauk *et al.* (2009) postularon que el loop ácido entre  $\alpha 3$  y  $\beta 9$  (residuos 154-169, contenidos en el epitope 1) pueden mediar la unión a dominios positivamente cargado de ligandos. Además, el epitope 2 corresponde a uno de los loops de interacción propuestos por Vivian *et al.* (2009). Aviat *et al.* (2010) utilizando un péptido sintético de los residuos 160-170, incluidos en el péptido 1, comprobó una mayor reactividad del ELISA IgG que IgM. También demostró que los anticuerpos IgG aumentan rápidamente luego de la infección y luego

desaparecen, por tal motivo no son detectados por la MAT ya que comienza a positivizarse cuando estos comienzan a desaparecer.

Además de los péptidos se han sintetizado recombinantes de la LipL32 los cuales se han estudiado en humanos (Flannery *et al.*, 2001) y caninos (Dey *et al.*, 2004), utilizándolo como antígeno en ELISAs IgG.

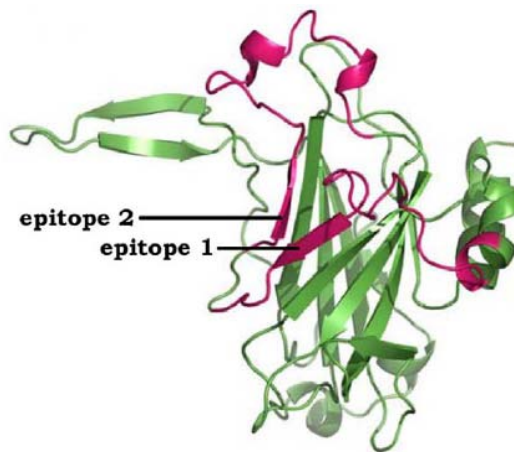


Figura 4: Dominios de unión a anticuerpos en LipL32. La estructura de la LipL32 se muestra en verde, con los residuos 132-158 (epitope 1) y los residuos 162-186 (epitope 2) mostrado en rosado (Vivian *et al.*, 2009)

### 2.3. Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad endémica en muchos países o regiones. Tiene con frecuencia una distribución estacional, incrementándose con el aumento de lluvias y temperaturas, sin embargo la enfermedad puede ocurrir a lo largo de todo el año (WHO, 2003). Su aparición se ve favorecida en regiones de clima tropical o subtropical, donde

las temperaturas elevadas y los altos índices pluviómetros en determinados períodos del año facilitan la aparición de brotes epidémicos de carácter estacional (Vanasco *et al.*, 2000; Levett, 2001a; Vanasco *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2008).

La leptospirosis ocurre en ambientes rurales o urbanos de países industrializados y en vías de desarrollo. En países desarrollados, está asociada a actividades recreacionales, turismo y deportes acuáticos. En países en vías de desarrollo, es una enfermedad endémica de poblaciones rurales ocupadas en agricultura de subsistencia, arrendamiento y cría de animales de granja, o en poblaciones urbanas en temporadas lluviosas (Levett, 2001a; Maciel *et al.*, 2008; Evangelista and Coburn, 2010).

El portal de entrada más usual es a través de abrasiones, cortes en la piel, las conjuntivas, o a través de la piel intacta luego de una prolongada inmersión en agua (Levett, 2001a; Greenlee *et al.*, 2005). La inhalación de agua o aerosoles resulta en infección a través de las membranas de las mucosas del tracto respiratorio. La infección raramente se da por picaduras de animales (Levett, 2004).

La forma directa de transmisión ocurre cuando las leptospiras de tejidos, fluidos corporales u orina de animales entran en el cuerpo e inician una nueva infección. En los animales la transmisión directa puede ser a través de la orina, transplacentar, por contacto sexual, a través de la leche materna o vía hematológica (Goldstein, 2010). La transmisión directa de animales a humanos es común en grupos ocupacionales que manipulan animales o sus tejidos, tales como veterinarios, tamberos, trabajadores de frigoríficos, fumigadores, etc. (Levett, 2001a; Vijayachari *et al.*, 2008). La transmisión directa de persona a persona es excepcional. La forma indirecta ocurre cuando animales o humanos susceptibles adquieren el organismo del ambiente contaminado con sangre u

orina de animales infectados (vegetación, suelo húmedos, agua o alimentos) (Levett, 2001a; Vanasco *et al.*, 2007; Vijayachariet *al.*, 2008; Adler and de la peña Moctezuma, 2010; Goldstein, 2010).

Existen dos tipos de huéspedes animales, incluyendo los humanos, cuando se trata de infecciones por leptospiras. Cuando un serovar está adaptado a uno o más mamíferos, a estos se los denomina huéspedes de mantenimiento (Goldstein, 2010). Estos huéspedes frecuentemente no presentan signos severos de enfermedad, pueden eliminar leptospiras por orina al medio ambiente durante semanas o años (Michna, 1970; Monahan *et al.*, 2009). En este huésped la infección es endémica y se transfiere de un animal a otro por contacto directo. Otro tipo de huésped es el incidental o accidental, el cual se infecta con un serovar al que no está adaptado. Este huésped tiende a desarrollar la enfermedad que puede ser severa o fatal y raramente desarrolla un estado de portador crónico (Levett, 2004; Goldstein, 2010). Los animales, incluyendo a los humanos, se pueden infectar por contacto indirecto con el huésped de mantenimiento. La magnitud de la infección depende de varios factores, incluyendo el clima, densidad de la población y el grado de contacto entre el huésped de mantenimiento y el accidental (Levett, 2001a; Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2004). Conocer los serovares prevalentes y sus huéspedes de mantenimiento es esencial para comprender la epidemiología e implementar medidas de control en cualquier región (Levett, 2004).

Cambios significativos han ocurrido en la epidemiología de la leptospirosis en los últimos años. En países desarrollados la enfermedad es menos prevalente que hace una o dos generaciones, y es debido a varias razones. El incremento de la urbanización ha

reducido la oportunidad de exposición en el ambiente rural y la inmunización ha controlado la enfermedad en los animales domésticos (Levett, 2004).

En los caninos la prevalencia de *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* ha disminuido desde que comenzó la vacunación (André-Fontaine, 2006; Golstein, 2010). Los serovares aislados en caninos en Argentina son *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pyrogenes* y *Buenos Aires* (Rossetti *et al.*, 2005; AAVLD, 2006). Los serovares con mayor seroprevalencia en caninos son *Canicola*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Icterohaemorrhagiae*, *Castellonis*, *Copenhageni* y *Djasiman* (AAVLD, 1994; Rossetti *et al.*, 1999; Rossetti *et al.*, 2001; Cramer *et al.*, 2008).

#### **2.4. Leptospirosis en caninos**

La leptospirosis canina fue descrita por primera vez en 1899, y es actualmente conocida como causa de enfermedad febril y enfermedades hepáticas y renales (Bolin, 1996).

##### **2.4.1. Período de incubación**

El período de incubación de leptospirosis puede ser corto, de pocos días de evolución, hasta aproximadamente 20 días, dependiendo de las dosis infectante, la cepa y la respuesta inmune del huésped (Bolin, 1996; Sykes *et al.*, 2011). Luego de la penetración los organismos se replican en sangre, tan temprano como 1 día luego de la entrada al espacio vascular sanguíneo. Se inicia así la fase leptospirémica, la cual dura pocos días, implicando la replicación de la bacteria y el daño endotelial. Luego de esta fase ocurre la invasión a los principales tejidos, como el hígado, riñón, bazo, tracto



reproductivo, ojos y sistema nervioso central (Bolin, 1996; Levett 2001a; André-Fontaine, 2006; Goldstein, 2010). El daño a los órganos se produce fundamentalmente por la replicación y la inducción de producción de citoquinas e invasión de las células inflamatorias. La replicación inicial daña las células del endotelio y más tarde las células del hígado y el bazo (Midwinter *et al.*, 1994; Saravanan *et al.*, 1999; Plank and Dean, 2000; Goldstein, 2010). La colonización ocurre en la mayoría de los caninos infectados que no tienen adecuada protección por una exposición previa o por vacunaciones (Goldstein, 2010). La inmunización con vacunas de *Leptospira* permiten proteger a los animales de la leptospirosis clínica como así también prevenir la leptospiremia, la infección renal y la eliminación por orina (Schreiber *et al.*, 2005; Minke *et al.*, 2009).

#### 2.4.2. Patogenia de la Enfermedad

La secuencia de eventos luego de la infección depende de la virulencia, el serovar infectante y el número de bacterias que infectaron al huésped, y la respuesta inmune. Previa exposición (naturalmente o por vacunaciones) al mismo serovar provee algún grado de inmunidad (Plank and Dean, 2000; Barthi *et al.*, 2003; Klaasen *et al.*, 2003; Goldstein, 2010). Varios factores de virulencia se han identificado como los LPS (lipopolisacáridos), hemolisinas, proteínas de la membrana externa y otras proteínas de superficie como las moléculas de adhesión (Evangelista and Coburn, 2010; Adler, 2011). La unión de las proteínas a la fibronectina puede ser significativa en la adhesión inicial y la invasión a los sitios de entrada como mucosas o piel (Figura 5).

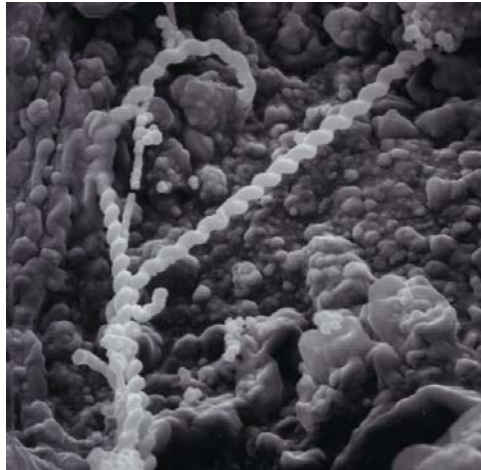


Figura 5: Escaneo micrográfico de electrones de la adhesión/invasión de una *Leptospira* patógena al epitelio conjuntival del equino (Barthi *et al.*, 2003).

La movilidad es probablemente importante en la infección inicial y en la diseminación de los organismos desde el sitio de entrada hasta el órgano de destino (Bharti *et al.*, 2003).

La respuesta inmune del huésped es mediada en gran parte por la respuesta humoral. Los anticuerpos que producen son principalmente hacia los LPS (Evangelista and Koburn, 2010). Los anticuerpos reducen el número de espiroquetas en los lugares colonizados, pero pueden persistir en el riñón (Bolin, 1996).

El daño que ocasionan las leptospiras y los órganos de destino difieren.

-En los riñones las leptospiras persisten y se multiplican en las células del epitelio tubular renal causando liberación de citoquinas, reclutamiento de células inflamatorias y nefritis aguda.

-En el hígado se produce una necrosis centrilobular y daño subcelular, además de la oclusión de conductos y el canalículo biliar provocando ictericia.

-En el endotelio, se produce edema tisular y coagulación intravascular diseminada. Esto ocurre en los primeros días de la infección y como resultado de la injuria endotelial aguda. Otras manifestaciones que ocurren por lesiones o injurias a otros órganos pueden ser las meningitis, no documentada en caninos (Michna, 1970; Monahan *et al.*, 2009; Sykes *et al.*, 2011); la uveítis y las manifestaciones pulmonares asociadas con hemorragias pulmonares (Plank and Dean, 2000; Levett, 2001a; Barthi *et al.*, 2003; Goldstein, 2010).

En la fase de localización, los serogrupos tienen especificidad lesional y tropismo diferente. En general el serovar Icterohaemorrhagiae afecta principalmente el hígado produciendo en más del 70% de los casos ictericia y también produce síndrome hemorrágico, mientras que la infección por Canicola está asociada principalmente con la enfermedad renal, generalmente nefritis intersticial y la gastroenteritis. Los caninos infectados con el serovar Grippityphosa pueden mostrar infección renal aguda o crónica sin otra manifestación multisistémica (Brown *et al.*, 1996; Levett, 2001a; Geisen *et al.*, 2007; Vijayachari *et al.*, 2008; Monahan *et al.*, 2009; Sykes *et al.*, 2010). Caninos infectados con Pomona y Bratislava mostraron falla renal aguda y diversos grados de azotemia (Adin and Cowgill, 2000). La persistencia de leptospiras (serovar Canicola) en los riñones dan origen a los huéspedes de mantenimiento, que eliminan bacterias en orina durante meses y años (Levett, 2001a; Vijayachari *et al.*, 2008; Monahan *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010; Sykes *et al.*, 2010).

#### 2.4.3. Signos clínicos

La infección de caninos con leptospiras resulta en una enfermedad de severidad variada. Algunos caninos presentan signos leves o no presentan signos de enfermedad

mientras que otros desarrollan enfermedad pulmonar, hepática y renal severa o muerte (Brown *et al.*, 1996; Goldstein, 2010; Sykes *et al.*, 2011). Los signos más comunes son fiebre, inapetencia, vómitos, dolor abdominal, diarrea, poliuria/polidipsia, mialgia, dolor de cabeza, hematuria, falla reproductiva, falla hepática o renal y hemorragia pulmonar (Bolin, 1996).

-La forma sobreaguda se manifiesta por una leptospiruria masiva, fiebre (>39.5°C), temblores, un estado de shock y muerte. Sobrevienen alteraciones digestivas (vómitos y deshidratación), rápido colapso cardiovascular y sangrado. Los animales mueren antes de que se desarrolle la enfermedad (Barnett *et al.*, 1999). En los últimos años se han reportado casos de Síndrome de Hemorragia pulmonar en caninos, similar a los producidos en humanos (Klopfleisch *et al.*, 2010).

-En las formas menos graves (aguda y subaguda) la enfermedad se caracteriza por fiebre, anorexia, vómitos, diarrea, dolores musculares, hiperesplenismo, deshidratación y hemorragia (Adamus, 1997).

-Las infecciones subclínicas en perros por serovares patogénicos ocurren más frecuentemente que la enfermedad clínica (Langston and Heuter, 2003; Goldstein, 2010).

## **2.5. Diagnóstico**

Conseguir el diagnóstico definitivo de leptospirosis es de especial importancia debido a que la leptospirosis es una enfermedad zoonótica y posiblemente el canino es un reservorio que puede infectar a otros caninos y al ser humano (Goldstein, 2010).

Lamentablemente no es posible llegar a un diagnóstico de leptospirosis basándose solamente en los signos clínicos o en los resultados de las pruebas rutinarias de laboratorio, debido a que es difícil de diferenciar de otras enfermedades (Levett, 2001a; Adler and De la Peña Moctezuma, 2010). Para establecer un diagnóstico definitivo de leptospirosis es necesario el apoyo del laboratorio especializado. Todas las pruebas diagnósticas para la detección de leptospiras o de anticuerpos presentan ventajas y desventajas, por lo cual se recomienda la utilización de una combinación de dos o más pruebas para permitir una mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico (Michna, 1970; WHO, 2003; Goris *et al.*, 2012).

#### 2.5.1. Técnicas de detección del microorganismo

##### 2.5.1.1. Examen directo en campo oscuro

Es la observación directa de leptospiras en orina y otros fluidos corporales como sangre, líquido cefalorraquídeo o líquido peritoneal, en microscopio de campo oscuro (Levett, 2004). La principal ventaja de esta técnica es la sencillez de su realización y la rapidez con que permite realizar un diagnóstico presuntivo. Las principales desventajas son su baja sensibilidad y especificidad (Vijayachari *et al.*, 2001). Baja sensibilidad debida a que son necesarias  $10^4$  leptospiras por mililitro de muestra para poder ser detectadas (Levett, 2001a); y baja especificidad debido a los artefactos presentes en las muestras que son difíciles de distinguir de las leptospiras (proteínas séricas, hebras de fibrina y otros residuos celulares). Además las leptospiras están presentes en la orina en concentraciones muy bajas y su eliminación se produce de manera intermitente (Bolin, 1996; WHO, 2003). Esta técnica no es suficiente para hacer un diagnóstico definitivo ni

para descartar una leptospirosis en un diagnóstico diferencial (Barthi *et al.*, 2003; WHO, 2003).

2.5.1.2. Inmunofluorescencia directa, Inmunohistoquímica y tinciones histológicas especiales.

Son técnicas rápidas con una mayor sensibilidad y especificidad que la observación directa en campo oscuro. La sensibilidad depende del tipo de muestras enviadas en relación con el momento de la infección, su grado de conservación y el número de leptospiras presentes en las mismas (Bolin, 1996). Las coloraciones argénticas son usadas frecuentemente para identificar leptospiras en tejidos fijados. Sin embargo, las dificultades de este método surgen por la extensa coloración de la reticulina y la inhabilidad de reconocer fragmentos de leptospiras, especialmente si hay pocos organismos (Wild *et al.*, 2002). La inmunohistoquímica, que amplifica la señal por un anticuerpo secundario que es contrateñido con hematoxilina, no tiene mayor sensibilidad que los métodos de coloración argénticos, pero facilita el diagnóstico y permite una mejor evaluación de la morfología de los tejidos y patogenia de la enfermedad (Pereira da Silva *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2002). La interpretación de los test de inmunofluorescencia puede ser dificultosa y requiere personal de laboratorio experto (Bolin, 1996). La especificidad es menor en el caso de las tinciones histológicas especiales que en el caso de la fluorescencia e inmunohistoquímica, ya que éstas utilizan anticuerpos específicos frente al germen (Hernández, 2005). En general los conjugados no permiten la determinación de la serovariedad, ya que se preparan con anticuerpos policlonales (Prescott, 1991).

