



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico Veterinario

Modalidad: Trabajo monográfico

**COMPARACIÓN ENTRE MICROAGLUTINACIÓN (MAT) Y
OTRAS TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE
LEPTOSPIROSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS**

Nombre del alumno: Bustos Sofía Belén

DNI: 35508261

Directora: Anabela Benzoni

DNI: 28821240

Río Cuarto, Córdoba

Mayo, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Comparación entre microaglutinación (MAT) y otras técnicas para el diagnóstico de Leptospirosis en animales domésticos.

Autor: Bustos Sofía Belén

D.N.I: 35508261

Director: Anabela Benzoni

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Carmen Isabel Maffrand _____

Vivian Martín _____

Fecha de presentación: ____/____/____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer y dedicar el siguiente trabajo, en primer lugar, a mi familia y novio quienes me apoyaron desde el primer día y sin su apoyo incondicional no hubiese podido llegar a la meta de esta hermosa carrera.

Agradezco también a la Universidad Nacional de Río Cuarto que me permitió formarme no solo como Médico Veterinario, sino también como persona.

Gracias a mi directora Anabela Benzoni por la buena predisposición y la ayuda por el siguiente trabajo.

Finalmente les dedico este trabajo a mis amigos que estuvieron presentes en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Clasificación	3
1.3. Epidemiología	5
1.4. Transmisión	6
1.5. Enfermedad	6
1.6. Sensibilidad y especificidad de las técnicas	7
1.7. Diagnóstico	7
1.7.1. Diagnóstico clínico	8
1.7.2. Diagnóstico por imagen	10
1.7.3. Diagnóstico de laboratorio	10
1.7.3.1. Diagnóstico serológico y bacteriológico	11
1.7.3.2. Diagnóstico de técnicas serológicas	12
1.7.3.3. Diagnóstico de técnicas bacteriológicas	14
1.7.3.4. Diagnóstico de técnicas moleculares	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general	18
2.2. Objetivos específicos	18

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO	19
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	21
4.1.MAT	21
4.2. TR	23
4.3. Cultivo	23
4.4. PCR	25
4.5.ELISA	26
4.6. Inmunofluorescencia	28
4.7. Observación a campo oscuro	29
5. CONCLUSIÓN	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad producida por una bacteria del género *Leptospira spp.*, que afecta a animales silvestres, domésticos y al hombre. La transmisión se realiza mediante contacto directo o indirecto con orina o fluidos que contengan bacterias viables. Es difícil llegar al diagnóstico a través de la clínica, debido a una amplia variedad de síntomas que comparte con otras enfermedades, es por ello que las pruebas serológicas tienen mucha importancia, siendo la más utilizada la MAT, considerada actualmente la prueba de referencia. El objetivo de este trabajo fue analizar distintas técnicas diagnósticas de leptospirosis. Para ello se realizó una revisión bibliográfica en busca de información que permitiera describir las técnicas disponibles y compararlas con la MAT, en relación a ventajas y desventajas de las mismas, entre otras variables. Entre los datos hallados, se encontró con respecto a la bioseguridad para el operador, que la MAT se considera una prueba riesgosa, al igual que el cultivo, PCR y campo oscuro, debido a la manipulación del agente vivo, en cambio las pruebas como TR, ELISA e Inmunofluorescencia fueron consideradas como seguras. En relación a la interpretación de los resultados de las distintas técnicas, las únicas pruebas que presentan resultados objetivos son PCR y ELISA. También se halló diferencias referidas al momento del curso clínico para realizar las distintas técnicas. La MAT es muy recomendada en cuadros agudos; en cuadros crónicos aumenta su sensibilidad y especificidad si se la combina con otras pruebas como son el cultivo, PCR, ELISA, IF y campo oscuro. Con respecto a otras de las variables registradas, como la velocidad de obtención de resultados, se encontró que el cultivo es un método lento, la MAT posee velocidad media y el resto de las pruebas estudiadas se consideran rápidas. Por último, en lo referido a sensibilidad, PCR y ELISA podrían presentar mayor sensibilidad en relación a la MAT y con respecto a la especificidad, el cultivo, PCR y la inmunofluorescencia pueden ser iguales o más sensibles que la MAT, dependiendo de la etapa de la enfermedad que este cursando el animal. Por todo lo analizado se concluye, que a pesar de que la MAT presenta algunas desventajas, ninguna técnica es capaz de reemplazarla y sigue siendo necesaria para la confirmación del diagnóstico de la leptospirosis.

SUMMARY

Leptospirosis is a disease produced by a bacteria of the gender *Leptospira spp.*, which affects wild, domestic animals and humans. The transmission is made by direct or indirect contact with urine or fluids containing viable bacteria. It is difficult to arrive to the diagnosis through the clinic, due to the wide variety of symptoms that shares with other diseases, that is why the serological tests have a lot of importance. The test most used is the MAT, and it is considered the proof of reference. The objective of this work was to analyze different diagnostic techniques in update bibliography. For this, a bibliographical review was done in search of information that allows to describe the available techniques and compare them with the MAT, in relation to advantages and disadvantages, among other variables. According to the data found with respect to the biosecurity for the operator; the MAT is considered a risky test, as well as the culture, PCR and dark field, due to the handling of the living agent, in change the trials like TR, Elisa and Immunofluorescence were considered as safe. In relation to the interpretation of the results; the only proofs that present objective results are PCR and ELISA. Differences were also found referred to the moment of the clinical course to carry out different techniques. The MAT is highly recommended in acute cases, and in chronic cases it increases its sensitivity and specificity if it is combined with other tests such as culture, PCR, ELISA, IF and dark field. With respect to the other registered variables, like the speed of obtaining results, it was found that the culture is a slow method, the MAT has average speed and the rest of the tested studies are considered to be quick. Finally, as regards sensitivity; PCR and ELISA could present higher sensitivity than the MAT and with respect to specificity, culture, PCR and Immunofluorescence can be equal or more sensible than MAT, depending on the stage of the disease that the animal is presenting. It concludes that despite the MAT presents numerous disadvantages, there is not a technique that is capable of replacing it and it continues to be necessary for the confirmation of the diagnosis of leptospirosis.

1. INTRODUCCIÓN

En el campo de la investigación diagnóstica de la leptospirosis, existen diversas posibilidades, sin embargo, la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) es considerada actualmente la técnica de oro reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Internacional de Epizootia (OIE), tanto en el ámbito nacional como internacional.

Sin embargo, muchas veces resulta difícil su aplicación en la práctica profesional diaria, debido a que se necesita personal entrenado, mantener el cepario y un chequeo del antígeno (Brihuega, 2008). Por lo tanto, surge el interrogante si podría ser factible de utilizar otras técnicas diagnósticas con la obtención de resultados similares o mejores que la MAT.

ANTECEDENTES

La leptospirosis fue descrita por primera vez por Adolfo Weil en Heidelberg, en 1886 (Zunino y Pizarro, 2007; Rosario Fernández *et al.*, 2012; Sepúlveda Quintero, 2017) y actualmente es considerada una enfermedad zoonótica emergente o reemergente de distribución mundial (Vanasco *et al.*, 2007; Guerra, 2013; Torres Castro *et al.*, 2015; Sanchez *et al.*, 2017), producida por un grupo de bacterias morfológica, fisiológica, metabólica y genéticamente distintas a otros microorganismos (Murugesan *et al.*, 2014; Busson, 2018).

Dicha enfermedad afecta a animales silvestres, domésticos y al hombre (CDC, 2014; Sedano *et al.*, 2015; Torres Castro *et al.*, 2015; Troyano *et al.*, 2017). Argentina es considerado un país endémico con brotes epidémicos de leptospirosis (INTA, 2014).

CLASIFICACIÓN

Esta bacteria del filo *Spirochaetes* pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*. Dentro del género *Leptospira* existen clasificaciones taxonómicas basadas en sus diferencias fenotípicas o serológicas y genómicas o genéticas (Madigan *et al.*, 2009; Rosario Fernández *et al.*, 2012; INTA, 2014; Romero-Vivas y Falconar, 2016; Hernández Rivera *et al.*, 2017).