### 2.5.1.3. Cultivo de Leptospiras.

El cultivo y aislamiento de las leptospiras a partir de distintas muestras biológicas es el método definitivo de diagnóstico de leptospirosis. La leptospiremia ocurre tempranamente en el curso clínico de la enfermedad y generalmente es de corta duración y de bajo nivel. En la orina las leptospiras están presentes luego de 4 a 10 días de iniciados los signos clínicos y la duración de la excreción es variable (Bolin, 1996; Levett, 2001a; Levett, 2004). El aislamiento del organismo permite la identificación definitiva de la cepa infectante por medio de la caracterización genética y serológica de los mismos (Levett, 2004). Sin embargo el cultivo es un procedimiento difícil, laborioso y lento, requiere varias semanas de incubación por lo que la mayor parte de los laboratorios no lo realizan de rutina (Surujballi *et al.*, 1997; Levett, 2001a; Barthi *et al.*, 2003).

La sensibilidad de la técnica no excede el 20% (Goris *et al.*, 2012; Limmathurotsakul *et al.*, 2012), y está condicionada por diversos factores como el grado de autólisis y contaminación de las muestras, el tiempo transcurrido desde la obtención hasta la inoculación de los medios de cultivo, el uso de los medios de transporte y cultivos apropiados y de la siembra de diferentes diluciones de la muestra en estos medios (Michna, 1970). Las muestras de sangre deben ser colectadas en heparina u oxalato de sodio y transportadas a temperatura ambiente, no debe usarse citrato ya que es inhibitorio, además las muestras no deben ser colocadas en el freezer y deben ser inoculadas en un medio semi-sólido dentro de las 24 hs de la extracción (Barthi *et al.*, 2003).

Las muestras de caninos utilizadas para cultivo son:

-sangre en la fase aguda de la infección, específicamente en la primera semana tras el comienzo de los síntomas y antes de iniciar el tratamiento antibiótico;

-orina (muestra más utilizada) a partir del cuarto al décimo día del inicio de los síntomas;

-muestras de tejido postmortem o fetos (hígado, riñón y pulmón en fetos) (Michna, 1970).

Los aislamientos de leptospiras son identificados por métodos serológicos o más recientemente por técnicas moleculares. Los métodos tradicionales se basaron en la absorción cruzada de aglutininas, sin embargo los laboratorios que pueden acceder a esta técnica son muy pocos (Levett, 2004). El uso de paneles de anticuerpos monoclonales permite a los laboratorios que realizan MAT, identificar aislamientos con relativa rapidez. Sin embargo no existen anticuerpos monoclonales para todos los serovares de leptospiras (Terpstra *et al.*, 1987; Levett, 2004). Debido a las dificultades asociadas con la identificación serológica, se desarrollaron técnicas a partir de la biología molecular (Levett, 2004). Numerosas técnicas se han utilizado, tales como análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Marshall *et al.*, 1981), análisis de los genes del ARN ribosómico el 16S rRNA (Perolat *et al.*, 1990; Morey *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2009), electroforesis en gel en campo pulsante y algunas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Brown and Levett, 1997; Levett, 2001a). En los últimos años se desarrollaron nuevas técnicas moleculares como las repeticiones en tandem en número variable (VNTR, del inglés, “*Multilocus variable number tandem repeat*”), el MLVA (del inglés, “*Multilocus VNTR Analysis*”) y el MLST (del inglés, “*multilocus sequence typing*”) (Majed *et al.*, 2005;



Ahmed *et al.*, 2006; Salaün *et al.*, 2006; Thaipadungpanit *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2012).

#### 2.5.1.4. Técnicas de Biología Molecular.

La PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) es una técnica utilizada para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Barthy *et al.*, 2003; Toyakawa *et al.*, 2011). Numerosos pares de primers se han descrito para la detección de leptospirosis, pero son dos principalmente los que han tenido una extensa evaluación clínica (Levett, 2004). Ambos métodos son más sensibles que el cultivo, pero tienen limitaciones. Los primers descritos por Merien *et al.*(1992), amplifican fragmentos del 16s RNA tanto de leptospiras patógenas como no patógenas, mientras que los primers descritos por Gravekamp *et al.*(1993) no amplifica serovares de *L. kirschneri*.

Estas técnicas permiten amplificar fragmentos de DNA presente en suero, orina, humor acuoso y tejidos corporales (Gravekamp *et al.*, 1993; Bal *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Merien *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2003). Las ventajas principales son su rapidez y que no requieren que las leptospiras estén viables o que mantengan su integridad morfológica y antigénica (WHO, 2003). Además poseen una especificidad y sensibilidad que puede variar entre un 50% y 90%. Esta técnica es muy útil como prueba de diagnóstico de leptospirosis aguda en las fases iniciales de la enfermedad, ya que puede dar un resultado positivo antes de que se desarrolle un título de anticuerpos detectable o cuando los títulos son bajos (Ralph *et al.*, 1993; Cerqueira and Picardeau, 2009; Toyakawa *et al.*, 2011).

La mayor limitación es la posible presencia de inhibidores en la muestra, principalmente en las muestras de tejidos, dando lugar a resultados falsos negativos. Otro inconveniente es que es una prueba muy susceptible a los contaminantes con DNA exógeno, pudiendo producirse falsos positivos (Cerqueira and Picardeau, 2009).

Actualmente se utiliza la real time PCR, una técnica simultánea de amplificación y detección. Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la PCR convencional como son la rapidez por su menor tiempo de ensayo, automatización, posibilidad de cuantificar el producto obtenido, mayor sensibilidad debido a que el límite de detección es muy bajo,  $10^3$  bacteria/ml y mayor especificidad ya que se pueden utilizar oligonucleótidos específicos combinados con fluoróforos como método de detección (Smythe *et al.*, 2002). Además mediante esta técnica se pueden diferenciar leptospiras patógenas de no patógenas (Barthy *et al.*, 2003). El inconveniente que presenta es su mayor costo y equipamiento necesario, por lo que es utilizada en pocos laboratorios y referenciales, además uno de los factores críticos es la extracción del DNA de la muestra clínica (Cerqueira and Picardeau, 2009; Bourhy *et al.*, 2011).

Tanto en la PCR convencional como en la real time PCR no se puede determinar cuál es la serovariedad infectante. Si bien conocer el serovar infectante no es necesario para el manejo del paciente, es muy útil para epidemiología y salud pública (WHO, 2003; Levett, 2004). En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular que permiten determinar la cepa infectante (16S rRNA, VNTR, MLST), pero estas técnicas son más complejas y sólo están disponibles en pocos laboratorios de investigación (Cerqueira and Picardeau, 2009; Ahmed *et al.*, 2012).

## 2.5.2. Técnicas de detección serológicas.

### 2.5.2.1. Microaglutinación (MAT)

Es la técnica serológica de referencia internacional para la confirmación de los casos de leptospirosis. Ha sido empleada por más de 70 años, y en la actualidad es la prueba más utilizada para el diagnóstico de la enfermedad (Guerreiro *et al.*, 2001; Levett, 2001a). En esta técnica los sueros de los pacientes reaccionan con suspensiones vivas de diferentes serovares de leptospiras. Luego de la incubación, el suero/antígeno es examinado por microscopía de campo oscuro para observar aglutinación y determinar los títulos (Bolin, 1996; Levett, 2004; Goldstein, 2010). Esta técnica es compleja, laboriosa, de difícil estandarización y subjetiva en su lectura (Levett, 2001a).

La lectura de MAT es realizada por microscopio en campo oscuro. El título de corte es la mayor dilución del suero en la cual ocurre una aglutinación del 50%. Debido a la dificultad de determinar el 50% de aglutinación, se determina el 50% de leptospiras libres, comparándolo con el control (WHO, 2003), por lo tanto la lectura es subjetiva y es diferente en cada observador (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2004).

El rango de antígenos usados debe incluir serovares representativos de todos los serogrupos y de la región. Por lo que una muestra de suero debe ser testeado contra múltiples antígenos para establecer su condición negativa (Levett, 2001a; Adler and De la peña Moctezuma, 2010). La MAT es una prueba serogrupo específica y se basa en la reactividad con antígenos lipopolisacáridos (Levett, 2004). Las variaciones de los carbohidratos de las cadenas de los lipopolisacáridos son los responsables de la diversidad antigénica observada en los diferentes serovares de leptospira (Guerreiro *et al.*, 2001).

El uso de organismos vivos como antígenos es una de las desventajas de este método. Es necesario mantener cultivos de todas las serovariedades que se van a utilizar, lo que supone subcultivar rutinariamente gran cantidad de cepas, con el consiguiente riesgo de infección para el personal de laboratorio. Además, esto supone un riesgo de contaminaciones cruzadas entre los antígenos, siendo necesario realizar verificaciones periódicas de cada serovariedad (Levett, 2001a).

La interpretación de los resultados es complicada debido a las reacciones cruzadas que ocurren entre los diferentes serogrupos, especialmente en muestras de fase aguda. Los pacientes generalmente presentan similares títulos a los serovares de un mismo serogrupo, pero existen reacciones “paradojales” en las cuales se detectan altos títulos a serogrupos no relacionados con el infectante (Levett, 2001a; WHO, 2003; Levett, 2004; Goldstein, 2010). Estas reacciones cruzadas son el resultado de la detección en la MAT de anticuerpos de tipo IgM e IgG (Adler and Faine, 1978), así como de la presencia de varios antígenos comunes entre las leptospiras (Adler and Faine, 1978; Chapman *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1997). Tras el período inicial de la enfermedad, estos anticuerpos desaparecen gradualmente a medida que la respuesta inmunitaria madura, sólo permanecen detectables durante unas semanas o unos meses. Por el contrario, los anticuerpos específicos de serovariedad y serogrupo pueden determinarse por MAT durante años (WHO, 2003). Esto indica que un resultado positivo en la MAT puede ser de escasa utilidad para diferenciar una infección presente de una infección pasada (Lupidi *et al.*, 1991; Levett and Branch, 2002).

Sueros pareados se requieren para realizar un diagnóstico confirmatorio. Un aumento de cuatro títulos o mayor entre sueros pareados confirma el diagnóstico de

leptospirosis aguda (Bolin, 1996; Barr *et al.*, 2005; Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). El intervalo entre una primera y segunda muestra depende de los síntomas y la forma de presentación de la enfermedad. Debido a que la seroconversión no ocurre rápidamente, el intervalo de tiempo entre una y otra muestra debe ser prolongado (10-14 días) y si es necesario se debe repetir la toma de muestra (Brandao *et al.*, 1978; Appassakij *et al.*, 1995; Bolin, 1996; Cumberland *et al.*, 1999). Sin embargo en los casos en los que se comienza temprano con una terapia antibiótica, puede ocurrir que no se observe seroconversión y que no llegue a detectarse un título significativo (Goldstein, 2010). El diagnóstico de leptospirosis aguda basado en una simple muestra debe ser realizado con cautela, debido a que los animales que han tenido una infección anterior pueden tener un título de anticuerpos significativo en la primera muestra de suero examinada. Aunque normalmente hay un descenso gradual del título de anticuerpos a medida que pasa el tiempo, es posible observar títulos mayores de 1:100 hasta dos años después de la infección y recuperación del animal (Bolin, 1996). La MAT es insensible, particularmente en muestras tempranas de la fase aguda de la enfermedad debido a que los títulos de anticuerpos comienzan a elevarse a partir de los 7 días de iniciada la enfermedad (Faine, 1982; Sehgal *et al.*, 1999; Levett, 2001a; Goldstein, 2010; Sykes *et al.*, 2011).

La MAT sólo detecta anticuerpos aglutinantes, y por lo tanto los anticuerpos no-aglutinantes no son detectados (Hartman *et al.*, 1984b; Ribotta *et al.*, 2000; Surujballi and Mallory, 2004; Iwamoto *et al.*, 2009;). A su vez, esta técnica no permite diferenciar entre anticuerpos vacunales y los producidos por la infección (Levett, 2001a). Por ello la vacunación canina con vacunas que contienen las serovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae dificulta la interpretación de los resultados serológicos frente a

estas serovariedades. En general, los perros desarrollan un título de anticuerpos aglutinantes relativamente bajo en respuesta a la vacunación (1/100 a 1/400) y estos títulos persisten solamente durante 1-3 meses. Sin embargo, algunos perros desarrollan títulos más elevados (1/3200), y aunque estos títulos declinan con el tiempo, pueden persistir hasta seis meses o más tras la vacunación, complicando el diagnóstico (Hartman *et al.*, 1984a; Barr *et al.*, 2005). Cuando sólo se obtiene una muestra para el diagnóstico de la enfermedad, deben considerarse los signos clínicos y los antecedentes de vacunación del canino (Bolin, 1996).

#### 2.5.2.2. Antígeno termorresistente (TR).

En esta técnica se enfrenta el suero del paciente con un antígeno género específico obtenido a partir de una cepa de *Leptospira* inactivada por calor (30 minutos a 100°C) (Mailloux *et al.*, 1974; Mazzonelli *et al.*, 1974). Luego de unos pocos minutos, se logra observar una aglutinación macroscópica característica. La ventaja de esta técnica es su rapidez, facilidad de ejecución y su seguridad, debido a los antígenos utilizados (Mailloux *et al.*, 1974). El TR es una técnica que puede usarse como tamiz en laboratorios clínicos de rutina menos especializados, indicado para el diagnóstico de infecciones recientes y en la fase aguda de la enfermedad, con la subsecuente confirmación de los resultados con la técnica de referencia MAT (Seijo and Mazzonelli, 1993; Brandao *et al.*, 1998; Lilenbaum *et al.*, 2002). En Argentina, el laboratorio de referencia Nacional, perteneciente a la Red Nacional de Laboratorios de Leptospirosis (RNLL), produce el reactivo TR y lo distribuye a los laboratorios provinciales de salud pública para diagnóstico presuntivo precoz de leptospirosis en humanos.

No obstante, este método tiene numerosos inconvenientes, se requiere el uso de muestras límpidas y bien conservadas, la producción del reactivo es de difícil estandarización, tanto entre laboratorios como dentro de un mismo laboratorio, y su interpretación es subjetiva, lo que dificulta la obtención de resultados comparables. Además, existen estudios que describen la obtención de resultados falsos negativos y falsos positivos utilizando este antígeno (Banfi *et al.*, 1984; Regalado Segui *et al.*, 1990; Levett, 2001a;).

Existen en la actualidad pocos estudios publicados sobre validaciones del TR no solo en humanos (Sulzer *et al.*, 1975; Regalado Segui *et al.*, 1990; Seijo and Mazzonelli, 1993; Brandao *et al.*, 1998;) sino también en las diferentes especies animales (Weber *et al.*, 1984; Lilenbaum *et al.*, 2002). Los resultados de sensibilidad y especificidad del TR son muy dispares. Además, la metodología utilizada varía en cada estudio por lo cual es difícil comparar y obtener conclusiones claras de cada uno de ellos. Algunos estudios en seres humanos hallaron altas sensibilidades y especificidades (> 95%) (Seijo and Mazzonelli, 1993; Brandao *et al.*, 1998), otros han reportado menores valores de sensibilidad y especificidad (69% y 83%) (Sulzer *et al.*, 1975). En caninos, uno de los pocos estudios hallados describe una sensibilidad del 94.3% y especificidad de 91.7% (Lilenbaum *et al.*, 2002).

#### 2.5.2.3. Enzimoimmunoensayo (ELISA).

Es una técnica serológica que se usa de varias maneras dependiendo del tipo de antígeno y los reactivos empleados durante el curso de la prueba (Adler *et al.*, 1980; Terpstra *et al.*, 1985). La prueba sólo detecta anticuerpos género específicos y no es

apropiada para la identificación del serogrupo o serovar. Los anticuerpos en los sueros a estudiar son puestos en contacto con un antígeno que está fijado en un soporte sólido como una placa de microtitulación. Luego de un período de incubación y de numerosos lavados para eliminar excesos de anticuerpos, se añade un anticuerpo antiespecie (a la cual pertenece el suero probado) conjugado con una enzima. La actividad enzimática es entonces determinada por el agregado de un sustrato cromogénico. La intensidad de la reacción de color, que está relacionada con la cantidad de sustrato degradado, es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero (WHO, 2003).

Las técnicas de ELISA son sencillas de realizar, seguras, fáciles de automatizar y, por ello, útiles para analizar un gran número de muestras en poco tiempo (Tijssen, 1987; Ribotta *et al.*, 2000).

En laboratorios donde no se dispone de los equipos y de la destreza necesarios para la realización de la MAT, el resultado del ELISA puede adelantar el diagnóstico presuntivo hasta tanto se pueda derivar la muestra a un laboratorio de referencia para confirmación por MAT (Ribotta *et al.*, 2000).

Además es aconsejable incluir dentro de las pruebas diagnósticas una prueba género específica como es el ELISA debido a que el panel de leptospiras a probar en la MAT no siempre incluye las cepas que están causando la enfermedad (WHO, 2003). En estas pruebas género-específicas se detectan anticuerpos que reaccionan frente a diferentes antígenos como las proteínas de la membrana externa y carbohidratos de bajo peso molecular. Los carbohidratos generan una fuerte respuesta de inmunoglobulinas de tipo IgM en etapas muy precoces de la enfermedad (Chapman *et al.*, 1991).



La detección de inmunoglobulinas por ELISA ha sido ampliamente usada para el diagnóstico de Leptospirosis y esta técnica es más sensible que la MAT (Adler *et al.*, 1980; Hartman *et al.*, 1984b; Ribotta *et al.*, 2000). Adler and Faine (1983) demostraron la presencia de anticuerpos género y especie específicos, no aglutinantes, que sólo pueden ser detectados por ELISA. Los ELISAs detectan ambos anticuerpos, aglutinantes y no aglutinantes, estos últimos no son detectados por la MAT (Adler *et al.*, 1980; Cumberland *et al.*, 1999; Ribotta *et al.*, 2000; Levett and Branch, 2002).