Especies del género <i>Leptospira</i>	
▪ Clasificación fenotípica:	▪ Clasificación genotípica:
○ <i>Leptospira interrogans</i> (patógena)	○ 22 genomoespecies diferentes
○ <i>Leptospira biflexa</i> (no patógena)	

Antes de los años 80, este género comprendía dos grupos de leptospiros: una patógena, llamada *Leptospira interrogans* (que tiene el potencial de causar enfermedad en animales y seres humanos) y una saprófita llamada *Leptospira biflexa* (de vida libre y sin potencial para causar enfermedad) (Ningal *et al.*, 2015; Romero-Vivas y Falconar, 2016). Hasta ese momento, la diferenciación de dichas especies se realizaba de forma fenotípica, basada en el crecimiento de leptospiros saprófitas a 13°C y en presencia de 8-azaguanina (Romero-Vivas y Falconar, 2016).

A partir del año 1987 y gracias a estudios moleculares de ADN mediados por las técnicas de hibridación, la secuenciación del ARNr 16S, la patogenicidad, la virulencia y las características de crecimiento *in vitro*, se logró hacer una reclasificación genotípica (Chavarria Joya *et al.*, 2015; Romero-Vivas y Falconar, 2016).

Cerqueira y Picardeau, en el año 2009 tipificaron diversas especies de *Leptospira spp.* a partir del gen 16S conformando tres clados (P=patógenas; S= saprófitas e I=intermedias) (Brihuega *et al.*, 2017).

En la actualidad, el género *Leptospira* comprende 22 especies, clasificadas como infecciosas y no infecciosas. Las leptospiros infecciosas a su vez se dividen en dos grupos: el Grupo I (10 especies patógenas) y el Grupo II (5 especies intermedias). Las leptospiros no infecciosas incluyen las del grupo saprófita (7 especies). Existe una especie adicional compuesta por serovares patógenos y no patógenos (Brihuega *et al.*, 2018).

Se entiende por serovar a la unidad de clasificación utilizada con fines epidemiológicos, de diagnóstico e investigación y está basado en diferencias antigénicas que se encuentran principalmente en la envoltura (Chavarria Joya *et al.*, 2015; Moldes, 2017; Sepúlveda Quintero, 2017) y se detectan mediante técnicas de microaglutinación (Zunino y Pizarro, 2007). Los serovares pueden agruparse en serogrupos (Chavarria Joya *et al.*, 2015), los cuales contienen serovares antigénicamente relacionados (Céspedes, 2005; Rosario Fernández *et al.*, 2012;

Zunino y Pizarro, 2007; Moldes, 2017; Sepúlveda Quintero, 2017). Existen más de 60 serovares de *L. Biflexa* y más de 240 de *L. Interrogans* (Céspedes, 2005).

Se debe tener en cuenta que, debido a la falta de correspondencia entre las clasificaciones fenotípicas y genéticas, existen especies genómicas que se incluyen tanto en los serovares patógenos como no patógenos, así como también serovares incluidos en más de una especie genómica (Arencibia Arrebola *et al.*, 2010). Asimismo, ciertas cepas pertenecen a un mismo serovar y pueden pertenecer a una especie diferente de *Leptospira*, lo que muchas veces genera reacciones cruzadas en las pruebas (Chavarría Joya *et al.*, 2015).

Las bacterias leptospiras son espiroquetas largas, delgadas y móviles (CDC, 2014; Hernández Rivera *et al.*, 2017; Moldes, 2017; Busson, 2018) con extremos libres que terminan en forma de gancho. Son aerobias y cultivables (Acha y Szyfres, 2001), pudiendo ser de vida libre o estar asociadas a huéspedes (CDC, 2014). Las leptospiras no se replican fuera del huésped (Sykes *et al.*, 2010), pero pueden permanecer viables durante semanas o meses en agua dulce, tierra y barro (CDC, 2014) con pH neutro o levemente alcalino, a una temperatura entre 28°C y 32°C (Costa *et al.*, 2012; Hernández Rivera *et al.*, 2017; Moldes, 2017; Montesdeoca Castillo, 2017; Busson, 2018).

EPIDEMIOLOGÍA

Es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que se presenta tanto en zonas urbanas como rurales (Moral, 2014), afecta alrededor de 160 especies de mamíferos domésticos y silvestres (Zunino y Pizarro, 2007) y cada serovar posee uno o varios huéspedes animales predilectos, pero a su vez cada especie animal podría ser huésped de uno o varios serovares (Acha y Szyfres, 2001).

La leptospirosis en gatos es muy rara y se sabe muy poco sobre la enfermedad en esta especie (Acha y Szyfres, 2001; AVMA, 2011), aunque existe evidencia de exposición serológica y los serovares Canicola, Grippotyphosa y Pomona han sido aislados en gatos (Sykes *et al.*, 2010).

La Leptospirosis es especialmente prevalente en regiones geográficas con abundantes precipitaciones anuales y climas cálidos, pero factores de riesgo como la exposición a hospederos y la presencia de animales silvestres y domésticos que actúan como reservorios también influyen en la distribución geográfica de la enfermedad (Sykes *et al.*, 2010).

Debido a la gran variedad de presentaciones clínicas, es una enfermedad subnotificada, pero aun así, se la considera una de las zoonosis más frecuente en nuestro país (Moral, 2014) y en el mundo (Hartskeerl *et al.*, 2011).

TRANSMISIÓN

En los animales, la transmisión puede realizarse mediante contacto directo o indirecto con orina u otros fluidos que contienen leptospiras viables (Moral, 2014; Montesdeoca Castillo, 2017; Troyano *et al.*, 2017). Estas penetran por mucosa oral, conjuntival, nasal, genital y también por la piel cuando existen laceraciones o si se encuentra reblandecida por la humedad (Luna *et al.*, 2008), también se conoce la infección mediante vía congénita o neonatal y por transmisión sexual (Moral, 2014). La eliminación de leptospiras por riñón es mayor durante las primeras semanas post infección y puede durar 4 años o más.

Debido al comportamiento de olfateo y lamido de genitales de los perros, se favorece la transmisión intraespecie, especialmente en machos (Luna *et al.*, 2008; INTA, 2014).

La enfermedad puede ser transmitida después de una infección subclínica o clínica, y también durante la última etapa de la enfermedad aguda y la fase crónica (Luna *et al.*, 2008). La transmisión es mayor durante el período lluvioso del año, ya que las condiciones de temperatura, humedad y pH ayudan a la transmisión de dicha enfermedad (Berdasquera-Corcho, 2007).

ENFERMEDAD

El período de incubación se considera a partir del momento de la infección o día cero, este dura entre cinco y diez días, luego sobreviene la etapa de bacteriemia, momento en que aparecen los primeros síntomas clínicos (etapa aguda). Al aparecer los anticuerpos en sangre, las Leptospiras desaparecen del torrente sanguíneo y se acantonan en riñón, cerebro, humor acuoso y tracto genital femenino. Si el animal sobrevive, comienza la etapa crónica en la cual se observan algunas secuelas de la infección aguda (abortos, nefritis, oftalmia periódica en equinos, etc.) (INTA, 2014).

El período de incubación en perros puede ser tan corto como unos pocos días, las bacterias comienzan a replicarse en sangre un día después de la infección. El período de incubación en estudios experimentales ha sido de siete días, pero el tiempo varía dependiendo de la dosis infectante, la cepa y la respuesta inmune del huésped. Pueden ocurrir períodos más

cortos con inóculos más grandes, y períodos más largos después de infecciones crónicas de bajo grado que afecte los túbulos renales o hepatocitos, donde la enfermedad clínica no se detecta hasta cierto tiempo después de la lesión renal o hepática (Sykes *et al.*, 2010).

Los animales que son huéspedes naturales de un serotipo particular, por lo general no demuestran sintomatología o son pocos los efectos adversos producidos después de la infección. Sin embargo, pueden desarrollar la enfermedad a otro serotipo. La signología depende de la inmunidad, la edad del hospedador, el ambiente y la virulencia del serovar actuante (Silva y Riedemann, 2007).

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS TÉCNICAS

La precisión de las diferentes pruebas diagnósticas se comparan con la MAT y se miden en términos de sensibilidad y especificidad (Ye *et al.*, 2014).

La sensibilidad y especificidad miden la evaluación de una prueba con respecto al estado verdadero de salud de un individuo. La sensibilidad es la probabilidad de obtener un resultado positivo en un individuo enfermo que tuvo contacto con el microorganismo infeccioso. La especificidad es la probabilidad de obtener un resultado negativo en un animal sin la enfermedad y que la positividad no sea por reacciones cruzadas con otros antígenos. Para validar una prueba, los resultados pueden ser comparados con el verdadero estado de salud del individuo, el cual es determinado frecuentemente por la prueba considerada patrón o standard de oro (Chiani, 2013; Moldes, 2017).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas es una de las herramientas indispensable para la lucha y el control de las mismas. La leptospirosis no escapa a esta generalización. El diagnóstico exige conocer la dinámica de la infección, las técnicas de diagnóstico a utilizar, sus limitaciones y su valor relativo en las distintas etapas de la misma (INTA, 2014).

La leptospirosis es difícil de diagnosticar, tanto clínicamente como por métodos de laboratorio (Hartskeerl *et al.*, 2011; Guerra, 2013; Sepúlveda Quintero, 2017). Es casi imposible la confirmación de la infección por la clínica solamente (García *et al.*, 2014), dado que las *Leptospiras* pueden afectar diferentes sistemas orgánicos, y pueden producir una extensa variedad de presentaciones clínicas (Silva y Riedemann, 2007; Guerra, 2013).

Para evitar complicaciones y no llegar a las formas más graves de la enfermedad, es muy importante lograr realizar un diagnóstico temprano y comenzar inmediatamente un tratamiento eficaz (Vanasco *et al.*, 2007). Por lo tanto, la identificación de la leptospirosis debe basarse en un alto índice de sospecha clínica y en el uso de una prueba de laboratorio rápida y específica (Croda *et al.*, 2007).

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La leptospirosis puede manifestarse de forma subclínica o clínica, teniendo un carácter desde leve hasta letal. La forma subclínica se presenta con mayor frecuencia en roedores, cerdos y bovinos no preñados ni en lactación. La forma clínica se da más en terneros, corderos y cachorros, con aparición repentina de fiebre, disnea, hemoglobinuria e ictericia. Suelen presentarse también vómitos y diarreas hemorrágicas. En los animales adultos, la sintomatología varía dependiendo de la especie (INTA, 2014).

En el perro se puede presentar una amplia gama de síntomas, por lo cual muchas veces es confundida con otras enfermedades (CDC, 2014). El cuadro clínico puede diferir, entre otras causas, de acuerdo al serovar infectante (Gualtieri *et al.*, 2013).

En la primera etapa de la infección, los perros pueden mostrar signos leves, tales como malestar general y pueden hasta pasar desapercibidos (OMS, 2008). En los cuadros agudos se suelen observar signos de disfunción hepática y renal principalmente (Gualtieri *et al.*, 2013).

También pueden presentar la forma más grave denominada síndrome de Stuttgart o hemorrágica, caracterizado por un cuadro hiperagudo que comienza con tres a cuatro días de fiebre, seguido de mialgias, hemorragias en la cavidad bucal y en una etapa posterior se puede presentar gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda (Acha y Szyfres, 2001). Las tendencias hemorrágicas también pueden manifestarse como hematemesis, hematoquezia, hemoptisis, melena, epistaxis y hemorragias petequiales (Sykes *et al.*, 2010). En algunos perros la enfermedad progresa rápidamente hasta la muerte, y la falla hepática y renal no llegan a desarrollarse (Greene, 2008; Nelson y Couto, 2010).

En general, los veterinarios deben sospechar de leptospirosis en perros con signos de falla hepática o renal, uveítis, hemorragia pulmonar, aborto o enfermedad febril aguda (Sykes *et al.*, 2010).

En infecciones subagudas se presenta fiebre, anorexia, vómitos, deshidratación y polidipsia, también hay rehuída al movimiento e hiperestesia (Greene, 2008). La fiebre ocurre en el curso temprano de la enfermedad, y puede estar acompañada de temblores y dolor muscular generalizado. Los perros con falla renal aguda pueden tener polidipsia, poliuria, deshidratación, vómitos, diarrea, inapetencia, letargia, dolor abdominal o una combinación de dichos signos. La oliguria y anuria también podrían ocurrir. Otras manifestaciones de infección incluyen conjuntivitis, uveítis, taquipnea o disnea por distres respiratorio agudo o hemorragia pulmonar (Sykes *et al.*, 2010).

En algunos perros que sobreviven a la infección subaguda, la funcionalidad renal puede normalizarse, y en otros se desarrolla una falla renal crónica (Greene, 2008; Nelson y Couto, 2010). La enfermedad hepática crónica puede ocurrir sin compromiso de otros órganos (Greene, 2008). Algunas de las manifestaciones más comunes de leptospirosis crónica son polidipsia, poliuria, pérdida ponderal y ascitis causadas por la falla hepática (Nelson y Couto, 2010).

Los signos clínicos en gatos suelen ser leves o inaparentes, a pesar de la presencia de leptospiremia, leptospiruria y evidencia histológica de inflamación hepática y renal (Sykes *et al.*, 2010). Sin embargo, en algunos casos se han reportado manifestaciones clínicas que incluyen fiebre, meningitis, alteraciones oculares, dolor abdominal, vómitos, anorexia, trastornos pulmonares, hemorragias en la boca, faringitis, gastroenteritis, nefritis, trastornos reproductivos y dolor e inflamación de articulaciones. Las infecciones pueden ser autolimitantes en tan sólo siete días (Azócar-Aeoda *et al.*, 2014; Sepúlveda Quintero, 2017).

En relación a la especie rumiante, los más susceptibles son los bovinos. Luego del período de incubación (entre cinco y catorce días), comienzan los mismos síntomas inespecíficos como hipertermia, inapetencia, congestión de vasos conjuntivales. Luego, durante la lactancia puede manifestarse agalactia. En casos más severos aparece ictericia y encefalitis, anemia, hemoglobinuria y hematuria. También se puede producir aborto mayormente en el último tercio de gestación o nacimiento de prematuros y retención de placenta (INTA, 2014; Sepúlveda Quintero, 2017).

En cuanto a los porcinos, los más susceptibles son lechones y hembras preñadas. Primero se observa hipertermia moderada y anorexia, luego se suma conjuntivitis, diarrea, ictericia y hemoglobinuria. En lechones pueden aparecer convulsiones. Las hembras pueden abortar o parir crías prematuras. Luego del aborto, pueden presentar hipogalactia y desórdenes reproductivos (INTA, 2014).

En equinos también se manifiestan signos inespecíficos al comienzo de la enfermedad (INTA, 2014). Aunque se han notificado casos esporádicos de enfermedad renal y hepática, la enfermedad en equinos se ha asociado con mayor frecuencia a abortos y uveítis. En potrillos se ha informado recientemente la insuficiencia respiratoria aguda causada por leptospirosis (Ye *et al.*, 2014), además los potrillos son débiles y pueden morir en pocos días. En la fase crónica se instaura la iridociclitis, que provoca lagrimeo, fotofobia, conjuntivitis, edema de córnea, que puede llevar a ceguera (INTA, 2014).

DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

Otros métodos complementarios son la radiografía de tórax que puede mostrar patrones intersticiales difusos o patrones alveolares más severos y la ecografía abdominal que puede revelar hallazgos no específicos como renomegalia, mayor ecogenicidad pancreática, engrosamiento de la pared gástrica e intestinal, esplenomegalia y adenomegalia (Sykes *et al.*, 2010; Busson, 2018).

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Los hallazgos en el hemograma de perros infectados pueden incluir neutrofilia con desvío a la izquierda, linfopenia y anemia no regenerativa de leve a moderada (Sykes *et al.*, 2010; Moldes, 2017; Busson, 2018). Una anemia severa se observa luego de una hemorragia gastrointestinal o pulmonar. La trombocitopenia puede o no estar presente (Sykes *et al.*, 2010; Busson, 2018).

En la bioquímica sanguínea, el aumento de creatinina y urea puede estar presente. La disfunción hepática puede manifestarse por aumentos de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina sérica (FAS) y la concentración total de bilirrubina, casi siempre en conjunción con la azotemia. El aumento de la creatin quinasa (CK) puede estar presente debido a la miositis. El aumento de troponina sugiere daño miocárdico. El urianálisis puede mostrar isostenuria, u ocasionalmente hipostenuria. También pueden estar presentes la glucosuria, proteinuria, bilirrubinuria, hematuria, piuria y cilindruria (Ettinger y Feldman, 2002; Greene, 2008; Sykes *et al.*, 2010; Moldes, 2017; Busson, 2018).