La eficacia del ELISA depende de tres factores como son el momento de recolección de la muestra (etapa aguda o convaleciente), el tipo de inmunoglobulina detectado y el tipo de antígeno utilizado.

**Tipo de Inmunoglobulina:** La IgM fue detectada por la técnica de ELISA a partir de los 3 días de iniciados los síntomas (Adler *et al.*, 1980; Thiermann *et al.*, 1983; Winslow *et al.*, 1997). En la respuesta inmune, la IgM es la primera en aparecer, pero en individuos con una infección previa clínica o subclínica, la inmunoglobulina que aparece antes y con mayor título es la IgG (Terspestra *et al.*, 1985; Trueba *et al.*, 1991; Cumberland *et al.*, 1999). Según Adler *et al.* (1980) en los animales el patrón de la respuesta de IgG e IgM sigue un patrón clásico (Adler and Faine, 1978). La IgG comienza a generarse luego de la IgM, y perdura por más tiempo (Adler *et al.*, 1982). En general, el ELISA IgG aunque no permite detectar infecciones muy recientes posee una mayor especificidad que el ELISA IgM (Tijssen, 1987; Aviat *et al.*, 2010). Según Trueba *et al.* (1990), la determinación de IgG es más eficiente y podría tener más aplicaciones prácticas que la IgM. Estos hallazgos se explican por que la IgG tiene mayor afinidad por los sitios de unión del antígeno que la IgM (Bajani *et al.*, 2003).

Actualmente existen varios métodos comerciales que detectan tanto IgM como IgG (Winslow *et al.*, 1997; Bajani *et al.*, 2003; WHO, 2003; Costa Ooteman *et al.*, 2006; Mc Bride *et al.*, 2007).

**Tipo de antígeno:** Los antígenos utilizados para detectar los anticuerpos por medio de la técnica de ELISA son varios entre ellos están los antígenos sonicados (Antígeno extractivo), antígenos obtenidos por calentamiento de células enteras, péptidos sintéticos y antígenos recombinantes.

Los antígenos sonicados que son lisados de extractos celulares crudos y los antígenos estables a calor obtenidos por calentamiento de células enteras comparten determinantes antigénicos género-específicos, lo que permite que una preparación antigénica a un solo serovar es suficiente para el diagnóstico de la leptospirosis causada por diferentes serovares (Adler *et al.*, 1980; Adler and Faine, 1983; Fairbrother, 1984; Milner *et al.*, 1985; Terpstra *et al.*, 1985; Ribotta *et al.*, 2000; Surujballi and Mallory, 2004; Mc Bride *et al.*, 2007). Los antígenos sonicados permiten detectar anticuerpos contra diferentes antígenos presentes en las leptospiras, no sólo los implicados en la aglutinación como los que detecta la MAT (Adler *et al.*, 1980). Esto constituye una ventaja con respecto a la sensibilidad de los métodos de ELISA que utilizan este antígeno.

Los péptidos sintéticos P1 y P2, contienen epitopes antigénicos de la LipL32. Ambos fueron capaces de reconocer anticuerpos específicos (Lottersberger *et al.*, 2009). Los mismos hallazgos fueron realizados por Aviat *et al.* (2010) quienes además demostraron que la activación de la respuesta inmune frente a los péptidos era más rápida que la respuesta de anticuerpos aglutinantes.

Los antígenos recombinantes son proteínas con propiedades inmunogénicas, presentes en *Leptospira spp.* patógenas. La más importante es la LipL32, pero también se utilizan la OmpL1, Lig, LipL41, LipL36 (Flannery *et al.*, 2001; Dey *et al.*, 2004; Iwamoto *et al.*, 2009; La-ard *et al.*, 2011). El uso del antígeno recombinante LipL32 tiene como ventaja la seguridad en el manejo, a diferencia de los extractos que se preparan a partir de cultivos de leptospiras (Bomfim *et al.*, 2005). Los test serológicos basados en estas proteínas recombinantes pueden lograr altas sensibilidades y especificidades debido a la alta concentración de antígeno inmuno-reactivo y la falta de antígenos no específicos, que sí están presentes en preparaciones de células enteras (Flannery *et al.*, 2001). La respuesta inmune frente a LipL32 termina cuando el proceso de invasión de cepas virulentas es detenido por el suministro de antibióticos (Aviat *et al.*, 2010). La LipL32 es producida en etapas tempranas de la enfermedad y luego es liberada al medio, por lo tanto es posible que la respuesta específica frente a esta lipoproteína se active durante la etapa de incubación de la enfermedad, mientras que la respuesta de anticuerpos aglutinantes hacia antígenos lipopolisacáridos aparece más tarde (Aviat *et al.*, 2010).

La mayor desventaja de utilizar un ELISA basado en la detección de anticuerpos IgG para el diagnóstico temprano, es la aparición tardía de estos anticuerpos durante el curso de la respuesta inmune (Tahiliani *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que la cinética de la respuesta inmune IgG contra proteínas recombinantes es comparable a la respuesta IgM contra preparaciones de extractos celulares (Haake *et al.*, 2000b; Dey *et al.*, 2004; Tahialini *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que la proteína recombinante fue capaz de inducir una respuesta IgG robusta frente a una respuesta IgM indetectable, lo que se debió presumiblemente a una rápida

seroconversión IgM-IgG (Haake *et al.*, 2000b; Dey *et al.*, 2004; Tahialini *et al.*, 2005). Según Flannery *et al.* (2001) el ELISA con antígeno recombinante LipL32 demostró una sensibilidad comparable a los test de screening en la fase aguda de la enfermedad y una alta sensibilidad en la fase convaleciente. Recientemente, se encontró reactividad IgG anti LipL32 en la fase convaleciente, mientras que poca o nula reactividad en la fase temprana (Neves *et al.*, 2007).

Los ELISAs desarrollados reportados en caninos, con diferentes antígenos, que detectan IgM y/o IgG, muestran diferentes sensibilidades y especificidades. Estudios que utilizaron antígenos calentados o extractos crudos mostraron una sensibilidad de 100% y especificidad de 95.6% (Ribotta *et al.*, 2000) y “Muy buena” concordancia del ELISA con la MAT ( $k=0.8$ ) (Arias *et al.*, 1999), respectivamente. Otros estudio que utilizaron proteínas recombinantes como antígeno obtuvieron sensibilidades y especificidades del 96.9% y 97.08%, respectivamente para la LipL32 (Dey *et al.*, 2004), y del 84.5% y 77.0% respectivamente para el antígeno recombinante del gen Lig A y B (La-Ard *et al.*, 2011). Según Iwamoto *et al.* (2009) la sensibilidad hallada en un ELISA con la proteína recombinante OmpL1 fue muy baja (8.6%), pero la especificidad fue alta (96.2%).

#### 2.5.2.4. Otros métodos serológicos.

Entre ellos se pueden citar a la Hemaglutinación indirecta (IHA), contrainmunolectroforesis, hemoaglutinación (HA), radioinmunoensayo, entre otros (Levett, 2001a, WHO, 2003). Estos métodos se emplean como tamiz pero en la actualidad la gran mayoría de ellos no son utilizados.

Uno de los avances más recientes fueron los métodos rápidos de diagnóstico en humanos que usan diferentes formatos de ELISA como el test Dipstick-IgM y los principales métodos de aglutinación como es el Test de aglutinación al latex (Smits *et al.*, 1999; Levett *et al.*, 2001b; Effler *et al.*, 2002; Dey *et al.*, 2007; Mc Bride *et al.*, 2007). La mayoría de estos métodos son comercializados pero no están disponibles en Argentina.

## **2.6. Conceptos estadísticos y epidemiológicos.**

### **2.6.1. Sensibilidad y Especificidad**

La evaluación de una prueba con respecto al estado verdadero de salud de un individuo se mide como sensibilidad y especificidad (Tarabla, 2000). La sensibilidad es la probabilidad condicional de un resultado positivo en un individuo con la enfermedad. Más grande es esta probabilidad, más sensible es la prueba. La especificidad es la probabilidad condicional de un resultado negativo en un individuo sin la enfermedad, más grande es esta probabilidad, más específica es la prueba. Para validar una prueba, sus resultados pueden ser comparados con el verdadero estado de salud de los individuos frecuentemente determinado por una prueba patrón o estándar de oro. Este es un método de diagnóstico o una combinación de ellos que determina en forma absoluta y sin error si una enfermedad/infección está presente en un individuo (Tarabla, 2000).

### **2.6.2. Curva de eficacia diagnóstica.**

Para el cálculo de las áreas de superposición en las pruebas que expresan sus resultados bajo una escala continua puede utilizarse una técnica de análisis de una curva conocida como ROC (del inglés: *Receiver Operating Characteristic*). Esta curva es una representación gráfica de la relación entre la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica. Se construye graficando la sensibilidad contra (1-especificidad) y describe la habilidad de una prueba para discriminar entre animales enfermos y sanos. El área bajo la curva ROC (AUC, del inglés *Area Under the Curve*) es igual a la probabilidad de que un individuo con la enfermedad tomado al azar tenga un valor mayor en la medición que estamos efectuando, respecto de un individuo al azar sin la enfermedad. Una prueba perfecta tiene un área del 100%, mientras que una prueba que no mejora lo que obtendríamos por azar tiene un área del 50% (Tarabla, 2000). Esta curva puede ser calculada por medio del programa MedCalc (Schoonjans, 1995). Para la comparación de dos pruebas diagnósticas distintas, se comparan las AUC de ambas pruebas y la de mayor AUC será la de mayor eficacia diagnóstica.

### 2.6.3. Estadístico Kappa ( $\kappa$ ).

El *Kappa* ( $\kappa$ ) es una medida que corrige el resultado teniendo en cuenta el azar es, definido como la fracción de la concordancia observada que no es debido al azar con relación a la concordancia máxima posible no debida al azar cuando se utiliza una clasificación categórica de una variable. El  $\kappa$  se utiliza en la comparación de los resultados de una prueba con los de una prueba de “oro” (Szklo and Nieto, 2003).

#### 2.6.4. Estadístico $J$ de Youden

El estadístico  $J$  es un índice resumen de la validez que combina la sensibilidad y la especificidad. Este índice tiene la ventaja de no estar afectado por la prevalencia de la enfermedad y es uno de los parámetros preferidos, dado que utiliza una combinación simple de los valores de sensibilidad y especificidad. El valor máximo del índice es 1.0 cuando la sensibilidad y especificidad son óptimas. Un valor  $J = 0$  se obtiene cuando la prueba funciona igual que el simple azar (sensibilidad y especificidad de 50%). Este índice otorga igual peso a la sensibilidad que a la especificidad; por tanto supone que ambos son componentes importantes de la validez (Szklo and Nieto, 2003).

#### 2.6.5. Valores Predictivos (VPP y VPN).

El valor predictivo de la prueba positiva o valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de que un animal positivo a la prueba esté realmente enfermo. El valor predictivo de la prueba negativo o valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad que un animal negativo esté realmente sano.

Dos factores que influyen marcadamente en los valores predictivos son la sensibilidad y la especificidad. El VPP se ve más afectado por cambios en la especificidad de la prueba que por variaciones en la sensibilidad. Al aumentar la especificidad se aumenta notablemente el VPP, mientras que esos cambios son menos dramáticos cuando se aumenta la sensibilidad de la prueba diagnóstica. De la misma manera, el VPN se ve más afectado por variaciones en la sensibilidad de la prueba, no

obstante estas variaciones son menos notorias que las variaciones del VPP por cambios en la especificidad (Tarabla, 2000; Szklo and Nieto, 2003).

#### 2.6.6. Factor de riesgo. Odds Ratio (OR).

La asociación existente entre el factor de riesgo y la enfermedad puede predecir la existencia de la misma. El Odds ratio es la razón entre la probabilidad del evento de interés y la probabilidad del evento complementario (de que no se produzca el evento).

Aritméricamente se reduce a la razón de número de casos enfermos dividida por la de individuos que no desarrollan la enfermedad para cada categoría de exposición (Szklo and Nieto, 2003).

Para poder interpretar un OR es necesario siempre tener en cuenta cuál es el factor o variable predictiva que se estudia y cuál es el resultado o desenlace. El OR no tiene interpretación absoluta, siempre es relativa. El valor nulo para la OR es el 1. Un OR =1 implica que las dos categorías comparadas son iguales. El valor mínimo posible es 0 y el máximo teóricamente posible es infinito. Un OR inferior a la unidad se interpreta como que el desenlace es menos frecuente en el grupo que se ha elegido como de interés si en el grupo de referencia el evento ocurriera por azar (Aedo *et al.*, 2010).

El OR permite: reconocer la naturaleza como factor de riesgo o de protección de una exposición, identificar la magnitud o fuerza de la asociación, lo que permite hacer comparaciones. Su valor es independiente de la incidencia de la condición en estudio (Aedo *et al.*, 2010).



# MATERIALES Y MÉTODOS

---

3

## **CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Criterio de definición de casos:**

Se empleó un criterio de definición de casos que incluyó los resultados a la técnica serológica de referencia (MAT) y signos clínicos. Los criterios definidos son: Casos confirmados y controles.

Se definió como casos confirmados a los caninos con sospecha clínica de leptospirosis derivados para diagnóstico que resultaron positivos a la MAT en un título  $\geq 1/200$  en al menos un serovar.

Se consideró como controles a los caninos pertenecientes a una zona no endémica para la enfermedad, que no presentaron signos clínicos ni antecedentes de vacunación al momento de la extracción, que resultaron negativos a la MAT en un título  $< 1/100$ .

### **3.2. Muestras de Suero**

Se analizaron 287 muestras de sueros caninos, de los cuales 85 pertenecían a casos confirmados derivados para diagnóstico y 202 a controles. Las 287 muestras fueron empleadas para evaluar todos los métodos: ELISA-Ext, ELISA-P1, ELISA-P2, ELISA-Rec y TR.

Los casos confirmados fueron seleccionados a partir de muestras derivadas de la provincia de Entre Ríos, desde el año 2005 hasta el año 2010. Estas muestras fueron derivadas para diagnóstico de leptospirosis con la ficha clínico-epidemiológica correspondiente (Anexo I), al Laboratorio de Referencia Nacional de Leptospirosis del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Dr. E. Coni”. Todas ellas

pertenecían a caninos con enfermedad clínica compatible con leptospirosis que luego fue confirmada mediante MAT.

Los sueros de los controles fueron obtenidos a partir de dos muestreos realizados durante el año 2009, en diferentes zonas (periféricas, marginales, centro) de la ciudad de San Luis, área no endémica para leptospirosis. Lo mencionado anteriormente está relacionado con el clima de la ciudad de San Luis, que es de tipo continental seco con escasas lluvias y una temperatura anual media de 17°C. La prevalencia estimada de la enfermedad para el primer estudio (n= 89) fue 19.7% y para el segundo estudio (n=113) fue 6.6 %. Se incluyeron en este estudio como controles todas las muestras pertenecientes a ambos muestreos que resultaron negativas a la MAT para un título <1/100.

Los sueros de los casos confirmados y controles se conservaron a -70°C hasta la realización de las pruebas.

### **3.3. Enzimoimmunoensayos.**

#### **3.3.1. Obtención de antígenos.**

A) Antígeno extractivo: es un antígeno obtenido de un lisado de un cultivo de células completas de *Leptospira*. En la preparación de este antígeno, se utilizó un cultivo de L. Sejroe/ Hardjo. La elección de esta serovariedad como antígeno se debió a que utilizando antígenos sonicados es posible detectar anticuerpos género específicos de leptospirosis (Adler *et al.*, 1980; Adler y Faine, 1983; Fairbrother, 1984; Bughio *et al.*, 1999). El cultivo fue obtenido en medio líquido de Ellinghausen, McCullough, Johnson,

Harris (EMJH) de 7 a 14 días de desarrollo según la técnica descrita por Adler *et al.* (1980). El cultivo se centrifugó 20 minutos a 10 000 g, se lavó 3 veces con solución salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,2. Se sonicó 2 veces por 2 minutos, en un Equipo Cole Palmer Ultrasonic Cleaner Bath Potencia 100W 42 kHz.

El contenido proteico en el extracto empleado se determinó por el método de Bradford en 0.6 mg/ml. Finalmente se alicuotó y se conservó a -20°C hasta su uso.

B) Antígenos Sintéticos (P1 y P2): La síntesis química de cada péptido individual se realizó utilizando la química Fmoc (9-luorenilmetoxicarbonilo) para síntesis de péptidos en fase sólida, que se realiza desde el extremo C-terminal al N-terminal de la secuencia, según el método descrito por Atherton y Sheppard (1989). La técnica consiste en incorporar de a uno los aminoácidos sobre una resina sintética derivatizada de forma de obtener péptidos tipo amida (Tonarelli *et al.*, 2000). Por último se realiza la desprotección final del péptido y separación de la resina por tratamiento ácido TFA (trifluoroacético) en presencia de agentes de captura. Los péptidos sintetizados fueron purificados por extracción en fase sólida y cromatografía en fase reversa utilizando HPLC (del inglés: “*High performance Liquid Chromatography*”). Las muestras purificadas luego fueron liofilizadas. La síntesis de los péptidos fue realizada en el laboratorio de química orgánica (FBCB-UNL) por Lottersberger *et al.* (2009) y provista para esta tesis.