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y BACTERIOLÓGICO

Existen dos tipos de anticuerpos contra leptospiras; uno dirigido contra antígenos de género común a todas las leptospiras (tanto patógenas como no patógenas) y otro contra antígenos específicos de serovariedad y serogrupo. Los anticuerpos específicos de género son los primeros en aparecer, al tercer o cuarto día post infección, por lo que son indicadores de fase aguda de la infección (IgM). Estos desaparecen gradualmente y sólo permanecen detectables durante unas semanas o meses, mientras que los anticuerpos específicos de serovariedad y serogrupo pueden determinarse con la MAT durante años y en muchos casos durante toda la vida (IgG). Es por esto que un resultado positivo en la MAT podría ser de escasa utilidad para diferenciar una infección presente de una pasada (Vanasco *et al.*, 2007; Moldes, 2017; Busson, 2018).

El diagnóstico de leptospirosis puede confirmarse con una única muestra si las leptospiras son cultivadas (OMS, 2008), o por detección de genoma bacteriano por PCR. Otra forma de confirmación es a partir de seroconversión en MAT con el uso de dos o más muestras pareadas (Moral, 2014), las cuales deben tomarse con dos o tres semanas de diferencia para ver cambios en el título, lo que no es práctico en el contexto clínico. Alternativamente se puede tomar un único título alto en la MAT como evidencia de infección activa. La OMS y el CDC definieron que un sólo título de MAT de 400 respalda la confirmación del diagnóstico (Ye *et al.*, 2014).

Las técnicas de diagnóstico son diversas y la elección adecuada depende del momento de desarrollo de la enfermedad, etapas de leptospiremia y leptospiruria, y posibilidad de muestras pareadas (Alegre *et al.*, 2013).

En cuanto al diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis, las pruebas se pueden dividir en dos grupos: aquellas pruebas directas, que tratan de evidenciar la presencia del agente o antígenos de este o ácidos nucleicos en tejidos animales o fluidos corporales (OIE, 2008; Moldes, 2017) y las técnicas indirectas que detectan el paso del agente, mediante la detección de anticuerpos antileptospiras. La mayor parte de los estudios sobre la leptospirosis se han limitado principalmente a este último diagnóstico, denominado diagnóstico serológico, debido a la dificultad que involucra el aislamiento (Luna *et al.*, 2008).

DIAGNÓSTICO DE TÉCNICAS SEROLÓGICAS

Las pruebas serológicas son utilizadas con mayor frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico (Montesdeoca Castillo, 2017).

El objetivo de estas técnicas es determinar la presencia o ausencia de anticuerpos antileptospiras en sangre, LCR, orina, humor acuoso, leche, etc. (Schust *et al.*, 2011; Brihuega *et al.*, 2017). Estas pruebas ponen en contacto el suero del paciente con los antígenos, los cuales pueden ser leptospiras vivas o extractos de leptospiras (OMS, 2008).

La detección de anticuerpos en sangre es posible a partir del décimo día aproximadamente y si se toman dos muestras separadas de quince a veinte días se podrá observar seroconversión con aumento del título de anticuerpos de 4 veces o más. Esto es característico de la fase aguda (Brihuega *et al.*, 2017). Sin embargo, la obtención de un título alto en una única muestra, en concordancia con signos clínicos compatibles y con un historial de exposición a factores de riesgo, son de alto valor diagnóstico para confirmar la enfermedad (Greene, 2008; Martin, 2018).

Luego los anticuerpos comienzan a declinar de forma variable y pueden no observarse variaciones entre muestras, de ahí que la serología en la etapa crónica tiene poco valor diagnóstico (indica que existió contacto con el agente, lo cual podría deberse a la vacunación, infección persistente, etc.) (Brihuega *et al.*, 2017).

La seroreactividad de un animal solo indica el contacto con la bacteria, pero no significa que los signos clínicos sean debido a una infección actual (Moldes, 2017).

Algunas técnicas serológicas son:

a. Macroaglutinación o TR (Prueba de aglutinación macroscópica en placa con antígeno termorresistente): es una técnica tamiz o de cribado que se realiza mediante la aglutinación macroscópica con antígeno termoresistente.

El método TR, consiste en enfrentar el suero del paciente con un antígeno de género específico de una leptospira inactivada con calor, para observar una aglutinación macroscópica característica (Chiani, 2013). El antígeno TR es una fracción termoresistente del género *Leptospira spp* y que reacciona frente a cualquier serovar (Moldes, 2017). Es una técnica cuantitativa que detecta IgM (anticuerpos de fase temprana) (INTA, 2014).

A pesar de su bajo costo y fácil aplicación, presenta la desventaja operativa en cuanto a su subjetividad de interpretación, baja sensibilidad y especificidad (Vanasco *et al.*, 2012).

El TR brinda un diagnóstico rápido en laboratorios de baja complejidad o ante la necesidad de evaluar una población numerosa, siempre con posterior confirmación mediante la MAT (Seijo y Mazzonelli, 1993; Vanasco *et al.*, 2012; Chiani, 2013).

b. Microaglutinación (MAT): es la base del diagnóstico serológico y de la clasificación taxonómica (INTA, 2014; Brihuega *et al.*, 2017). Determina los anticuerpos aglutinantes en el suero de un paciente mediante la mezcla de varias diluciones con leptospiras (OMS, 2008; Busson, 2018). Se enfrenta el suero con los distintos antígenos, la suspensión suero/antígeno es incubada durante 1 hora a 37° o 3 hs a temperatura ambiente y luego se realiza la lectura en búsqueda de aglutinación (Moldes, 2017). Los anticuerpos al unirse a las leptospiras forman grumos que se observan utilizando microscopía de campo oscuro. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser IgM e IgG (OMS, 2008).

Ha sido utilizada por más de 70 años y actualmente es la prueba diagnóstica de elección para el diagnóstico de leptospirosis en pacientes con signos clínicos consistentes (Sykes *et al.*, 2010; Chiani, 2013).

Se utiliza para detectar anticuerpos antileptospiras en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de leptospirosis. Es el método de referencia para el diagnóstico serológico con el fin de determinar el serovar causante de la enfermedad (Godinez Santos, 2013).

Es una prueba serogrupo específica que se basa en los antígenos de los lipopolisacáridos. Las variaciones de los carbohidratos de los lipopolisacáridos son los responsables de la diversidad antigénica de los diferentes serovares de *Leptospira* (Chiani, 2013).

c. Enzimoimmunoensayo (ELISA): puede detectar IgM e IgG. Es uno de los métodos más usados para detectar leptospirosis aguda. Las IgM son los anticuerpos que se producen primero y pueden ser detectadas por ELISA durante la primera semana de enfermedad a partir de los tres días de iniciados los síntomas, y la detección tardía de IgG permite diferenciar infecciones recientes de pasadas. La detección de anticuerpos IgM en una sola muestra confirma una infección reciente. La IgG comienza a generarse luego de la IgM y perdura por más tiempo (Chiani, 2013; Godinez Santos, 2013).

Generalmente es usado un antígeno reactivo llamado género específico (OMS, 2008; Brihuega *et al.*, 2017). El Dot-ELISA es un ensayo inmunoenzimático que recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario en distintos fluidos biológicos. Es una prueba cualitativa, ya que indica presencia o ausencia de un antígeno o anticuerpo determinado (Medrano Galarza *et al.*, 2011).

Realizado en orina, el Dot-ELISA, detecta estructuras antigénicas de leptospiras, ya sean vivas o no. En casos de enfermedad crónica, una prueba que detecta antígenos en orina es ideal para confirmar o descartar el diagnóstico que se obtuvo con la MAT (Medrano Galarza *et al.*, 2011).

d. Inmunofluorescencia (IF): puede ser una prueba directa o indirecta. En la prueba directa se utilizan anticuerpos para detectar uno o varios epítopes de una cepa o varias cepas. En la indirecta, los anticuerpos marcan anticuerpos antileptospiras (anticuerpos antianticuerpos) (INTA; 2014).

Es utilizada para identificar serovares en tejidos y líquidos corporales y además puede emplearse como método tamiz para identificar a los animales que eliminan los microorganismos en orina cuando un cultivo es imposible de hacer o exige demasiado tiempo (Silva y Riedemann, 2007).

La técnica directa (IFD) consiste en la utilización de anticuerpos marcados con fluoresceína, pueden estar dirigidos contra uno o varios epítopes de una o varias cepas, siendo monovalentes o bivalentes respectivamente. En la prueba indirecta (IFI) los anticuerpos marcados lo son contra anticuerpos antileptospiras (anticuerpos antianticuerpos), por lo que el proceso se alarga un paso (INTA, 2014).

La IFI permite demostrar la presencia de anticuerpos de tipo IgM que están presentes normalmente en las primeras etapas de la enfermedad (Meny *et al.*, 2014).

El éxito de la IFI, depende del número de organismos presentes y su localización en una zona en particular dentro del órgano afectado, por lo cual es menos útil para portadores crónicos (Silva y Riedemann, 2007).

DIAGNÓSTICO DE TECNICAS BACTERIOLÓGICAS

El aislamiento y la detección se pueden realizar a partir de órganos como hígado, pulmón, cerebro, riñón y también a partir de fluidos corporales como sangre, leche, líquido

cefalorraquídeo, torácico, peritoneal y orina de animales infectados. En animales con enfermedad crónica que funcionan como portadores, el aislamiento puede realizarse a partir de riñón, orina o tracto genital (OIE, 2008; Moldes, 2017). Las muestras deben ser tomadas antes de que el animal reciba tratamiento antibiótico (Moldes, 2017).

El aislamiento es la prueba capaz de confirmar un diagnóstico presuntivo de leptospirosis (INTA, 2014), y permite la identificación definitiva de la cepa infectante por medio de la caracterización genética y serológica de los mismos (Chiani, 2013). El crecimiento a veces puede ser detectado después de cultivar una semana, pero muchas veces toma más tiempo, por lo que el medio de cultivo debe ser revisado a intervalos regulares durante 4 meses mediante la utilización de un microscopio de campo oscuro (OMS, 2008).

Las muestras de elección son: orina, hígado, humor acuoso, riñón, sangre, bazo, plasma, pulmón, líquido cefalorraquídeo y leche (INTA, 2014) y también muestras de fetos (hígado, riñón y pulmón en fetos). Los aislamientos son identificados por métodos serológicos o por técnicas moleculares (Chiani, 2013). Durante los primeros 10 días de infección, el mayor número de bacterias se encuentra en sangre, y una muestra de la misma es de elección durante la primera semana de la enfermedad. Después de ese tiempo, los organismos se encuentran en mayor porcentaje en orina. Cuando no se conoce el tiempo de infección, un test simultáneo de sangre y orina aumentaría la sensibilidad del diagnóstico (Sykes *et al.*, 2010).

Otra técnica diagnóstica, es la observación al microscopio de campo oscuro (MCO): es una técnica sencilla donde las leptospiras pueden observarse como microorganismos delgados, enroscados y de movimientos rápidos (OMS, 2008; Brihuega *et al.*, 2017).

La leptospira se encuentra en el límite del poder de resolución del microscopio óptico por su escaso grosor, es por esto que se recomienda la microscopía de campo oscuro con la cual las espiroquetas se observan como hebras de plata sobre un fondo oscuro (Pérez Elias *et al.*, 2015).

Pueden realizarse distintas tinciones, entre las mencionadas se encuentran la tinción de plata o argéntica (Warthin-Starry) y la tinción con inmunoperoxidasa (OMS, 2008).

DIAGNÓSTICO DE TÉCNICAS MOLECULARES

El PCR consiste en la amplificación de secuencias de ADN mediante la acción de una ADN polimerasa (INTA; 2014). La presencia de leptospiras se confirma mediante la detección e identificación de segmentos específicos del ADN de leptospira (OMS, 2008).

- a. Ribotyping
- b. Inserción de secuencias
- c. Análisis de endonucleasa de restricción y electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE)
- d. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) y PCR con primers arbitrarios (AP-PCR)
- e. Análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)
- f. Tipificación de secuencias en múltiples locus (MLST)
- g. Análisis de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA)

Los ensayos de PCR para detectar ácidos nucleicos de *Leptospiras* están siendo ofrecidos crecientemente por laboratorios de diagnóstico veterinario en el mundo (Sykes *et al.*, 2010).

Un gran número de primers se han descrito para la detección de leptospirosis, de los cuales dos han tenido una extensa evaluación clínica. Los primers descritos por Merien *et al.*, (1992) amplifican fragmentos del ARN 16S tanto de leptospiras patógenas como no patógenas, mientras que los descritos por Gravekamp *et al.*, (1993) no amplifican serovares de *L. kirschneri*. Estas técnicas permiten amplificar segmentos de ADN presentes en suero, orina, humor acuoso y tejidos corporales (Chiani, 2013).

-El ribotyping consiste en determinar perfiles de longitud de fragmentos de ADN digerido probados con ARNr (Brihuega *et al.*, 2017).

-La inserción de secuencias (IS) es un método basado en elementos de secuencias que toman valor en estudios epidemiológicos y es capaz de diferenciar serovariedades de diferentes especies de *Leptospira* y entre serovares de una especie de *Leptospira* determinada (Brihuega *et al.*, 2017).

-El análisis de endonucleasas de restricción y electroforesis de campo pulsado en gel (PFGE) consiste en la comparación de perfiles de restricción en geles de agarosa o acrilamida. Es un método confiable para tipificar cepas, pero es una técnica laboriosa y requiere grandes cantidades de cultivo. La interpretación y comparación entre laboratorios también se dificulta (Brihuega *et al.*, 2017).

-La amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RADP) y PCR con primers arbitrarios (AP-PCR) discriminan entre especies de *Leptospiras* y representan una técnica simple y rápida para su identificación y además para comparar entre serovares. Son útiles para estudios de epidemiología, pero su costo es alto y su reproducibilidad es baja, lo que dificulta la comparación de resultados entre distintos laboratorios (Brihuega *et al.*, 2017).

-El análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) o también llamado análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados fluorescentes (FAFLP); implica un procedimiento de tres pasos. Como desventaja requiere mayor cantidad de cultivo comparado con otros métodos de PCR (Brihuega *et al.*, 2017).

-La tipificación de secuencias en múltiples locus (MLST) no requiere grandes cantidades de ADN purificado, pero requiere de un cultivo previo de un aislamiento. Es altamente reproducible entre laboratorios (Brihuega *et al.*, 2017).

-El análisis de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA) tipifica las serovariedades presentes en las diferentes especies de *Leptospiras*. Se usa solo para especies patógenas de *Leptospiras* y puede diferenciar serovares. Es altamente reproducible entre laboratorios. Una desventaja es que requiere un aislamiento previo (Brihuega *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

- Analizar distintas técnicas diagnósticas de leptospirosis mediante una revisión bibliográfica actualizada.

2.2. Objetivos específicos:

-Describir las técnicas diagnósticas.

-Identificar ventajas y desventajas de cada una de ellas.

-Comparar la especificidad y sensibilidad de las pruebas.

-Adquirir destreza en la búsqueda, selección bibliográfica y jerarquización de la información, así como también en la escritura científica.

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

Para el desarrollo de este trabajo se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica de literatura diferente: libros, artículos de revistas científicas, manuales de organismos oficiales (SENASA, INTA).

Para la búsqueda del material científico (libros, revistas) se han utilizado una serie de bases de datos, a través del servidor de la UNRC, como son:

- PubMed- Medline
- Google académico
- Scielo
- Sciens

Para la búsqueda del tema en las bases de datos, se han utilizado distintas metodologías de selección, como por ejemplo el uso de palabras claves, como así también descriptores. Los elementos de búsqueda utilizados fueron:

- Leptospirosis
- Diagnóstico
- Zoonosis
- Técnicas diagnósticas
- PCR
- Inmunofluorescencia
- PCR+Leptospirosis
- Inmunofluorescencia + Leptospirosis

Una vez realizada la búsqueda se descartaron los documentos que no presentaban acceso libre al texto completo, los que contenían información irrelevante para este trabajo o los que estaban en idiomas distintos al español, inglés y portugués.

Los datos obtenidos en la bibliografía se analizaron en función de distintas variables que fueron consideradas las más importantes a la hora de evaluar y comparar las distintas técnicas diagnósticas.