C) Antígeno Recombinante: La obtención del antígeno recombinante de la LipL32 se realizó por técnicas de ADN recombinante a partir de *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni cultivada axénicamente en medio EMJH líquido, durante 7-14 días (Flannery *et al.*, 2001). La expresión de las proteínas

recombinantes y el mantenimiento y replicación de los plásmidos se realizaron utilizando diferentes cepas de *E. coli*. La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC, del inglés: “*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*”).

Las proteínas recombinantes fueron sintetizadas y purificadas en el laboratorio de Microbiología aplicada, en el marco de un trabajo en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica Microbiana (FBCB-UNL); y fueron provistas para esta tesis.

### 3.3.2. Determinación de las condiciones óptimas y evaluación de la actividad biológica del ELISA IgG.

Como primer paso, se probaron diferentes marcas de placas de ELISA con un panel de suero de referencia reducido, para determinar cual permitía la mejor discriminación entre positivos y negativos. Se determinaron las variables adecuadas para la inmovilización de los antígenos en la fase sólida: estabilización y conservación de las superficies de inmunocaptura (Tijssen 1987).

Se determinaron las condiciones para el ensayo. Para cada antígeno se determinó el buffer de sensibilización a emplear, la dilución óptima de las muestras, concentración del conjugado y condiciones de cada una de las etapas del ensayo.

El antígeno se inmovilizó por adsorción en la placa de poliestireno de 96 pocillos, en una solución tamponada. Las muestras se diluyeron en una solución proteica y se incubaron a 37 °C, para que los anticuerpos presentes en la muestra reaccionen con los antígenos inmovilizados en la placa. La reacción antígeno anticuerpo se detectó con un

segundo anticuerpo marcado (anticuerpo de cabra anti-IgG canina, específico del fragmento Fc, conjugado con peroxidasa). El revelado se realizó por incubación con una solución comercial de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada, que son sustratos para que la enzima peroxidasa produzca un cambio de color de incoloro a azul. La reacción se detuvo agregando una solución de ácido sulfúrico 2 M, y el color azul viró al amarillo. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISAs a 450 y 630nm (Tijssen, 1987).

Con las condiciones determinadas se procesaron en cada placa por triplicado una mezcla de sueros clasificados como controles (pool control negativo) y una mezcla de sueros clasificados como casos confirmados (pool control positivo).

Los ELISAs se realizaron en el laboratorio de Leptospirosis de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL).

### 3.3.3. Interpretación de los Resultados.

Se procesó en cada ensayo por triplicado una mezcla de sueros provenientes de casos controles (llamado control negativo) y se obtuvo una densidad óptica media.

Las muestras incógnitas se procesaron por duplicado y a doble ciego y se obtuvo la densidad óptica promedio de cada una de ellas. Los resultados se expresaron como densidad óptica corregida (DOC), la cual se obtiene, para cada muestra, dividiendo la densidad óptica promedio de cada muestra por la densidad óptica media del control negativo. Las muestras se consideraron positivas cuando la densidad óptica corregida

resultó mayor que el valor o punto de corte (“*Cut off*”) y negativas cuando resultó menor o igual al punto de corte para cada ELISA en su evaluación.

#### **3.4. Test de Microaglutinación con antígenos vivos (MAT)**

Todos los sueros se analizaron por MAT, usando como antígeno cultivos frescos en medio EMJH líquido según la metodología descrita por Faine y la Sociedad Internacional de Leptospirosis (ILS) (Faine, 1982; WHO, 2003). Se utilizó una batería de cepas pertenecientes a 5 serovares según las recomendaciones de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVLD) para esta especie animal (AAVLD, 1994). Los antígenos empleados corresponden a los siguientes serogrupos (cepas de referencia entre paréntesis): Ballum (Castellón 3), Canicola (Hound Utrecht IV), Icterohaemorrhagiae (M20), Pomona (Pomona), Pyrogenes (Salinem).

Las muestras se consideraron positivas si presentaron un título en la MAT  $\geq$  1/200.

Para los estudios epidemiológicos se consideró como serogrupo presumiblemente infectante a aquel que se evidencia por el mayor título de anticuerpos frente a una cepa representativa de ese serogrupo. La coaglutinación es aquella que se presenta cuando existe aglutinación a iguales títulos en más de un serogrupo debida a la presencia de reacciones cruzadas heterólogas frente a otros serogrupos.

Esta técnica se realizó en el laboratorio de Leptospirosis del INER “Dr. E. Coni”

### 3.5. Aglutinación microscópica con Antígeno Termorresistente (TR).

El antígeno utilizado se obtuvo a partir de un cultivo de la cepa Hardjoprajitno (serovar Hardjo, serogrupo Sejroe) según la metodología descrita por Mailloux *et al.* (1974) y Mazzonelli *et al.* (1974).

Se mezcló el antígeno y el suero en iguales proporciones en un portaobjeto, y se realizaron suaves movimientos de rotación para facilitar la aglutinación, se esperaron 4 minutos y se observó la formación o no de una masa de aglutinación (Mailloux *et al.*, 1974; Mazzonelli *et al.*, 1974; WHO, 2003).

Esta técnica se evaluó en todos los sueros y se realizó en el laboratorio de leptospirosis del INER “Dr. E. Coni”

### 3.6. Evaluación de las Pruebas diagnósticas y Epidemiología.

#### 3.6.1. Sensibilidad y Especificidad.

La sensibilidad se calculó como la proporción de individuos enfermos de leptospirosis (Casos confirmados) positivos a las pruebas diagnósticas a evaluar. La especificidad se calculó como la proporción de individuos sin leptospirosis (Casos controles) que fueron negativos a las pruebas diagnósticas a evaluar.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{PV}}{\text{PV} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{NV}}{\text{NV} + \text{FP}} \times 100$$



(NV+FP)

Donde PV son positivos verdaderos, FP falsos positivos, NV negativos verdaderos y FN falsos negativos (Tarabla, 2000)

El índice de Youden se Calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$  (Szklo y Nieto, 2003).

### 3.6.2. Valores Predictivos Positivos (VPP) y Negativos (VPN).

Los VPP y VPN se calcularon de acuerdo a la base algebraica del Teorema de Bayes, introducido a la práctica médica por Connell y Koepsell (1985).

El VPP se calculó como:

$$\text{VPP} = \frac{\text{PR} \times \text{Sens}}{\text{PR} \times \text{Sens} + (1 - \text{PR}) \times (1 - \text{Esp})}$$

Por su parte el VPN fue calculado como:

$$\text{VPN} = \frac{(1 - \text{PR}) \times \text{Esp}}{(1 - \text{PR}) \times \text{Esp} + \text{PR} \times (1 - \text{Sens})}$$

Con los valores predictivos se hicieron las diferentes interpretaciones de los resultados de cada prueba diagnóstica.

### 3.6.3. Grado de Concordancia.

La concordancia fue determinada mediante el Kappa ( $\kappa$ ) (Tarabla, 2000), y el error aleatorio se cuantificó por el IC95%.

$$K = \frac{CO - CE}{$$

$$1 - CE$$

Donde

$$CO = [\text{Pr A (+) y B (+)}] + [\text{Pr A (-) y B (-)}]$$

$$CE = \frac{\text{Pr A (+) x B (+)} + \text{Pr A (-) x B (-)}}{n^2}$$

La concordancia Observada (CO) se calculó como la suma de la probabilidad de los resultados positivos y negativos a ambas pruebas. Para corregir el grado de acuerdo debido solamente al azar se calculó la concordancia esperada (CE) y la razón Kappa.

Una de las clasificaciones propuestas para la interpretación de un valor de  $\kappa$ , es la de Altman (1991) quien considera una relación “*Muy buena*” para un valor de  $\kappa$  entre 0.8 y 1.0, “*Buena*” un valor entre 0.6 y 0.8, “*Moderada*” entre 0.4 y 0.6, “*Aceptable*” entre 0.2 y 0.4, y “*Pobre*” entre 0 y 0.2 (Szklo and Nieto, 2003)

### 3.6.4. Evaluación de los ELISAs IgG desarrollados.

Los resultados de los ELISA se analizaron en relación los resultados de la MAT determinando según el criterio de definición de casos dos poblaciones de individuos enfermos o sanos, según son casos confirmados o controles. El análisis se realizó

mediante el trazado de la curva ROC la cual se determina, para variables cuantitativas continuas, la sensibilidad y la especificidad relativas de la prueba para los distintos valores de corte seleccionando el que confiere el mayor rendimiento. El punto o valor de corte se establece sistemáticamente sobre todo el rango de los valores observados, determinando sensibilidad y especificidad para cada uno de los k puntos operativos. Los resultantes k pares son graficados como curva ROC.

Se compararon las AUC obtenidas para cada ELISA evaluado, para conocer si existían diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las eficacias de ellos.

Se calculó la concordancia entre el ELISA y la MAT mediante el índice Kappa (k).

Para determinar el valor de corte, sensibilidad, especificidad, IC 95%, AUC y curva ROC de los diferentes ELISAs desarrollados se empleó el programa Medcalc® (Metz, 1978; Zweig and Campbell, 1993; Schoojans *et al.*, 1995). La concordancia  $\kappa$ , y los Valores Predictivos se determinaron empleando el programa EPIDAT 3.1.

#### 3.6.5. Evaluación del TR.

La variable obtenida como resultado de la lectura del TR es cualitativa (dicotómica). Para su evaluación fue necesario confeccionar una tabla 2x2. Se calcularon la sensibilidad, especificidad, IC 95%, índice de Youden, Valores Predictivos y Kappa empleando el programa estadístico EPIDAT 3.1.

### 3.6.6. Cálculo de factores de riesgo. Odd Ratio (OR).

El OR fue calculado solamente para la variable sexo, para lo cual se confeccionó una tabla 2x2 y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{OR} = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Se define a y c: son los grupos en que se divide la variable que presentan la enfermedad y b y d: son los mismos grupos pero sin la enfermedad.

Los cálculos se realizaron mediante el programa estadístico EPIDAT 3.1.

# RESULTADOS

---

# 4

## **CAPITULO 4. RESULTADOS**

### **4.1. Desarrollo de los Enzimoimmunoensayos (ELISAs) IgG**

#### 4.1.1. Selección de la superficie de Inmuncaptura y estabilidad de los pocillos sensibilizados.

Se realizaron ensayos utilizando dos marcas de placa de ELISA para determinar cual permitía una mejor discriminación entre positivos y negativos.

Se probaron placas Greiner y Costar y no se observó una diferencia significativa entre ellas ( $p > 0.05$ ). Debido a una mayor disponibilidad, se decidió utilizar las placas Greiner.

Las condiciones óptimas de conservación de los pocillos ya sensibilizados fueron entre 4 y 10°C y con baja humedad.

#### 4.1.2. Condiciones óptimas definidas para cada uno de los ELISAs desarrollados.

**A) ELISA Extractivo:** El antígeno extractivo fue inmovilizado por adsorción sobre policubetas de poliestireno utilizando una solución de PBS 0.1M y pH 7.2. Se incubaron 100ul por pocillo toda la noche a 4°C. Luego de la incubación las placas se lavaron 6 veces con buffer de lavado (PBS con 0.05% de Tween 20, pH 7.2). Las muestras se diluyeron 1/100 en buffer proteico (PBS con 1% caseína) y 100ul de esa dilución se agregó a la placa y se incubó por 30 min a 37°C. Luego de la incubación se lavó 6 veces con buffer de lavado. El conjugado (anticuerpo de conejo anti-IgG de perros, específico del fragmento Fc, conjugado con peroxidasa; Jackson

InmunoResearch) se diluyó 1/8000. La dilución del conjugado se realizó con una solución proteica y se incubaron 50ul por 30min a 37°C. Luego de la incubación se repitió el paso de lavado. El revelado de la reacción se realizó con 50ul de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) listo para usar, incubando 15 min a 37°C. La reacción se detuvo con 50ul de ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450/630nm en lector para microplacas de ELISA (RT-2100C, Kayto).

**B) ELISA con Péptidos sintéticos y Recombinante:** Los péptidos y el recombinante fueron adsorbidos sobre policubetas de poliestireno. La concentración empleada fue para los péptidos de 2ug/100ul y para el recombinante 1ug/100ml en solución carbonato/bicarbonato (pH 9.6). Se incubaron 100ul por pocillo de la solución toda la noche a 4°C. Luego de la incubación las placas se lavaron 6 veces con buffer de lavado (PBS con 0.05% de Tween 20, pH 7.2). Las muestras se diluyeron 1/100 en buffer proteico (PBS con 1% caseína) y 100ul de esa dilución se agregó a la placa y se incubó por 60min a 37°C. Luego de la incubación se lavó 6 veces con buffer de lavado. El conjugado (anticuerpo de conejo anti-IgG de perros, específico del fragmento Fc, conjugado con peroxidasa; Jackson InmunoResearch) se diluyó 1/3000 en una solución proteica y se incubaron 50ul de la dilución por 30min a 37°C. Luego de la incubación se repitió el paso de lavado. El revelado de la reacción se realizó con 50ul de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), listo para usar incubando 15 min a 37°C. La reacción se detuvo con 50ul de ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450/630nm en lector para microplacas de ELISA (RT-2100C, Kayto).

#### 4.2. Evaluación de los ELISAs desarrollados

Los valores de corte, sensibilidad, especificidad, área bajo la curva ROC y Valores Predictivos obtenidos para cada ELISA se muestran en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Valores de Corte, Sensibilidad, Especificidad, AUC y Valores Predictivos para los diferentes ELISAs desarrollados (casos confirmados n=85, controles n=202).

<b>ELISA con Antígeno</b>	<b>Valor de Corte</b>	<b>% Sens (IC 95%)</b>	<b>% Esp (IC95%)</b>	<b>AUC (IC95%)</b>	<b>%VPP (IC95%)</b>	<b>%VPN (IC95%)</b>
<b>Ext</b>	2.84	<b>76.5</b> (66.0-85.0)	<b>84.2</b> (78.4-88.9)	<b>0.868</b> (0.824-0.905)	67.1 (57.1-76.9)	89.5 (84.9-94.1)
<b>P1</b>	2.49	<b>71.8</b> (61.0-81.0)	<b>96.5</b> (93.0-98.6)	<b>0.902</b> (0.863-0.934)	89.6 (80.1-96.7)	89.1 (84.6-93.4)
<b>P2</b>	1.44	<b>74.1</b> (63.5-83.0)	<b>67.8</b> (60.9-74.2)	<b>0.749</b> (0.695-0.798)	49.2 (40.2-58.3)	86.2 (80.5- 91.8)
<b>Rec</b>	2.89	<b>56.5</b> (45.3-67.2)	<b>85.6</b> (80.0-90.2)	<b>0.776</b> (0.723-0.823)	62.3 (50.9-73.8)	82.4 (77.0-87.8)

En primer lugar se hizo una evaluación empleando por separado los controles del primer y segundo muestreo realizado en San Luis, con prevalencias del 19.7% y 6.6% respectivamente. Las AUC (ELISA-Ext 0.901, ELISA-P1 0.927, ELISA-P2 0.738 y ELISA-Rec 0.784) fueron superiores cuando se emplearon los controles del segundo muestreo. Sin embargo como los resultados obtenidos en ambos muestreos fueron similares, se decidió incluir los controles de los dos estudios, para que sea más



representativo por el mayor número de muestras y para reducir los Intervalos de Confianza.

Se muestran a continuación en las Figuras 6, 7, 8 y 9 las Curvas ROC obtenidas para cada uno de los ELISAs desarrollados.

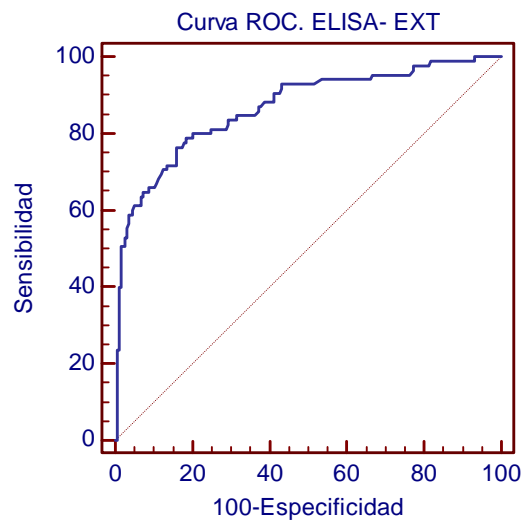


Figura 6: Curva ROC para el ELISA Extractivo.

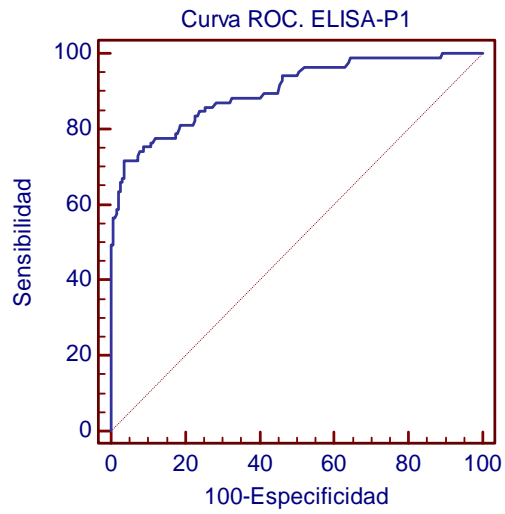


Figura 7: Curva ROC para el ELISA-P1.