Las variables incluidas en este análisis fueron:

-Bioseguridad: grado de riesgo de contraer la enfermedad que corre el operador al realizar la técnica diagnóstica.

-Interpretación: grado de dificultad para leer los resultados de las pruebas diagnósticas y posibilidad de que distintos operadores coincidan o difieran en el resultado obtenido.

-Velocidad en la obtención de resultados: rápida (entre 1 y 48 hs), media (entre 48 hs y 14 días), lenta (más de 14 días hasta 6 meses).

-Sensibilidad/especificidad.

-Tiempo desde la aparición de la enfermedad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MICROAGLUTINACIÓN (MAT)

Según lo analizado en la bibliografía consultada, se observó que la MAT referida a cuestiones de bioseguridad, presenta riesgo de infección para el personal, debido a la necesidad de utilizar microorganismos vivos y al requerimiento del mantenimiento de cultivos de todas las serovariedades a ser utilizadas (Chiani, 2013; Guerra, 2013; Godinez Santos, 2013; Busson, 2018).

También se halló como desventaja, que presenta reacciones cruzadas, debido a la existencia de antígenos compartidos entre los diferentes serogrupos (Chiani, 2013; Montesdeoca Castillo, 2017). Es necesario verificar periódicamente cada serovariedad para descartar la posibilidad de contaminaciones cruzadas entre los antígenos (Sykes *et al.*, 2010; Chiani, 2013).

En cuanto a su interpretación es algo subjetiva y requiere conocimientos técnicos considerables (Vanasco *et al.*, 2007; Sykes *et al.*, 2010; Chiani, 2013; Guerra, 2013; Sepúlveda Quintero, 2017; Busson, 2018). Los cultivos pueden contaminarse con el paso del tiempo (Sykes *et al.*, 2010).

Otro dato importante a considerar, son las variaciones en la interpretación de los resultados entre laboratorios que realizan la MAT. Además, pueden producirse falsos negativos si el serovar infectante no está incluido en el panel de serovares utilizados para realizar la prueba (Sykes *et al.*, 2010).

En el pasado, el serogrupo con el título más alto se interpretaba como el serogrupo infectante, sin embargo, pueden producirse títulos más altos de reacción cruzada a un serovar que no es el infectivo (Sykes *et al.*, 2010; Godinez Santos, 2013).

Además, se evidenció que en las primeras semanas de enfermedad, las reacciones cruzadas heterólogas con otros serovares pueden ser más fuertes que la reacción homóloga con el serovar infectante. Puede ocurrir que una reacción heteróloga sea positiva y la reacción homóloga negativa, a esto se le llama “reacción paradójica” (Godinez Santos, 2013; Moldes, 2017).

Estas reacciones paradójicas son especialmente comunes en la infección temprana y cuando varios serovares circulan dentro de la población. Se ha demostrado que la identidad predicha del serogrupo infectante cambia a lo largo del curso de la infección en perros (Sykes *et*

al., 2010). El título de anticuerpos de reacción cruzada tiende a disminuir después de algunos meses, mientras que los anticuerpos serogrupo y serovar específicos pueden persistir hasta años (Godínez Santos, 2013). En perros, el serogrupo con el título más alto también varía dependiendo del laboratorio que realice la MAT, lo que refleja la falta de estandarización del ensayo (Sykes *et al.*, 2010).

Por lo tanto, la MAT no se recomienda para predecir los serogrupos que circulan en la población (Sykes *et al.*, 2010). Tampoco es útil para identificar los serovares involucrados en la enfermedad (Meny *et al.*, 2014; Montesdeoca Castillo, 2017).

En cambio, se recomiendan estudios con aislamiento de leptospiras para fines epidemiológicos, así como para la selección de antígenos para el desarrollo del ensayo diagnóstico y el diseño de vacuna (Sykes *et al.*, 2010).

La MAT es la técnica respecto a la cual se comparan las demás técnicas desarrolladas, evaluándose y comparándose mediante la sensibilidad y especificidad diagnóstica. Presenta mayor sensibilidad y especificidad que los métodos diagnósticos de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta (Silva y Riedemann, 2007).

Es una prueba altamente específica, pero su sensibilidad es limitada durante la fase aguda ya que los anticuerpos son detectables a partir de los 7-10 días luego de la aparición de los síntomas, lo cual retarda el diagnóstico y tratamiento (Vanasco *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2008).

La MAT en casos de leptospirosis crónica presenta menor capacidad diagnóstica, ya que en esta etapa los anticuerpos son muy bajos y además no se observaría una seroconversión en las muestras pareadas. Es por ello, que en casos crónicos la observación en campo oscuro, la impregnación argéntica y la inmunohistoquímica podrían resultar más sensibles que la técnica de aglutinación microscópica (Velasco-Castrejón *et al.*, 2007). Otro inconveniente es que no distingue anticuerpos vacunales de los causados por la enfermedad (Busson, 2018).

En un trabajo que compara la sensibilidad de la MAT con otros métodos de diagnóstico, en cuatro grupos de personas con diagnóstico de leptospirosis, se constató que la MAT obtuvo una sensibilidad alta, que varió significativamente entre los grupos de 86.9%, 85.7%, 91.0% y 96.2% y que la sensibilidad del diagnóstico alcanza el 100% al combinarse con cultivos como método de confirmación. Sin embargo, las pruebas fueron reevaluadas mediante la utilización de

modelos de clase latente bayesianos, y la sensibilidad de la MAT disminuyó a 49.8% y la especificidad a 98.8% (Limmathurotsakul *et al.*, 2012).

En otros trabajos, se encontró una sensibilidad hasta del 92% y una especificidad hasta del 95% en humanos (Godinez Santos, 2013) y los mismos valores en caninos (Medrano Galarza *et al.*, 2011; Busson, 2018).

TEST DE MACROAGLUTINACIÓN O ANTÍGENO TERMORESISTENTE (TR)

Es una técnica poco estudiada en caninos (Chiani, 2013). La ventaja de esta técnica es su rapidez y facilidad de ejecución. Además, es una técnica segura debido a que los antígenos utilizados son previamente inactivados por calor (Chiani, 2013; Moldes, 2017).

Presenta como desventajas que se requiere el uso de muestras límpidas y bien conservadas, se debe realizar la estandarización del reactivo, debido a la difícil producción del mismo, tanto entre laboratorios como en el mismo laboratorio, sumado a que la interpretación de resultados es subjetiva (Chiani, 2013; Moldes, 2017).

Además, otra desventaja hallada, es que algunos estudios describen la obtención de falsos negativos y positivos (Chiani, 2013) y no permite determinar el serovar (INTA, 2014).

Algunos trabajos realizados en caninos, muestran resultados de sensibilidad y especificidad dispares, como por ejemplo Lilenbaum *et al.* (2002) registraron una sensibilidad del 94.3% y una especificidad de 91.7% y Chiani (2013) obtuvo una sensibilidad de 70.59% y especificidad de 76.73%. La baja sensibilidad y especificidad encontradas por este último autor, concuerdan con los resultados hallados por otros autores (Banfi *et al.*, 1984; Regalado Segui *et al.*, 1990; Levett, 2007).

En un estudio realizado por Seijo y Mazzonelli (1993) se obtuvo una sensibilidad global del TR respecto a la MAT de 97.7% y, al excluir las MAT positivas por anticuerpos residuales se obtuvo una sensibilidad del 99% y una especificidad del 99.4%.

CULTIVO

El cultivo detecta leptospiras patógenas y posee una potencial utilidad en el curso temprano de la infección, cuando las pruebas que ponen en evidencia anticuerpos son frecuentemente negativas (Sykes *et al.*, 2010). También puede confirmar una infección activa en

animales con test de anticuerpos positivos que poseen historial de vacunación para leptospirosis (Sykes *et al.*, 2010).

Podría detectar infección en perros con falla renal o hepática crónica, casos en los cuales la MAT no detectaría una seroconversión en las muestras pareadas (Sykes *et al.*, 2010).

El cultivo presenta sus limitaciones. Tiene baja sensibilidad; solo se logran aislamientos en el 50% de los casos (Vanasco *et al.*, 2007; Silva y Riedenmann, 2007; Sedano *et al.*, 2015).