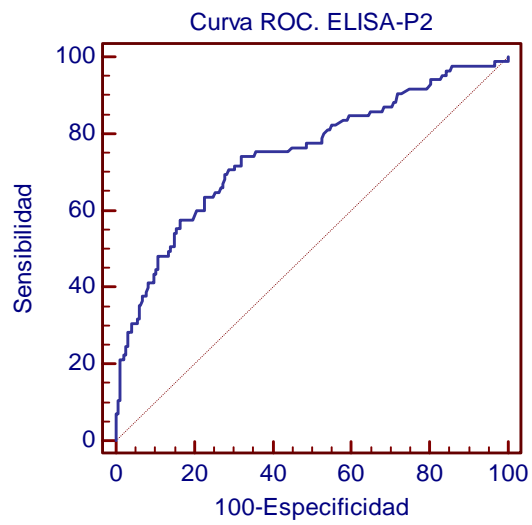


Figura 8: Curva ROC para el ELISA-P2.

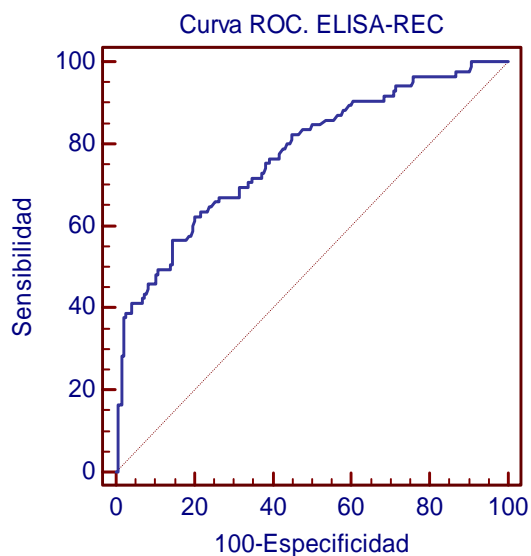


Figura 9: Curva ROC para el ELISA-Recombinante

En la figura 10 se muestran en forma comparativa las diferentes curvas ROC de los cuatro ELISA desarrollados. Los valores de “p” obtenidos al comparar las AUC de los diferentes ELISAs fueron: Ext-P1= 0.2002; Ext-P2=0.0001; Ext-REC= 0.0027; P1-P2<0.0001; P1-REC<0.0001; P2-REC=0.3537. Los ELISAs con antígeno Extractivo y P1 tuvieron un área bajo la curva ROC estadísticamente significativa mayor que los ELISAs P2 y REC.

Comparación de las Curvas ROC de los cuatro ELISAs

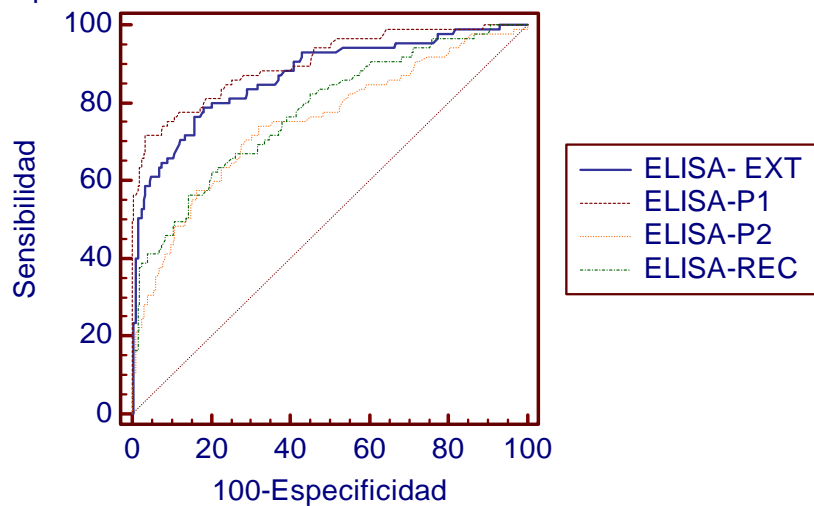


Figura 10: Comparación de las curvas ROC obtenidas para los diferentes ELISAs.

En las figuras N° 11, 12, 13 y 14 se presentan los diagramas de puntos de los diferentes ELISAs según el criterio definido de casos confirmados y controles.

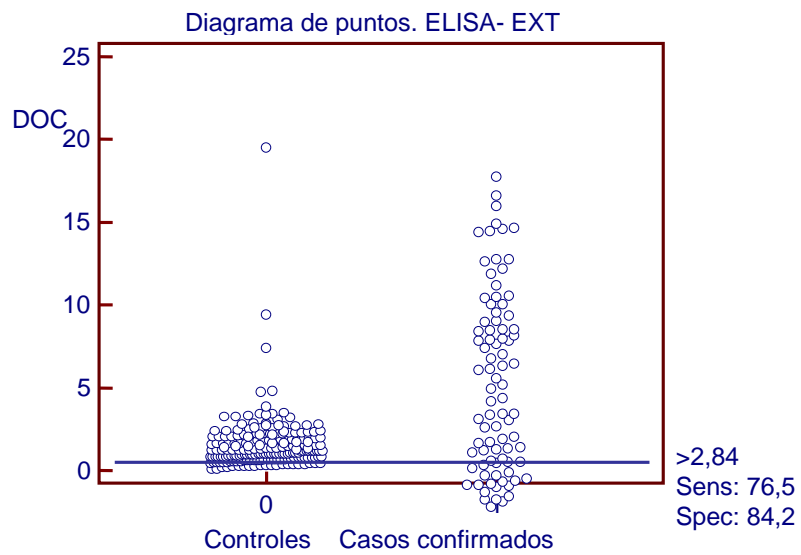


Figura 11: Diagrama de puntos del ELISA-Ext

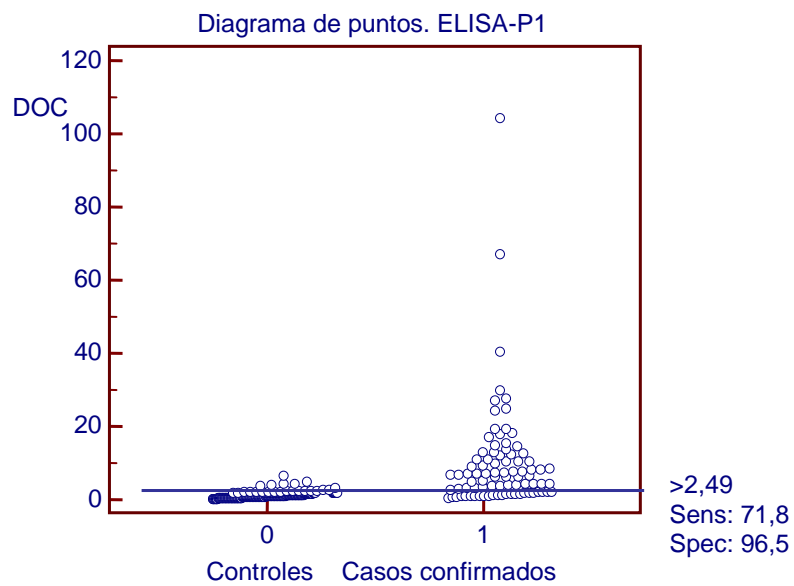


Figura 12: Diagrama de puntos del ELISA-P1

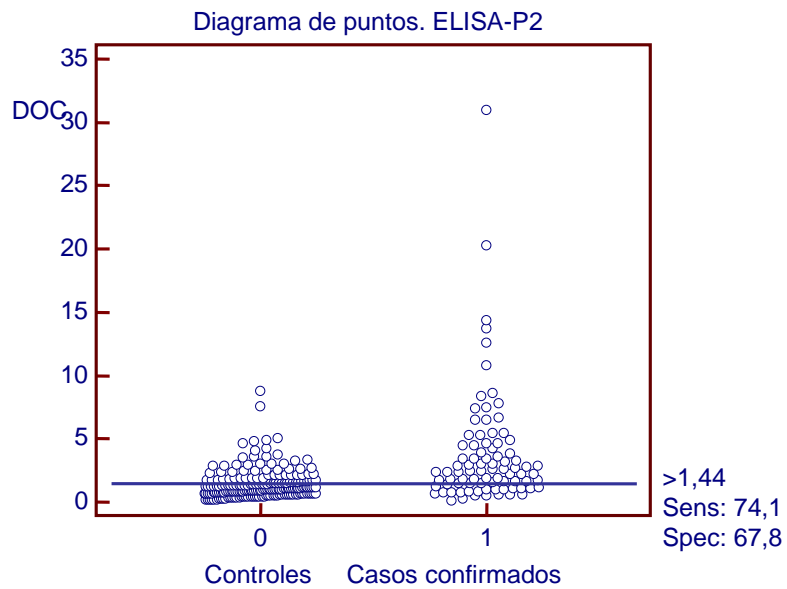


Figura 13: Diagrama de puntos del ELISA-P2

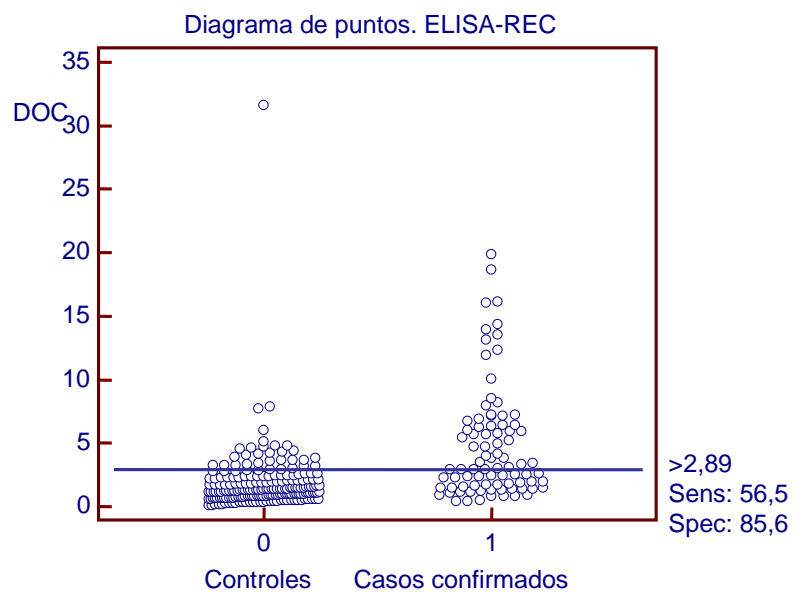


Figura 14: Diagrama de puntos del ELISA-Rec

#### 4.3. Evaluación del Test de Aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente (TR).

De las 287 muestras estudiadas mediante el TR, se obtuvo una sensibilidad del **70.59%** IC 95% (60.3-80.9) y especificidad del **76.73%** IC 95% (70.7-82.8). Los valores predictivos obtenidos fueron: VPP 56.1% (46.2-66.0) y VPN 86.1% (80.8-91.4).

El valor obtenido para el índice de Youden fue **0.47**.

#### 4.4. Comparación del TR y los métodos de ELISA desarrollados

La comparación del TR y los ELISAs frente a MAT se realizó mediante la prueba de concordancia Kappa. Los resultados se muestran en la tabla N°2.

Tabla N° 2. Comparación de valores de Kappa para el TR y los diferentes ELISAs, frente a la MAT

Método utilizado	Kappa (k) (IC 95%)
<b>ELISA-Ext</b>	0.5825 (0.4816-0.6833)
<b>ELISA-P1</b>	0.7171 (0.6264-0.8079)
<b>ELISA-P2</b>	0.3658 (0.2613-0.4703)
<b>ELISA-Rec</b>	0.4329 (0.3179-0.5479)
<b>TR</b>	0.4402 (0.3322-0.5482)

La concordancia frente a la MAT obtenida en el ELISA-P1 fue “Buena”, pero para el ELISA-Ext, Rec y el TR fue “Moderada”, y “Aceptable” en el ELISA-P2.

#### 4.5. Factores de riesgo.

El análisis de la positividad de la MAT según el sexo fue realizado en todos los caninos incluidos en el estudio ya sean casos confirmados o controles. Los resultados obtenidos figuran en la tabla N°3.

Tabla N°3. Sexo de los caninos estudiados y Positividad frente a la MAT  
(n=287).

<b>SEXO</b>	<b>N° de caninos</b>	<b>Caninos positivos a la MAT (%)</b>
MACHOS	103	47.6
HEMBRAS	181	18.2
Sin datos	3	-----

Se realizó el análisis de riesgo de la variable sexo, con la probabilidad de enfermar con leptospirosis. Para esta variable se observaron diferencias significativas en la positividad a la MAT entre machos y hembras ( $p < 0.0001$ ). El valor de Odd Ratio fue 4.07 (2.37-6.99) lo cual evidencia que los machos tienen mayor probabilidad de enfermar que las hembras.

#### 4.6. Descripción clínico-epidemiológica de los casos confirmados (n=85).

Para realizar el análisis se utilizaron los datos obtenidos de la Ficha epidemiológica de los 85 casos confirmados derivados para diagnóstico.



#### 4.6.1. Serovares más reaccionantes a la MAT.

En la Tabla N° 4 se detallan los serovares con mayores títulos reaccionantes y los presumiblemente infectantes.

Tabla N°4. Serovares más reaccionantes a la MAT (n=85).

<b>Serovar/serogrupo reaccionante</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae	25	29,41
Canicola/Canicola	22	25,88
Ballum/Castellonis	6	7.06
Pyrogenes/Pyrogenes	6	7.06
Pomona/Pomona	2	2.35
Coaglutinaciones	24	28.24

Las cepas más reaccionantes a la MAT en los sueros caninos fueron Icterohaemorrhagiae y Canicola (55.29% de los casos confirmados). Sin embargo se evidenció un 2.35 % de los casos dónde el serovar presuntamente infectante fue Pomona. Por otra parte en casi un tercio de los casos (28.2%) no se logró concluir el serogrupo presumiblemente infectante debido a las coaglutinaciones.

#### 4.6.2. Edad.

Los resultados de frecuencia de casos confirmados según la edad del canino se observan en la tabla N° 5. Para un mejor análisis la edad de los caninos se dividió en cuatro rangos

Tabla N°5. Frecuencia de edad entre los casos confirmados (n=85)

<b>EDAD</b>	<b>N° de caninos</b>	<b>(%) de Positividad</b>
< 1 año	10	11.8
1 a 5 años	24	28.2
5 a 10 años	28	32.9
>10 años	8	9.4
Sin datos	15	17.6

#### 4.6.3. Antecedentes de vacunación.

De los 85 casos estudiados, 48 (56.5%) no estaban vacunados y sólo 17 (20%) tenían antecedentes de vacunación. El dato de vacunación fue desconocido en 20 caninos.

#### 4.6.4. Signos clínicos

En la tabla N° 6 figuran los resultados obtenidos según las variables clínica analizada.

Tabla N°6. Presentación clínica de la enfermedad en los casos confirmados (n=85)

<b>Hallazgos clínicos</b>	<b>N° casos con la variable</b>	<b>%</b>	<b>Caninos sin datos</b>
Inyección conjuntival	36	42.4	25
Sind. renal	33	38.8	27
Fiebre	25	29.4	25
Ictericia	23	27.1	25
Vómitos	22	25.9	26
Diarrea	6	7.1	26

# DISCUSIÓN 5

---

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN

El cultivo de leptospiras a partir de una muestra de un individuo enfermo es el método definitivo más confiable para demostrar infección. Sin embargo, la dificultad de obtener aislamientos y la necesidad de obtener rápidos resultados, se oponen a la utilización de esta técnica para diagnóstico de rutina. Como resultado, el diagnóstico de la enfermedad se realiza generalmente mediante métodos serológicos. La MAT, es la técnica serológica utilizada ampliamente en todo el mundo. Sin embargo, esta técnica tiene muchas desventajas, lo que implica la necesidad de utilizar un test de diagnóstico alternativo. En muchos laboratorios para diagnóstico en humanos se utiliza como prueba tamiz el TR, sin embargo esta técnica tiene muchos resultados falsos positivos y negativos y además, en caninos está muy poco estudiada. Con el objetivo de encontrar una técnica de detección precoz y de fácil realización, en este estudio desarrollamos y evaluamos cuatro ELISAs con diferentes antígenos capaces de detectar anticuerpos caninos anti-leptospiras de tipo IgG.

Si bien lo ideal hubiese sido estudiar casos y controles de una misma población e incluir tanto todos los positivos como los negativos a la MAT (método de referencia) (WHO, 2003), debido a la baja sensibilidad de ésta, se decidió limitar la definición de casos empleada en este estudio. Como controles se emplearon sueros pertenecientes a caninos asintomáticos, sin antecedentes de vacunación y pertenecientes a una zona no endémica para la enfermedad; la utilización de estas muestras permite inferir que un suero MAT negativo pertenece realmente a un canino sano. Por otra parte, debido a que no todos los caninos enfermos, aún con clínica y nexo epidemiológico, pueden ser confirmados serológicamente, la definición de caso estuvo basada en un resultado positivo a la MAT no incluyéndose los casos sospechosos de leptospirosis que

resultaran negativos a esta técnica. En estudios posteriores, se podrían comparar los ELISAs desarrollados con otras técnicas de diagnóstico como el cultivo y la PCR aplicándolas en diferentes poblaciones caninas.

Existen observaciones realizadas por otros autores quienes describieron que utilizando antígenos sonicados en el ELISA era posible detectar anticuerpos género específicos de leptospiras (Adler *et al.*, 1980; Adler y Faine, 1983; Fairbrother, 1984; Bughio *et al.*, 1999). Esto explica la razón por la cual se utilizó como antígeno extractivo una cepa de *L. Sejroe/ Hardjo*. Estos anticuerpos género específicos son los primeros en aparecer en la respuesta inmune, lo que le aportarían a este método una mayor precocidad. Este hecho constituye una ventaja para el ELISA debido a que puede detectar mayor cantidad de casos en forma más temprana y ocasionados por serogrupos no empleados como antígeno en el panel de la MAT.