Existen pocos estudios que evalúen la MAT frente al cultivo en cuanto a sensibilidad y especificidad. Uno de ellos fue realizado por Cumberland *et al.* (1999), quien 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. En otro estudio realizado por Limmathurotsakul *et al.* (2012), se halló una sensibilidad de la MAT de 49,8% y para el cultivo una sensibilidad del 10,5%; y la especificidad fue del 98,9% para la MAT y del 100% para el cultivo.

En un estudio al comparar los hallazgos previos positivos a la MAT con el cultivo a partir de tejido renal, se obtuvieron los siguientes resultados. El método de aislamiento presentó una sensibilidad del 0% y una especificidad del 100% relativo a la MAT, no se observó concordancia entre estos dos métodos, ya que no se logró obtener ningún aislamiento (Silva y Riedenmann; 2007), otro autor por el contrario, indica que la sensibilidad del cultivo no supera el 20% (Chiani, 2013).

La baja sensibilidad del hemocultivo se debe principalmente a que las leptospiras solo están presentes en sangre durante la primera semana de la enfermedad (Limmathurotsakul *et al.*, 2012).

Es común que se presente contaminación por hongos u otros saprófitos, lo que hace que el cultivo sea laborioso y no siempre exitoso (Silva y Riedenmann, 2007; Sykes *et al.*, 2010). Además, requiere un medio especial y el crecimiento es lento, con un periodo de incubación de 3 a 6 meses, por lo cual no es útil para un diagnóstico temprano (Sykes *et al.*, 2010; Moldes, 2017).

En cuanto a costos, el cultivo es más costoso comparándolo con las pruebas serológicas, además de ser esta última más rápida y sencilla (Pérez Elias *et al.*, 2015).

PCR

Ofrece alta sensibilidad y especificidad, pero se limita a laboratorios de mediana y alta complejidad (Brihuega *et al.*, 2017).

Es una técnica muy útil para diagnosticar leptospirosis en las fases iniciales de la enfermedad. Resultados negativos no descartan leptospirosis, porque podría ocurrir que el número de microorganismos sea muy pequeño, u otros factores, como inhibidores de PCR (Sykes *et al.*, 2010; Chiani, 2013). Además, es una prueba muy susceptible a contaminaciones con ADN exógeno, lo que puede dar falsos positivos (Chiani, 2013).

Actualmente se utiliza el PCR real time, que realiza amplificación y detección simultáneamente. Esto presenta algunas ventajas comparando el PCR convencional, como es la rapidez, automatización, mayor sensibilidad y especificidad. Además, tiene la capacidad de diferenciar leptospiras patógenas de no patógenas (Chiani, 2013).

Si bien el PCR real time posee gran sensibilidad y especificidad, ya que algunos detectan género y especie en menos de tres horas, tiene la desventaja de presentar un mayor costo y equipamiento necesario, por lo que pocos laboratorios lo utilizan. Mediante PCR real time no se puede determinar la serovariedad infectante (Chiani, 2013; Godínez Santos, 2013).

Sus principales ventajas consisten en su rapidez y que no requiere que las leptospiras estén viables o que mantengan su integridad morfológica y antigénica (Chiani, 2013).

En los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten determinar la cepa infectante (ARNr 16s, VNTR, MLST) pero son técnicas más complejas que se realizan en pocos laboratorios de investigación (Chiani, 2013).

El valor diagnóstico del PCR es determinado principalmente por su capacidad de confirmar casos en la fase aguda, antes que los anticuerpos sean detectados mediante serología (Cardona *et al.*, 2008). Para lograr un resultado exitoso mediante la utilización de PCR se requiere tomar la muestra durante la primera semana de la aparición de los síntomas y si es posible antes de la terapia con antibióticos (Cardona *et al.*, 2008; Sedano *et al.*, 2015), a diferencia de la MAT en la cual el momento ideal para la toma de muestra es a partir de los 7-10 días de aparecidos los síntomas, cuando los títulos de anticuerpos detectables por la técnica aumentan (Vanasco *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2008).

Un tratamiento reciente con antimicrobianos puede resultar en falsos negativos, tanto para un cultivo como para PCR. Sin embargo, múltiples dosis de antibiótico pueden ser

requeridas antes de que un resultado de PCR de negativo, ya que esta técnica detecta tanto microorganismos viables como no viables (Sykes *et al.*, 2010).

Las pruebas de PCR poseen una especificidad y sensibilidad que puede variar entre un 50% y 90% (Chiani, 2013).

En un estudio realizado en humanos, con infección reciente, la sensibilidad del PCR en suero fue del 22% y en orina del 44%, en ambos tipos de muestra la especificidad fue del 100%. La menor sensibilidad en suero puede deberse al efecto de agentes inhibidores o a la ausencia de leptospiras en las muestras, ya sea por una leptospiremia corta o por no haber tomado la muestra en la fase más adecuada (Cardona *et al.*, 2008).

La sensibilidad del PCR combinando suero y orina fue del 55% (Cardona *et al.*, 2008), contrario a lo hallado por Céspedes *et al.*, (2007) quien informó que el PCR en orina fue poco sensible para detectar leptospirosis.

En el estudio realizado por Cardona *et al.*, (2008) también fue realizada la MAT, y se evidenció que aquellos casos que dieron negativos (43), resultaron positivos a leptospiras por PCR en 14 muestras de orina y en 12 muestras de suero.

En otro estudio realizado en humanos, se obtuvo un 100% de sensibilidad con PCR en sangre antes de los primeros ocho días de enfermedad, detectando más casos que la MAT o ELISA evaluados en forma individual o conjunta (Céspedes *et al.*, 2007).

Esto es distinto, en muestras evaluadas a los ocho o más días de enfermedad, donde la sensibilidad disminuye al 30% (Céspedes *et al.*, 2007), contrario a la MAT, la cual a partir de los ocho días es capaz de detectar anticuerpos (Vanasco *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2008).

La especificidad es muy buena independientemente del tiempo de enfermedad del paciente (Céspedes *et al.*, 2007).

ELISA

Se considera más sensible que la MAT, es fácil de estandarizar, los antígenos pueden mantenerse estabilizados durante meses y no presenta riesgo para los técnicos (Godinez Santos, 2013).

Presentan mucha sensibilidad, pero carece de la especificidad de la MAT (INTA, 2014; Brihuega, 2017).

La detección de IgM en una sola muestra es confirmatoria de una infección reciente (Godinez Santos, 2013; Busson, 2018). Sin embargo, todo resultado positivo con ELISA debe ser confirmado mediante la MAT (Moldes, 2017).

Al igual que la MAT, no diferencia anticuerpos vacunales de los propios de la enfermedad. En perros vacunados, en general se detectan títulos altos de IgG y bajos o nulos de IgM (Busson, 2018).

Las técnicas de ELISA solo detectan anticuerpos género específicos y no son útiles para la identificación de serogrupo o serovar (Chiani, 2013).

Son técnicas sencillas de realizar, seguras, fáciles de automatizar y útiles para evaluar muchas muestras en poco tiempo (Chiani, 2013).

El uso de test de anticuerpos rápidos como prueba de detección antes de realizar la MAT, puede ayudar a disminuir los falsos negativos relacionados con la inclusión de serovares inadecuados en esta técnica (Sykes *et al.*, 2010). Incluso, en laboratorios donde no se realiza la MAT, un resultado de ELISA puede adelantar el diagnóstico presuntivo (Chiani, 2013).

Los ELISAs detectan anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes, y estos últimos no son detectados por la MAT (Chiani, 2013).

Los ELISAs desarrollados para caninos, mostraron diferentes sensibilidades y especificidades. Mediante la utilización de antígenos calentados o extractos crudos mostraron una sensibilidad de 100% y especificidad de 95.6%, al utilizar proteínas recombinantes como antígenos se obtuvieron sensibilidades y especificidades del 96.9 y 97.08% respectivamente para la LipL32 y del 84.5% y 77% respectivamente para el antígeno recombinante del gen Lig A y B (Chiani, 2013).

En el trabajo desarrollado por Hartleben *et al.* (2013) se indica que la sensibilidad y especificidad de un ELISA rLipL32 para leptospirosis porcina fue de 100% y 85.1% respectivamente, similar a lo informado por Joseph *et al.* (2012) al emplear ELISA rLipL21 para la detección de leptospirosis bovina quien obtuvo una sensibilidad 100% y especificidad 97%.