Los resultados de sensibilidad obtenidos en este estudio fueron para el ELISA-Ext 76.5%, ELISA-P1 71.8%, ELISA-P2 74.1% y ELISA-Rec 56.5%.

La mejor sensibilidad se obtuvo en el ELISA-Ext (76.5%), lo que podría deberse a que el uso de antígenos sonicados permite detectar anticuerpos para diferentes y mayor número de antígenos, no solo los de superficie como la LipL32, sino también los componentes inmunogénicos de la pared celular, la flagelina y el protoplasma. Si bien, las sensibilidades obtenidas para el ELISA-P1 y ELISA-P2 fueron inferiores a las del ELISA-Ext, sus valores no difieren demasiado. No obstante, las sensibilidades del ELISA-P1, ELISA-P2 y del ELISA-Rec deberían haber sido mayor, debido a que en estos ELISAs el antígeno se encuentra en altas concentraciones y son antígenos inmunodominantes que no poseen los motivos no específicos de las preparaciones con

extractos crudos celulares (Neves *et al.*, 2007). En los ELISA-P1 y P2 esta menor sensibilidad podría deberse a que los péptidos están ubicados en el extremo C-terminal de la LipL32, que a pesar de ser el dominio más inmunogénico de la lipoproteína, no siempre genera respuesta de tipo IgG (Hauk *et al.*, 2008; Vivian *et al.*, 2009).

La principal limitante en la evaluación de métodos para diagnóstico de leptospirosis, es la escasez de casos confirmados por cultivo. Debido a esto, los resultados hallados con nuevos métodos serológicos son comparados con la MAT. De esta manera una baja eficiencia de los ELISAs podría estar relacionada con la baja sensibilidad de la MAT (Adler *et al.*, 1980). La MAT sólo detecta anticuerpos aglutinantes, mientras que los ELISAs detectan aglutinantes y no aglutinantes (Adler *et al.*, 1980; Hartman *et al.*, 1984a; Ribotta *et al.*, 2000; Iwamoto *et al.*, 2009).

Existen pocos estudios de sensibilidad y especificidad donde se evalúa la MAT frente al cultivo (Bajani *et al.*, 2003). Uno de ellos fue realizado por Cumberland *et al.* (1999). En este trabajo se encontró una sensibilidad de la MAT de 30% y 63% en etapas agudas y 76% en la etapa convaleciente, considerando un caso confirmado aquel donde se logró el aislamiento de leptospiras. Otro estudio realizado por Limmathurotsakul *et al.* (2012), halló una sensibilidad de la MAT de 49.8%. Por lo tanto, una baja especificidad de los ELISAs comparada frente a la MAT como método de referencia, podría deberse más bien a una falta de sensibilidad de esta que a una inespecificidad del ELISA. Las especificidades halladas fueron para el ELISA-Ext 84.2%, ELISA-P1 96.5%, ELISA-P2 67.8% y ELISA-Rec 85.6%. Para el ELISA-P1, ELISA-P2 y el ELISA-Rec era esperable una alta especificidad porque utilizan una superficie de captura formada solamente por una alta concentración de moléculas que contienen epitopes altamente

conservados de leptospiras patógenas (Neves *et al.*, 2007), y sólo detectan anticuerpos anti-LipL32 (Vivian *et al.*, 2009). Según lo esperado, se obtuvo una alta especificidad del ELISA-P1 (96.5%) y buena especificidad del ELISA-Rec (85.6%), que fueron superiores a la obtenida en el ELISA-Ext (84.2%). Contrariamente a lo obtenido en estos ELISAs, el ELISA-P2 resultó con una baja especificidad (67.8%).

Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos en este estudio son menores a los descritos por otros autores. Ribotta *et al.* (2000) obtuvo una sensibilidad de 100% y especificidad de 95.6%, utilizando un antígeno estable al calor. Sin embargo de las 179 muestras estudiadas sólo 21 eran casos confirmados. Otro estudio con antígeno recombinante LipL32 obtuvo 96.9% y 97.08% de sensibilidad y especificidad, respectivamente en 137 muestras estudiadas, pero no se especificaron las condiciones clínicas de los caninos evaluados (Dey *et al.*, 2004).

Sin embargo, los resultados de esta tesis fueron muy superiores a los hallados por Iwamoto *et al.* (2009) quienes utilizaron el antígeno recombinante OmpL1 en 801 caninos con datos clínicos y de vacunación muy bien documentados, y obtuvieron una sensibilidad del 8.6%. Esta baja sensibilidad fue atribuida a la rápida disminución de la respuesta inmune frente al recombinante.

Si bien los resultados de este trabajo de tesis difieren de los mencionados anteriormente, son similares o incluso superiores a los hallados por La-Ard *et al.* (2011) (sensibilidad 84.5% y especificidad 77.0%), Palaniappan *et al.* (2004) (sensibilidad 76, 41 y 35%) o por Subathra *et al.* (2011) (sensibilidad 75.4% y especificidad 93.3%). Estos autores utilizaron antígenos recombinantes del gen Lig, de las regiones constantes y variables de LigA y LigB y de LipL41 respectivamente.



Los mejores valores de AUC obtenidos para los ELISAs Ext y P1 (0.868 y 0.902) fueron estadísticamente significativos comparados con las AUC de los ELISAs P2 y Rec. Esto sugiere que estos dos ELISAs podrían tener utilidad como complemento de la MAT, más aún en laboratorios de baja o mediana complejidad, dónde no es posible realizar la MAT. De esta manera se tendría un resultado de forma más temprana mientras se deriva la muestra para confirmar mediante MAT.

Del mismo modo en la evaluación de la concordancia de los ELISAs con la MAT, el ELISA-P1 ( $\kappa=0.7171$ ) fue el que obtuvo la mejor concordancia a diferencia del ELISA-Ext ( $\kappa= 0.5825$ ), el ELISA P2 ( $\kappa= 0.3658$ ) y el ELISA-Rec ( $\kappa=0.4329$ ). El resultado obtenido para el ELISA-Ext es menor al resultado publicado por Arias et al (1999) quienes evaluaron un ELISA con antígenos sonicados y obtuvieron una “*Muy buena*” concordancia ( $k=0.8$ ). Sin embargo las muestras estudiadas fueron sólo 29, muy pocas para validar un método diagnóstico. No obstante este fue el único estudio previo realizado en Argentina.

Existen evidencias que sugieren que la respuesta de anticuerpos en animales domésticos sigue un patrón clásico de respuesta de IgM e IgG (Morris and Hussaini, 1974; Adler *et al.*, 1980; Cousins *et al.*, 1985; Terpstra *et al.*, 1985; Geisen *et al.*, 2007). Si bien la IgM es más precoz que la IgG, la afinidad de la IgG por el antígeno es mayor. Debido a que la IgM es más precoz que la IgG, los resultados de sensibilidad y especificidad de los ELISAs IgG en etapas tempranas de la enfermedad deberían ser menores a los obtenidos en etapas tardías. No obstante existen estudios que demostraron que la respuesta inmune frente a los péptidos sintéticos es más rápida que la respuesta detectada por MAT (Aviat *et al.*, 2010), y que la cinética de la respuesta de la IgG para

los antígenos recombinantes es similar a la respuesta IgM contra preparaciones de antígenos de células enteras. En seres humanos, existen publicaciones que demuestran menores sensibilidades y especificidades en etapas tempranas utilizando ELISAs IgG tanto con antígenos recombinantes como extractivos (Flannery *et al.*, 2001; Vanasco *et al.*, 2007). En este trabajo de tesis no se pudieron distinguir las diferentes etapas de la enfermedad debido a la falta de información con respecto a los datos de fecha de inicio de síntomas. Estos datos son muy difíciles de obtener en animales.

En este estudio se evaluó el TR frente a la MAT y se obtuvo una sensibilidad de 70.59% y especificidad de 76.73%. Debido a que el TR se evalúa frente a la MAT, al igual que en los ELISAs, esta técnica puede estar afectada por las desventajas que presenta la MAT. No obstante la baja sensibilidad y especificidad halladas en este estudio concuerdan con las observaciones previas de falsos resultados negativos y positivos hallados por otros autores (Banfi *et al.*, 1984; Regalado Segui *et al.*, 1990; Levett, 2001a).

La sensibilidad del TR fue menor que la obtenida en el ELISA-Ext, ELISA-P1 y ELISA-P2. Esta menor sensibilidad podría deberse en parte a que el TR sólo detecta antígenos de superficie a diferencia del ELISA-Ext que detecta otros anticuerpos además de los de superficie, o de los ELISAs P1, P2 y Rec donde la concentración antigénica utilizada es muy alta.

Los valores predictivos se calcularon en una población de una prevalencia del 29.6% (Casos confirmados n=85 y casos controles n=202). Esta prevalencia es similar a la prevalencia obtenida en muestras derivadas para diagnóstico al Laboratorio de Referencia Nacional de Leptospirosis. El VPN obtenido en todos los métodos fue

superior al 80%. No obstante si esperamos usar estos métodos como tamiz, los VPP hallados fueron bajos. El VPP del TR (56.1%) y del ELISA-P2 (49.2%) fueron los más bajos de todos los métodos evaluados, pero el VPP del ELISA-P1 (89.6%) fue el mejor.

Si comparamos la concordancia del TR con la MAT, ésta fue “moderada” ( $\kappa=0.44$ ), similar a la obtenida para los ELISAs P2 y Rec.

La dificultad en la interpretación de los resultados fue otra de las limitantes de este método, ya que requiere sueros límpidos, bien conservados y recientes. Una buena observación permitiría obtener un resultado más confiable.

El índice de Youden es un indicador que combina la sensibilidad y especificidad de una prueba y su ventaja es que no está afectado por la prevalencia de la enfermedad. El desempeño obtenido del TR en este estudio no fue bueno ( $J=0.47$ ).

Existen muy pocos estudios previos de evaluación de este método en caninos, y los valores obtenidos en esta tesis son inferiores a los hallados por Lilenbaum *et al.* (2002) (sensibilidad 94.3% y especificidad 91.7%). En el trabajo citado, los casos controles sólo representaron el 9.4% de la población estudiada y provenían de caninos con sospecha de leptospirosis.

Esta técnica también fue evaluada en cerdos, por Weber *et al.* (1984) quienes obtuvieron una especificidad de 76.4% coincidente con la obtenida en esta tesis. Sin embargo, la sensibilidad fue mayor (92.3%).

Los resultados de esta tesis también son similares a los resultados obtenidos en muestras Humanas por Vanasco *et al.*, (2010, 2012) (sensibilidad 83.5% y especificidad 71.8%) y Sulzer *et al.* (1975) (sensibilidad 69% y especificidad 83%). No obstante, los

resultados se diferencian de las elevadas sensibilidades 97,7% e incluso 99,0% hallados por Seijo y Mazzonelli (1993), y Brandao *et al.* (1998) respectivamente.

Estos resultados sugieren que el TR no podría ser utilizado como prueba tamiz, por lo cual debería seleccionarse un método con un mejor desempeño en la detección precoz de los casos.

En el análisis del sexo como factor de riesgo, tanto en casos confirmados como en controles, se observaron diferencias significativas en la positividad a la MAT entre machos y hembras. Estos resultados predicen una mayor asociación entre la probabilidad de enfermar de leptospirosis y los caninos machos (OR=4.07). Estos datos coinciden con los registrados por la mayoría de los autores (Rubel *et al.*, 1997; Rossetti *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2002; Adesiyun *et al.*, 2006). El mayor índice de positivos entre los machos se atribuye a sus costumbres de comportamiento como hábitos de olfateo y lamido de las secreciones de sus congéneres (Rossetti *et al.*, 1999).

En el análisis de la reactividad a la MAT de los casos confirmados, se encontró una mayor reactividad (29.41% y 25.88%) correspondiente a los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Canicola respectivamente. La presencia de serología positiva al serogrupo Icterohaemorrhagiae podría estar indicando un alto grado de cohabitación entre caninos y ratas (*Rattus rattus*), por ser esta especie el portador natural de este serogrupo (Rossetti *et al.*, 2001). Los serogrupos Ballun (7.06%), Pyrogenes (7.06%) y Pomona (2.35%) evidenciaron menor reactividad. La reactividad encontrada en Pomona, podría sugerir que estos caninos conviven o tienen contacto con cerdos o bovinos, portadores naturales de este serogrupo. Lo mencionado anteriormente es coincidente con un estudio realizado por Vanasco *et al.* (2004), quienes detectaron un

brote en humanos causado por Pomona en un Tambo de Entre Ríos, generado a partir de cerdos y bovinos infectados por este serovar.

Los resultados obtenidos de reactividad a la MAT concuerdan con los obtenidos por otros autores (AAVLD, 1994; Rossetti *et al.*, 1999; Rossetti *et al.*, 2001; Silva and Riedemann, 2007; Cramer *et al.*, 2008), pero se diferencian de otros estudios que demuestran que la prevalencia de leptospirosis causadas por los serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae ha disminuido, debido al uso de vacunas que contienen estos serovares (Adesiyun *et al.*, 2006; Geisen *et al.*, 2007).

En el 28.24% de las muestras no se logró concluir el serogrupo presumiblemente infectante debido a las coaglutinaciones. Estas coaglutinaciones indican reacciones cruzadas por la presencia de antígenos de membrana comunes entre los diferentes serovares y serogrupos, o por anticuerpos que persisten de contactos infecciosos previos con diferentes leptospiras, que pueden generar reacciones paradójicas que hacen difícil la interpretación de la MAT, siendo necesario el aislamiento de las leptospiras en cultivo y la tipificación para establecer el serovar infectante (Romero *et al.*, 2010).

Analizando los datos epidemiológicos de los casos confirmados obtenidos de la ficha clínico-epidemiológica se observó que el mayor número de caninos tenían entre 1 a 10 años de edad. Estos resultados no coinciden con lo publicado por Rossetti *et al.* (2001) quienes atribuyen un porcentaje mayor de reactividad a caninos adultos, debido a una mayor probabilidad de contagio por un mayor tiempo de vida (Rossetti *et al.*, 1999). La diferencia registrada en esta tesis podría deberse a que el mayor número de muestras estudiadas está comprendida entre 1 a 10 años de edad (52 muestras para 1-10 años vs 8

muestras >10 años). Sin embargo según Alton *et al.* (2009) la edad no parece ser un riesgo de infección de leptospirosis.

Cuando se analizó el antecedente de vacunación en los casos confirmados se observó que el 56.6% no presentaba vacunaciones previas, y que el 20% de los casos confirmados tenían antecedentes de vacunación. La ocurrencia de leptospirosis entre los caninos vacunados podría deberse a la corta duración de la protección causada por la vacuna (6 meses a 1 año), o debido a que los serovares incluidos en la vacuna no protegen frente a la infección con otro serovar, o al uso de vacunas no efectivas por mala conservación de las mismas (Adesiyun *et al.*, 2006). En los casos estudiados no se conoce la fecha de la última vacunación.

Las manifestaciones clínicas como Inyección conjuntival y síndrome renal fueron las que estuvieron presentes con mayor frecuencia en los casos confirmados, seguidas por fiebre, vómitos e Ictericia. Era esperable que la fiebre se presentara en una mayor cantidad de casos (Bolin, 1996). La Diarrea fue la presentación clínica menos observada. Estos resultados están relacionados a los serogrupos que tuvieron mayor reactividad. Los síntomas más comunes asociados a estos serogrupos son: enfermedad renal y gastroenteritis para *Canicola* y enfermedad hepática y síndrome Hemorrágico para *Icterohaemorrhagiae*. No obstante estos resultados podrían estar sesgados debido a la dificultad de obtener la información clínica en los animales.

# CONCLUSIONES 6

---

## CAPITULO 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, se puede arribar a las siguientes conclusiones:

- Este estudio permitió desarrollar y evaluar nuevos métodos que permitirían realizar un diagnóstico de leptospirosis canina más precoz y eficiente que los métodos disponibles. Por primera vez en el país se desarrollaron y evaluaron cuatro ELISAs de tipo IgG utilizando diferentes antígenos: extractivos, péptidos sintéticos y antígenos recombinantes para diagnóstico de leptospirosis canina.

- Los ELISAs con antígeno extractivo y Péptido sintético 1 permitieron detectar mayor cantidad de casos confirmados que los ELISAs con antígeno P2 y Rec. Los valores de AUC (0.868 y 0.902) fueron significativamente mayores en estos ELISAs que en P2 y REC. Además la concordancia con la MAT en los ELISAs-Ext y P1 fue mejor que en los otros dos ELISAs. La mayor sensibilidad fue obtenida por el ELISA-Ext y la mayor especificidad por el ELISA-P1. Estos hallazgos permitirían concluir que en el caso de elegir un antígeno para un ELISA para el diagnóstico de Leptospirosis canina en Argentina, los de elección serían el Extractivo y P1, solos o combinados en un mismo ELISA, que podrían ser utilizados como una prueba complementaria a la MAT. Estos métodos podrían detectar mayor número de casos en forma más precoz en laboratorios de baja y mediana complejidad para luego derivar las muestras a un laboratorio especializado que confirme la leptospirosis mediante MAT.

- El TR tuvo una baja sensibilidad (70.6%) y especificidad (76.7%). El ELISA-Ext y el ELISA-P1 mostraron una mayor sensibilidad y especificidad que el TR. Así mismo el VPP hallado en el TR fue menor al obtenido en el ELISA-Ext y el ELISA-P1.



Estos resultados nos indicarían que no sería conveniente el uso del TR como única prueba tamiz, y la necesidad de la incorporación de otras técnicas, que detecten mayor cantidad de casos y sean de fácil realización en laboratorios donde la MAT, debido a su complejidad, no puede ser utilizada.

- Los machos tienen mayor probabilidad de enfermar de leptospirosis, estos resultados coinciden con estudios previos.

- En la descripción de las características clínico-epidemiológicas y de los serovares más reaccionantes a MAT de los casos confirmados se concluyó que: los serogrupos presumiblemente infectantes más frecuentes fueron Icterohaemorrhagiae y Canicola, que el 20% de los casos tenían antecedentes de vacunación y que los signos clínicos más frecuentes fueron la Inyección Conjuntival y Síndrome renal seguidos por Fiebre, Ictericia y vómitos. Estos resultados se relacionados con los signos clínicos que se presentan cuando los serogrupos infectantes son Icterohaemorrhagiae y Canicola. Estos hallazgos son útiles como antecedentes y aportan al conocimiento de la clínica y epidemiología de la leptospirosis en Argentina. Además contribuyen a la implementación de medidas de prevención y control adecuadas, como el desarrollo de actividades de promoción dirigidas a la población y a médicos veterinarios, al control integrado de roedores y a la vacunación de las especies susceptibles. Así como fortalecer el sistema de vigilancia y el aporte de nuevas técnicas para reducir el impacto de la leptospirosis en nuestro país.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

---

7

## **CAPITULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AAVLD. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. (1994). Manual de Leptospirosis. Comisión Científica Permanente sobre Leptospirosis, Buenos Aires. pp. 55.

AAVLD. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (2006). Informe sobre leptospirosis en República Argentina. Comisión Científica sobre Leptospirosis de la República Argentina. Fundación Mundo Sano. República Argentina. pp. 54.

ACHA, P. and SZYFRES, B. (2003). Parte I: Bacteriosis. Leptospirosis. En: Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes a hombres y animales. Vol I: Bacteriosis y Micosis. Pan. American. Health. org. p. 175-186.

ADAMUS, C. (1997). Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. J. Comp .Pathol. 117: 311-28.

ADESIYUN, A.; HULL-JACKSON, C.; MOOTOO, N.; HALSALL, S.; BENNET, R.; CLARKE, N.R.; WHITTINGTON, C.U. and SEEPERSADSINGH. (2006). Sero-epidemiology of canine leptospirosis in trinidad: Serovars, implications for vaccination and public health. J. Vet. Med. 53: 91-99.

ADIN, C.A. and COWGILL, L.D. (2000). Treatment and out come of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). J. Am. Vet. Med. Assoc. 216(3):371-375.

ADLER, B. and FAINE, S. (1978). The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. J. Med. Microbiol. 11: 387-400.

ADLER, B.; MURPHY, M. A.; LOCARNINI, S. A. and FAINE, S. (1980) Detection of Specific Anti-Leptospiral Immunoglobulins M and G in Human Serum by Solid-Phase Enzyme-Linked Immunosorbent. Assay. J. Clin. Microbiol. 11(5):452-457.

ADLER, B.; COUSINS, D.V.; FAINE, S. and ROBERTSON, G.M. (1982). Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar hardjo as measured by enzyme immunoassay. Vet. Microbiol. 7(6):577-585.

ADLER, B. and FAINE, S. (1983). Species- and Genus- Specific Antigens in leptospira, revealed by Monoclonal antibodies and Enzyme Immunoassay. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig: A 255,317-322.

ADLER, B. and DE LA PEÑA MOCTUZUMA, A. (2010). *Leptospira* and Leptospirosis. Vet. Microbiol. Jan 27;140(3-4):287-96.

ADLER, B.; MIRANDA, L.; SEEMANN, T. and MURRAY, G. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. Vet. Microbiol. 153: 73-81.

AEDO, S. M.; PAVLOV, S.D. and CLAVERO, F. CH. (2010). Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpretan? Rev. Obstet. Ginecol. 5 (1): 51-54.

AHMED, N.; DEVI, S.M; VALVERDE, M.; VIJAYACHARI, P.; MACHANGU, R; ELLIS, W. and HARTSKEERL, R. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann. Clin. microbiol .Antimicrob. 5:28.

AHMED, A.; GROBUSCH, M.P.; KLATSER, P.R. and HARTSKEERL, R.A. (2012). Molecular approacher in the detection and characterization of *Leptospira*. J. Bacteriol. Parasitol. 3(2):133.

ALTMAN, D. G. (1991). Statistics in medical journals: developments in the 1980s. STAT Med. 10:1897-1913.

ALTON, G.D.; BERKE, O.; REID-SMITH, R.; OJKIC, D. and PRESCOTT, J.F. (2009). Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998-2006. Can. J. Vet. Res. 73: 167-175.

ANDRÉ-FONTAINE, G. (2006). Canine leptospirosis- Do we have a problem? Vet. Microbiol. 117:19-24.

APPASSAKIJ, H.; SILPAPOJAKUL, K.; WANSIT, R. AND WOODTAYAKORN, J. (1995). Evaluation of the Immunofluorescent Antibody Test for the Diagnosis of Human Leptospirosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:340-343.

ARIAS, D.; STANCHI, N.; MARTINO, P.; GATTI, M.; ARAUZ, S.; STORNELLI, A. And RENNER, E. (1999). Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología por ensayo inmuno enzimático (ELISA) en leptospirosis canina. Rev. biomed. 10(3):167-171.

ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. (1989) Solid Phase peptide synthesis: A practical approach (The Practical Approach series). IRL. Oxford, UK. pp.203.

AVIAT, F.; ROCHEREAU-ROULET, S.; BRANGER, C.; ESTAVOYER, J.M.; CHATRENET,B.; ORSONNEAU, J.L.; THORIN, C. And ANDRE-FONTAINE, G.

(2010). Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 33: 375-387.

BAJANI, M. D.; ASHFORD, D. A.; BRAGG, S. L.; WOODS, C. W.; AYE, T.; SPIEGEL, R. A.; PLIKAYTIS, B. A.; PERKINS, M. P.; LEVETT, P. N.; ROBBIN S.; WEYANT, R. W. (2003) Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 41(2):803-809.I

BAL, A.E.; GRAVEKAMP, C.; HARSTKEERL, R.A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H. and TERPSTRA, W.J. (1994). Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1894-1898.

BANFI, E.; CINCO, M.; DELIA, S.; CASTAGNARI, L.; VULLO, V.; MASTRIANNI, C. M. and CONTINI, C. (1984). New trends in the Rapid Serodiagnosis of Leptospirosis. *Zbl. Bakt. Hyg.* 257: 503-507.

BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A. and WAGAR, E. A. (1999). Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.* 67: 853-61.

BARR, S.C.; MCDONOUGH, P.L.; SCIPIONI-BALL, R.L. and STARR, J.K. (2005). Serologic responses of dogs given a comercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am. J. Vet. Res.* 66(10):1780-4.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO,

E.; VINETZ, J. M. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet. Infect. Dis.* 3:757-771.

BOLIN, C.A. (1996). Diagnosis of Leptospirosis: A Reemerging disease of companion animals. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim)*. 11(3): 166-171.

BRANDAO, A.; CAMARGO, E.; DA SILVA, E.; SILVA, M. and ABRAO, R. (1998). Macroscopic Agglutination Test for rapid diagnosis of human Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 36(11): 3138-3142.

BRENNER, D.J.; KAUFMANN, A.F.; SULZER, K.R.; STEIGERWALT, A.G.; ROGERS, F.C. and WEYANT, R.S. (1999) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. Nov. And four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 839-858.

BOMFIM, M.R.Q.; KO, A. and KOURY, M.C. (2005). Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine Leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 109:89-94.

BOURHY, P.; BREMONT, S.; ZININI, F.; GIRY, C. and PICARDEAU, M. (2011). Comparison of Real-Time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira spp* in Blood and identification of variations in target sequences. *J. Clin. Microbiol.* 49(6), 2154-2160.

BROWN, P.D.; GRAVENKAMP, C.; CARRINGTON, D.G.; VAN DE KEMP, H.; HARTKEERL, R.A.; EDWARDS, C.N.; ET AL. (1995). Evaluation of the

polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis, J. Med. Microbil. 43: 110-114.

BROWN, C.A.; ROBERTS, A.W.; MILLER, M.A.; DAVIS D.A.; BROWN, S.A.; BOLIN, C.A.; JARECKI-BLACK, J.; GREENE, C.E. and MILLER-LIEBL, D. (1996). *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa infection in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 209(7):1265-7.

BROWN, P. D. and LEVETT, P. N. (1997). Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. J. Med. Microbiol. 46: 173-181.

BROWN, P.D.; CARRINGTON, D.G.; GRAVENKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; EDWARD, C.N.; JONES, S.R.; ET AL. (2003). Direct detection of leptospiral material in human post mortem samples. Res. Microbiol. 154: 581-586.

BUGHIO, N.I.; LIN, M., And. SURUJBALLI O.M .P. (1999). Use of recombinant flagellin protein as a tracer antigen in a fluorescence polarization assay for diagnosis of leptospirosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6(4):599-605.

CERQUEIRA, M. and PICARDEAU, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. Infect. Genet. Evol. 9:760-768.

CHAPMAN, A.J.; ADLER, B. and FINE, S. (1987). Genus-specific antigens in *Leptospira* revealed for immunoblotting. Zbl. Bakt. 264:179-283.



CHAPMAN, A.J.; EVERARD, C.O.R.; FAINE, S. and ADLER, B. (1991). Antigen recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. *Epidemiol. Infect.* 107, 143-155.

CONNELL F. A., KOEPESELL T.D. (1985) Measures of gain in certainty from a diagnostic test. *Am. J. Epidemiol.* 121(5):744-53.

COSTA OOTEMAN, M.; RAVARA VAGO, A. and COTA KOURY, M. (2006). Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human Leptospirosis. *J. Microbiol. Methods.* 65: 247-257.

COUSINS, D.V.; ROBERTSON, G.M. and HUSTAS, L. (1985). The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hardjo, Pomona and Tarassovi in cattle. *Vet. Microbiol.* 10(5):439-50.

CRAMER, A. N.; DE GENNARO, M.; MIÑO, K.; PEPINO, S.; RUIZ, M.; SCHMELING, M. F.; TOMATIS, F. M.; VANASCO, N. B. and WIDENHORN, N. I. (2008). Seroprevalencia de Leptospirosis en caninos expuestos a una inundación en Esperanza, Santa Fe, Argentina, 2007. XVII Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Santa fe. Argentina. 28 de octubre de 2008. Póster. Abstract. p12.

CULLEN, P.A.; CORDWELL, S.J.; BULACH, D.M.; HAAKE, D.A. and ADLER, B. (2002). Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.* 70, 2311-2318.

CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.A. and ADLER, B. (2005). Surfaceome of *Leptospira spp.* Infect. Immun. 73, 4853-4863.

CUMBERLAND, P. C.; EVERARD, C. O. R. and LEVETT, P. N. (1999). Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis (MAT). Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(5):731-4.

DEY, S.; MOHAN, C.M.; SENTHIL KUMAR, T.M.A.; RAMADASS, P. NAINAR, A.M. and NACHIMUTHU, K. (2004). Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. Vet. Microbiol. 103: 99-106.

DEY, S.; MADHAN MOHAN, C.; RAMADASS, P. and NACHIMUTHU, K. (2007). Recombinant Antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of Leptospirosis. Vet. Res. Commun. 31:9-15.

EFFLER, P. V.; BOGARD, A. K.; DOMEN, H. Y.; KATZ, A. R.; HIGA, H. Y.; SASAKI, D. M. (2002). Evaluation of eight rapid screening tests for acute Leptospirosis in Hawaii. J. Clin. Microbiol. 40(4):1464-1469.

EVANGELISTA, K.V. and COBURN, J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiol. 5(9): 1413-1425.

FAINE, S. (1982). Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization. (WHO offset publication 67).

FAIRBROTHER, J.M. (1984). Serological Interrelationship of *Leptospira* Serovar and Genus-Specific Antigens by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 20(6): 1089-1093.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E.; FERREIRA, A.; RILEY, L.; REIS, M.; HAAKE, D. and KO, A. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Serodiagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 39(9): 3303-3310.

GEISEN, V.; STENGEL, C.; BREM, S.; MÜLLER, W.; GREENE, C. and HARTMANN, K. (2007). Canine leptospirosis infections clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J. Small Anim. Pract.* 48: 324-328.

GOLDSTEIN, R.E. (2010). Canine leptospirosis. *Vet. Clin. Small. Anim.* 40:1091-1101.

GORIS, M.G.; LEEFLANG, M.M.; BOER, K.R.; GOEIJENBIER, M.; VAN GORP, E.C; WAGENAAR, J.F.P. and HARTSKEERL, R.A.(2012). Establishment of valid laboratory case definition for human Leptospirosis. *J. Bacteriol. Parasitol.* 3(2):132.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEM, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G.J.; VAN EYS, G.; EVERARD, C and TERPSTRA, W.J. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two set of primers. *J. Gen. microbiol.* 139: 1691-1700.

GREENLEE, J.J.; ALT, D.P.; BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L. and ANDREASEN, C.B. (2005). Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. *Am. J. Vet. Res.* 66(10):1816-22.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J. and GALVAO REIS, M. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect. Immun.* 69:4958-68.

HAAKE, D.A. (2000 a). Spirochactal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol.* 146:1491-1504.

HAAKE, D.A.; CHAO, G.; ZUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNET, D.; MAZEL, M. et al. (2000 b). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68, 2276-2285.

HAAKE, D.A. and MATSUNAGA, J. (2002). Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect. Immun.* 70(9): 4936-1504.

HAAKE, D.A.; SUCHARD, M.A.; KELLEY, M.M.; DUNDOO, M.; ALT, D.P. and ZUERNER, R.L. (2004). Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane protein involves horizontal DNA transfer. *J. Bacteriol.* 186(9):2818-28.

HAAKE, D.A. and MATSUNAGA, J. (2010). *Leptospira*: A Spirochete with a hybrid outer membrane. *Mol. Microbiol.* 77 (4): 805–814.

HARTMAN, E. G.; VAN HOUTEN, M.; FRIK, J. H. and VAN DER DONK, J. A. (1984a). Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM and IgG- specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 7: 245-54.

HARTMAN, E. G.; VAN HOUTEN, M.; VAN DER DONK, J. A. and FRIK, J. H. (1984b). Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase Enzyme-linked Immunosorbent assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 7: 33-42.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.DE; BARBOSA, A.S. and HO, P.L. (2008). In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect. Immun.* 76(6): 2642-2650.

HAUK, P.; GUZZO, C.R.; ROMAN RAMOS, H.; HO, P.L. and FARH, C.S. (2009). Structure and calcium-binding activity of the LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. *J. Mol. Biol.* 390(4): 722-36.

HERNANDEZ, M. (2005). *Leptospirosis. Canis et Felis* 76.

IWAMOTO, E. ; WADA, Y. ; FUJISAKI, Y. ; UMEKI, S. ; JONES, M. ; MIZUNO, T. ; ITAMOTO, K. ; MAEDA, K. ; IWATA, H. and OKUDA, M. (2009). Nationwide Survey of *Leptospira* antibodies in Dogs in Japan: Results from Microscopic Agglutination test and Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *J. Vet. Med. Sci.* 71(9): 1191-1199.

JOHSON, R.C. and HARRIS, V.G. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 94(1): 27-31.

KLAASEN, H.L.; MOLKENBOER, M.J.; VRIJENHOEK, M.P. and KAASHOEK, M.J. (2003). Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* 29;95(1-2):121-32.

KLOPFLEISCH, R.; KOHN, B.; PLOG, S.; WEINGART, C.; NÖCKLER, K.; MAYER-SCHOLL, A. and GRUBER, A.D. (2010). An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? *Vet. Med. Int.* 27.

LA-ARD, A.; AMAVISIT, P.; SUKPUARAM, T. and WAJJWALKU, W. (2011). Evaluation of recombinant Lig antigen-based ELISA for detection of leptospiral antibodies in canine sera. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 42 (1):128-37.

LANGSTON, C. E. and HEUTER, K. J. (2003). Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet. Clin. Small. Anim.* 33: 791–807.

LEVETT, P. N. (2001a). Leptospirosis. *Clin. Microbiol.* 14: 296-326.

LEVETT, P.N.; BRANCH, S.L.; WHITTINGTON, C.U.; EDWARDS, C.N. and PAXTON, H. (2001b). Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(2): 349-351.

LEVETT, P. N. and BRANCH, S. L. (2002). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(6):745–8.

LEVETT, P.N. (2004). Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clin. Appl. Immunol. Rev. 4: 435-448.

LEVETT, P.N. (2007). Sequence-Based Typing of *Leptospira*: Epidemiology in the Genomic era. PLoS. Negl. Trop. Dis. 7;1(2).

LILENBAUM, W.; RISTOW, P.; ALMEIDA FRAGUAS, S. and DOMINGO DA SILVA, E. (2002). Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis. Rev. Latinoam. Microbiol. 44: 124-128.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; TURNER, E.L.; WUTHIEKANUN, V.; THAIPADUNGPANIT, J.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L.D.; DAY, N.; COOPER, B and PEACOCK, S.J. (2012). Fool's Gold: Why imperfect reference test are undermining the evaluation of novel diagnostic: A reevaluation of 5 diagnostic test for leptospirosis. Clin. Infec. Dis. 55(3):322-331.

LIN, M.; SURUJBALLI, O. M.; NIELSEN, K.; NADIN-DAVIS, S. and RANDALL, G. (1997). Identification of a 35-kilodalton Serovar-Cross-Reactive Flagellar protein, FlaB, from *Leptospira interrogans* by N-Terminal sequencing, gene Cloning, and sequence analysis. Infect. Immun. 65(10): 4355-4359.

LOTTERSBERGER, J.; GERRERO, S.; TOARELLI, G.; FRANK, R.; TARABLA, H. and VANASCO, N. B. (2009). Epitope Mapping of pathogenic leptospira LipL32. Lett. Appl. Microbiol. 49, 641-645.

LUPIDI, R.; CINCO, M.; BALANZIN, D.; DELPRETE, E. and VERALDO, P. (1991). Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 29: 805-809.

MACIEL, E.A.; CARVALHO, A.L.F. DE; NASCIMENTO, S.F.; DE MATOS, R.B.; GOUVEIA, E.L.; REIS, M.G. and KO, A.I. (2008). Household Transmission of *Leptospira* Infection in Urban Slum Communities. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2(1):e154.

MAILLOUX, M.; MAZZONELLI, J. and DORTA DE MAZZONELLI. (1974). Thermoresistant Antigen in Leptospire Possibility of a Macroscopic Diagnosis of Leptospirosis with a Single Antigen. Zb. Bakt. Hyg, I AbtOrig A 229, 238-241.

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G. and PICARDEAU, M. (2005). Identification of variable-Number Tandem-Repeat loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. J. Clin. Microbiol. 43(2): 539-545.

MARSHAL, R. B.; WILTON, B. E. and ROBINSON, A. J. (1981). Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. J. Med. Microbiol. 14:163-166.

MAZZONELLI, J.; MAZZONELLI, G. D. and MAILLOUX, M. (1974). Antigene thermoresistant chez les leptospire. Ann. Microbiol. (Paris). Jan; 125 A (1): 125-6.

MC BRIDE, A.; PEREIRA, F.; DA SILVA, E.; MATOS, R.; DA SILVA, E.; FERREIRA, A.; REIS, M. and KO, A. (2007). Evaluation of the EIE-IgM-leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. Acta Trop. 102: 206-211.

MERIEN, F.; AMOURIAUZ, P.; PÉROLAT, P.; BARANTON, G. and SAINT GIRONS, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *leptospira* spp. In clinical samples. J. Clin. Microbiol. 30:2219-24.



MERIEN, F.; BARANTON, G. and PÉROLAT, P. (1995): Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 172: 281-285.

METZ, C.E. (1978). Basic principles of ROC analysis. *Semin. Nucl. Med.* 8:283–298.

MICHNA, S. W. (1970). Leptospirosis. *Vet Rec.* 86:484-496.

MIDWINTER, A.; VINH, T.; FAINE, S. and ADLER, B. (1994). Characterization of an antigen oligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar Pomona and its role in immunity. *Infect. Immun.* 62(12):5477-82.

MILNER, A.R.; JACKSON, K.B.; WOODRUFF, K. and SMART, I.J. (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Clin. Microbiol.* 22(4):539-42.

MINKE, J.M.; BEY, R.; TRONEL, J.P.; LATOUR, S.; COLOMBET, G.; YVOREL, J; CARIOU, C.; GUIOT, A.L.; COZETTE, V. and GUIGAL, P.M. (2009). Onset and Duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet. Microbiol.* 137: 137-145.

MONAHAN, A.M.; CALLANAN, J.J. and NALLY, J.E. (2009). Review paper: Host-Pathogen Interactions in the kidney during chronic Leptospirosis. *Vet. Pathol.* 46: 792-799.

MOREY, R.; GALLOWAY, R.; BRAGG, S.; STEIGERWALT, A.; MAYER, L. and LEVETT, P. (2006). Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene Sequencing. *J.Clin.Microbiol.* 44(10): 3510-3516.

MORRIS, J.A. and HUSSAINI, s.n. (1974). Characterization of the antibodies detected by the microscopic agglutination test for bovines leptospirosis. *J. Hyg. Camb.* 73:425-432.

MURRAY, G.L.; SRIKRAN, A.; HOKE, D.; WUNDER, E.A.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R.W.; KO, A.I. and ADLER, B. (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospirainterrogans*. *Infect. Immun.* 77(3): 952-958.

NEVES, F. O.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C. and NASCIMENTO, A. L. (2007). Identification of a novel potential antigen for early phase serodiagnosis of Leptospirosis. *Arch. Microbiol.* 188(5):523-532.

PALANIAPPAN, R.; CHANG, Y; HASSAN, F.; MCDONOUGH, S.; POUGH, M.; BARR, S.; SIMPSON, K.; MOHAMMED, H.; SHIN, S.; MCDONOUGH, P.; ZUERNER, R.; QU, J and ROE, B. (2004). Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J. Med. Microbiol.* 53: 975-984.

PEREIRA DA SILVA, J.J.; OLIVER DALSTON, M.O.; MANHAES DE CARVALHO, J.E.; SETUBAL, S.; CHIARINO DE OLIVEIRA, J.M. and PEREIRA,

M.M. (2002). Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35(4): 395-399.

PEROLAT, P.; GRIMONT, F.; REGNAULT, B.; GRIMONT, P. A.; FOURNIÉ, E.; THEVENET, H. and BARANTON, G. (1990). rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. *Res. Microbiol.* 141(2):159-71.

PLANK, R. and DEAN, D. (2000) Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes. infec.* 2: 1265-1276.

PRESCOTT, J. F.; FERRIER, R. L.; NICHOLSON, V. M.; JOHNSTON, K. M. and HOFF, B. (1991). Is canine leptospirosis under diagnosed in southern Ontario? A case reported and serological survey. *Can. Vet. J.* 32:481-6.

RALPH, D.; MCCLELLAND, M.; WELSH, J.; BARANTON, G. and PEROLAT, P. (1993). *Leptospira* species categorised by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR amplified rRNA genes. *J. Bacteriol* 175: 973-81.

RAMADASS, P.; JARVIS, B.D.W.; CORNER, R. J.; PENNY, D. and MARSHALL, R. B. (1992). Genetic characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by DNA Hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:215-219.

REGALADO SEGUI, J.D.; LOPEZ ACOSTA, C.; PEDROSO PEÑA, P. and RAMOS PEREZ, L.R. (1990). Serologic study of patients with leptospirosis using TR antigen. *Rev. Cubana Med. Trop.* 42: 208-18.

RIBOTTA, M.; HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. and LALLIER, R. (2000). Development of and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can. Vet. J.* 64: 32-37.

ROJAS, P.; MONAHAN, A.M.; SCHULLER, S.; MILLER, S.I.; MARKEY, B.K. and NALLY, J.E. (2010). Detection and quantification of leptospire in urine of dogs: a maintenance host for the zoonosis disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 1305-1309.

ROMERO, M.H.; SANCHEZ, J.A. and HAYEK, L.C. (2010). The prevalence of antibodies against *Leptospira* in urban human and canine populations from the Tolima Department. *Rev. Salud publica.* 12 (2): 268-275.

ROSSETTI, C. A.; ROMERO, G. N.; AUTERI, C. D. and SAMARTINO, L. E. (1999). Estudio serológico de leptospirosis en caninos de partidos del oeste del Gran Buenos Aires. *Rev. Med. Vet.* 80 (4) 298-305.

ROSSETTI, C. A.; ROMERO, G. N. and AUTERI, C. D. (2001). Relevamiento serológico de leptospirosis en caninos de la zona oeste del Gran Buenos Aires. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires, Suplemento Técnico Veterinario*, 6 (22) 59-62.

ROSSETTI, C. A.; LIEM, M; SAMARTINO, L. E. and HARTSKEERL, R. A. (2005). Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. *Vet. Microbiol.* 107: 241–248.

RUBEL, D.; SEIJO, A.; CERNIGOI, B.; VIALE, A. and WISNIVESKY-COLLI, C. (1997). *Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. *Rev. Panam. Salud Publica* 2(2): 102-106.

SALAÜN, L.; MERIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G. and PICARDEAU, M. (2006). Application of Multilocus Variable-Number tandem-Repeat Analysis for molecular typing of the agent of Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 44,11: 3954-3962.

SARAVANAN, R.; RAJENDRAN, P. and GARAJAN, S.P. (1999). Clinical, bacteriologic and histopathologic studies on induced leptospirosis in stray dog pups. *Indian J. Pathol. Microbiol.*42(4):463-9.

SCHOOJANS, F. A.; ZALATA, C. E.; DEPUYDT, F. H. and COMHAIRE. (1995). Med-Calc: a new computer program for medical statistics. *Comput. Methods Programs Biomed.* 48:257-262.

SCHREIBER, P.; MARTIN, V.; NAJBAR, W.; SANQUER, A.; GUEGUEN, S. and LEBREUX, B. (2005). Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by leptospira vaccination. *Vet. Microbiol.* 108: 113-118.

SEHGAL, S.C.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S. and SUGUNAN, A.P. (1999). LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93(2):161-4.

SEIJO, A. and MAZZONELLI, J. (1993). Evaluación del antígeno termorresistente en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Acta Bioq. Clinica latinoamericana.* Vol XXVII. 4: 487-491.

SILVA, R.F. and RIEDEMANN, S. (2007). Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. Arch. Med. Vet. 39(3): 269-274.

SMITS, H.L.; ANAYINA, Y.; CHERESHKY, A.; DANCEL, L.; LAI-A-FAT, R.; CHEE, H.; LEVETT, P.N.; MASUZAWA, T.; ANAGIHARA, Y.; *et al.* (1999). International multicenter evaluation of the clinical utility of a Dipstick Assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. J. Clin. Microbiol. 37(9): 2904-2909.

SMYTHE, L.D.; SMITH, I.L., SMITH, G.A.; DOHNT, M.F.; SYMONDS, M.L.; BARNETT, L.J. and MCKAY, D.B. (2002). A quantitative PCR (Taqman) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect. Dis. 2:13.

SUBATHRA, M.; SENTHILKUMAR, T.M.A.; RAMADASS, P. and DHINAKAR RAJ, G. (2011). Development of rapid flow-through-based dot-immunoassay for serodiagnosis of leptospirosis in dog. Microbiol. and Infec. Dis. 34: 17-22.

SULZER, C.; GLOSSER, J.; ROGERS, F.; JONES, W. and FRIX, M. (1975). Evaluation of an Indirect Hemagglutination Test for the Diagnosis of Human Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 2: 218-221.

SURUJBALLI, O.; HENNING, D.; MARENGER, R. and HOWLETT, C. (1997). Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked

immunosorbent assay for the detection of *Letospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type Hardjobovis antibodies in bovine sera. Can. J. Vet. Res. 61:267-274.

SURUJBALLI, O. and MALLORY, M. (2004). An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. Can. J. Vet. Res. 68:1-6.

SYKES, J.E.; HARTMANN, K.; LUNN, K.F.; MOORE, G.E.; STODDARD, R.A. and GOLDSTEIN. (2011). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Prevention. J. Vet. Intern. Med. 25:1-13.

SZKLO, M and NIETO, F. J. (2003). Epidemiología Intermedia. Conceptos y aplicaciones. Ed. Díaz de Santos. Madrid. España. pp. 324.

TAHILIANI, P.; KUMAR, M. M.; CHANDU, D.; KUMAR, A.; NAGARAJ, C. AND NANDI, D. (2005). Gel purified LipL32: a prospective antigen for detection of Leptospirosis. J. Postgrad.Med. 51(3):164-168.

TARABLA, H. (2000) Epidemiología diagnóstica. Ediciones Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. pp.120.

TERPSTRA, W.J.; LIGTHART, G.S. and SCHOONES, G.J. (1985). ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human Leptospirosis. J. Gen. Microbiol. 131: 377-385.

TERPSTRA, W.J.; KORVER, H.; SCHOONE, G.J.; VON LEEUWEN, J.; SCHÖNEMANN, C.E.; DE JONGE-AGLIBUT, S. AND KOLK, A.H. (1987).

Comparative classification of *Leptospira* serovars of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction-endonuclease analysis. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 266(3-4):412-421.

THAIPANDUNGPANIT, J.; WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; SMYTHE, L.D.; PET-KANCHANAPONG, W.; LIMPAIBOON, R.; APIWATANAPOR, A.; SLACK, A.T.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; WHITE, N.J.; FEIL, E.J.; DAY, N.P.J. and PEACOCK, S.J. (2007). A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PloS. Negl. Trop. Dis.* 1:56.

THIERMANN, A.B. and GARRETT, L.A. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 44(5):884-887.

TIJSEN, P. (1987). Practice and Theory of enzyme Immunoassays. Series: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Vol 15. General Editors: R.H. Burdon And P. H. Van Knippenberg. Elsevier Sci. Pub. B. V. Amsterdam, The Netherlands. pp.549.

TONARELLI, G., LOTTERSBERGER, J., SALVETTI, J.L., JACCHIERI, S., SILVA-LUCCA, R.A. AND BELTRAMINI, L.M. (2000) Secondary structure-improved bioaffinity correlation in elongated and modified synthetic epitope peptides from p24 HIV-1 coreprotein. *Lett. Pept. Sci.* 7, 217–224

TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M. and KOIZUMI, N. (2011). Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9(1):111-121.



TRUEBA, G.; BOLIN, C.A. and THOEN, C.O. (1991). Evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of bovine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type hardjobovis. J. Vet. Diagn. Invest. 2:323-329.

VANASCO, N.B.; SEQUEIRA, G.; DALLA FONTANA, M.L.; FUSCO, S.; SEQUEIRA, M.D. and ENRIA, D. (2000) Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. Rev. Panam. Salud Publica 7(1):35-40.

VANASCO, N.B. (2004) Brote de leptospirosis rural en un tambo de la Argentina. Sociedad Iberoamericana de Información Científica. 4(2):26-31. www.siicsalud.com.

VANASCO, N. B.; LOTTERSBERGER, J.; SCHMELING, M. F.; GARDNER, I. A. y TARABLA, H. D. (2007). Diagnóstico de Leptospirosis: evaluación de un ensayo inmunoenzimático en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. Rev. Panam. Salud Publica/ Pan Am J Public Health 21 (6):388-395.

VANASCO, N.B.; SCHMELING, M.F.; CHIANI, Y.; LOTTERSBERGER, J. y TARABLA, H. (2010). Diagnóstico de leptospirosis: Evaluación de la Aglutinación Macroscópica como prueba de tamiz en diferentes etapas de la enfermedad. I Congreso Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis. "Espiroquetas, Habana 2010". Habana, Cuba.

VANASCO, N.B.; SCHMELING, M. F.; CHIANI, Y.; LOTTERSBERGER, J. And TARABLA, H.D. (2012). Diagnóstico de leptospirosis humana: Evaluación de la

Aglutinación Macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. *Salus Pública de México*. 54,5: 530-536.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; UMAPATHI, T. and SEHGAL, S.C. (2001). Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. *Indian J. Med. Res.* 114:54-8.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P. and SHRIRAM. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problema. *J. Biosci.* 33(4): 557-569

VINETZ, J. M. (2001). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 14:527-538.

VIVIAN, J.P.; BEDDOE, T.; McALISTER, A.D.; WILCE, M.C.; ZAKER-TABRIZI, L.; TROY, S.; BYRES, E.; HOKE, D.E.; CULLEN, P.A.; LO, M.; MURRAY, G.L.; ADLER, B. and ROSSJOHN, J. (2009). Cristal Structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira spp.* *J. Mol. Biol.* 387, 1229-1238.

WARD, M.P.; GLICKMAN, L.T. and GUPTILL, L.E. (2002). Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002 Jan 1; 220(1):53-8.

WEBER, A.; WEBER, G. and KRAUSS, H. (1984) Evaluation of the slide Agglutination Test for detection of leptospiral antibodies in serum samples of slaughter pigs. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 257: 498-500.

WHO, ILS. World Health Organización, Internacional Leptospirosis Society. (2003). Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta.

WILD, C.J.; GREENLEE, J.J.; BOLIN, C.A.; BARNETT, J.K.; HAAKE, D.A. and CHEVILLE, N.F. (2002). An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14(1): 20-24.

WINSLOW, W.E.; MERRY, D.J.; PIRC, M.L. and DEVINE, P.L. (1997). Evaluation of a commercial Enzyme-linked Immunosorbent assay for detection of Immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J. Clin. Microbiol.* 35(8): 1938-1942.

YASUDA, P. H.; STEINGERWALT, A. G.; SNIZER, K. R.; KAUFMAN, A. R.; ROGERS, F. and BRENNER, D. J. (1987). Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposal for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 37: 407-415.

ZHANG, X.Y.; YU, Y.; HE, P.; ZHANG, Y.X.; HU, B.Y.; YANG, Y.; NIE, Y.X.; JIANG, X.G.; ZHAO, G.P. and GUO, X.K. (2005). Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospires. *Acta Biochim. Biophys Sin (Shanghai)*. Oct; 37(10):649-56.

ZWEIG, M. H. and CAMPBELL, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39:561–77.

# ANEXO 8

**CAPITULO 8. ANEXO.**

**8.1.FICHA CLINICO- EPIDEMIOLÓGICA DE LEPTOSPIROSIS CANINA**

DATOS DEL CANINO

Nombre:..... Edad:..... Sexo:.....

Vacunaciones:..... Desparasitaciones:.....

Propietario:..... Localidad:.....

Domicilio:..... Teléfono:.....

DATOS DE LA ENFERMEDAD

Fecha primeros síntomas:..... Fecha Toma de Muestra:.....

Sintomatología:

Síndrome Renal:..... Ictericia:..... Fiebre:.....

Inyección Conjuntival:..... Vómitos:..... Diarrea:.....

Otros:.....

FUENTE PROBABLE DE INFECCION

Contacto con animales domésticos?..... Cuales?.....

Vacunados?.....Desparasitados.....

Contactos con Roedores?.....Ríos-arroyos?:..... Alcantarillas?:.

Sale a la calle?..... Otros?.....

DATOS DE ESTABLECIMIENTO NOTIFICADOR

Establecimiento:.....

Fecha:.....

Veterinario:.....