Se ha comparado la MAT con un Dot-ELISA que detecta anticuerpos en suero, y se obtuvieron resultados de 91.2% de sensibilidad y 81.3% de especificidad frente a la MAT (Medrano Galarza *et al.*, 2011).

INMUNOFLUORESCENCIA

Es una técnica segura ya que no requiere el uso de bacterias viables en la etapa de ejecución de la técnica y en la lectura de los resultados. Además, ofrece comodidad ya que se requiere una sola muestra de suero y se obtienen resultados tan solo en 3-4 horas (Meny *et al.*, 2014).

Como desventajas, se necesita un microscopio de fluorescencia (luz ultravioleta) y un observador avanzado para no confundir el diagnóstico (INTA, 2014; Meny *et al.*, 2014; Brihuega *et al.*, 2017).

Los anticuerpos obtenidos para la realización de la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) no son serovares específicos (Silva y Riedemann; 2007; Meny *et al.*, 2014). Otra desventaja encontrada es que un resultado negativo no descarta la infección, por lo que es necesario analizar una segunda muestra mediante la MAT para confirmar o descartar la enfermedad (Meny *et al.*, 2014).

En un estudio donde se compara la IFI y la MAT, se analizaron 161 muestras de las cuales 97 fueron positivas a la MAT. De esas 97 muestras, 51 tuvieron resultados negativos en la primera muestra observándose seroconversión en la segunda. En este grupo se registró que 32 muestras dieron positivas a la IF IgM, con una sensibilidad de 79% y una especificidad de 100% en fase aguda en sueros (Meny *et al.*, 2014).

Los resultados de Meny *et al.* (2014) demuestran que la IF-IgM es una herramienta útil para el diagnóstico temprano de leptospirosis.

En comparación con la MAT, es una técnica rápida y de fácil ejecución. Es una prueba útil para definir el diagnóstico y tomar una decisión terapéutica cuando el resultado es positivo en la primer toma de muestra (Meny *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Silva y Riedemann (2007), se comparó las técnicas MAT, cultivo e IFI en 50 caninos. Se obtuvo que 7 muestras resultaron positivas a la MAT y de esas, 5 resultaron positivas a la IFI y ninguna al cultivo. En relación a la IFI, al ser comparada con la MAT, el método de IFI presentó sensibilidad de 57.1% y especificidad de 97.7%, observándose una concordancia del 62.3% (Silva y Riedemann, 2007).

EXAMEN DIRECTO EN CAMPO OSCURO

Su principal ventaja es la sencillez y rapidez con la que se obtiene un diagnóstico presuntivo. Las principales desventajas son su baja sensibilidad, debido a que son necesarias 10^4 leptospiras por ml de muestra para poder ser detectadas (Chiani, 2013).

Presenta también baja especificidad, debido a la dificultad de reconocer las leptospiras y a la ocurrencia de falsos positivos con frecuencia, debido a que algunos artefactos presentes en las muestras como proteínas plasmáticas, fibrina y residuos tisulares son difíciles de distinguir de las leptospiras, por lo que es una técnica útil para quienes tienen considerable experiencia observando leptospiras (Chiani, 2013; Godinez Santos, 2013).

Esta técnica no aporta un diagnóstico definitivo ni puede descartar la leptospirosis en un diagnóstico diferencial (Chiani, 2013), es por esto que debe ser siempre confirmada con otras pruebas (Godinez Santos, 2013).

5. CONCLUSIÓN

El diagnóstico clínico de la leptospirosis sigue siendo difícil para el médico veterinario, debido al amplio rango de sintomatología, que muchas veces ocasiona que sea confundida con otras enfermedades y aunque el clínico sospeche de la enfermedad, confirmarlo mediante el laboratorio es complicado, sobre todo si las técnicas no son utilizadas en el momento oportuno.

Es necesario que el veterinario clínico conozca las distintas pruebas diagnósticas disponibles y las utilice de forma adecuada, dependiendo de la etapa de la enfermedad en la que el paciente se encuentre, para así obtener un diagnóstico definitivo e instaurar el tratamiento específico, aumentando la probabilidad de recuperación del paciente.

De lo analizado en las distintas bibliografías consultadas, actualmente ninguna técnica reemplaza al uso de la MAT, aunque algunas presentan ventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad, como el PCR, pero necesita de infraestructura que limita su uso a laboratorios especializados. Otro ejemplo, es el cultivo que si bien es una prueba que confirma el diagnóstico cuando se aísla el agente y la muestra puede ser tomada en etapa aguda de la enfermedad, presenta la desventaja del tiempo de demora en obtener el resultado.

Sin embargo, la MAT disminuye su especificidad en cuadros crónicos de la enfermedad, por lo tanto, en estas situaciones se podría combinar con otras técnicas como son cultivo, PCR, ELISA, inmunofluorescencia y observación en campo oscuro.

Se considera importante concluir que la combinación de distintas técnicas, permite aumentar los parámetros de sensibilidad y especificidad. Algunas combinaciones factibles de técnicas a utilizar podrían ser la observación en campo oscuro y MAT; cultivo y MAT; PCR en orina y PCR en suero; Elisa y MAT; e IF y MAT.

A pesar de que la MAT es una técnica que requiere mantenimiento del cepario, un procedimiento laborioso y además en algunas ocasiones requiere tomar muestras pareadas del paciente, sigue siendo la técnica necesaria para confirmar o descartar el diagnóstico de leptospirosis.

6. BIBLIOGRAFÍA

ACHA, P.N. y B. SZYFRES. 2001. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Volumen 1. Bacteriosis y micosis. 3° edición. Washington, EUA. 398 p.

ALEGRE, E.A.; M.B. DE BIASIO; N.N. RAMÍREZ; R.M. RUIZ; C.E. BASTIANI. 2013. Detección y diferenciación molecular de *Leptospira sp.* utilizando diferentes técnicas de extracción de ADN. *Rev vet.* 24(1): 53-55.

ARENCIBIA ARREBOLA, D.F.; N. BATISTA SANTIESTEBAN; L.A. ROSARIO FERNÁNDEZ; K. BLAIN TORRES; R.L. SOLÍS RODRÍGUEZ. 2010. Factibilidad de la utilización del ASE en el ensayo de HAI en el diagnóstico rápido de Leptospirosis en los animales. *Vet Arg.* 27(268): 1-14.

AVMA. 2011. Leptospirosis en perros y gatos. *AVMA*. Illinois, EEUU. En: https://ebusiness.avma.org/files/productdownloads/Lepto_Sp.pdf

AZÓCAR-AEODA, L.; H.L. SMITSB; G. MONTI. 2014. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. *Arch Med Vet.* 46(1): 337-348.

BANFI, E.; M. CINCO; S. DELIA; L. CASTAGNARI; V. VULLO; C.M. MASTRIANNI; C. CONTINI. 1984. New trends in the Rapid Serodiagnosis of Leptospirosis. *Zbl Bakt Hyg.* 257(4): 503-507.

BERDASQUERA-CORCHO, D. 2007. Factores Climáticos y Transmisión de la Leptospirosis en Cuba. *Rev Biomed.* 18(1): 77-78.

BRIHUEGA, B. 2008. Leptospirosis: diagnóstico y tipificación. Temas de Zoonosis IV. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. 221-227.

BRIHUEGA, B.; M.G. DRAGHI; M.I. FARACE; F. FRANCOIS; A. KOVAL; J. PETRAKOVSKY Y M. TEALDO. 2017. *Informe sobre Leptospirosis*. Comisión científica de Leptospirosis de la AAVLD. Buenos Aires, Argentina. 72 p.

BRIHUEGA, B.; M.G. DRAGHI; M.I. FARACE; F. FRANCOIS; A. KOVAL; J. PETRAKOVSKY Y M. TEALDO. 2018. Actualización de la taxonomía del género *Leptospira* spp. Tipificación según su virulencia. Comisión Científica de Leptospirosis. XXII reunión de la AAVLD, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

BUSSON, S.A. 2018. *Leptospirosis canina: el camino hacia la insuficiencia renal crónica*. Trabajo final de grado para optar el título de médico veterinario. Universidad Nacional de Río Negro, Río Negro, Argentina. 42 p.

CARDONA, M.N.; R.M.M. MOROS; E.A. LÓPEZ; J.L. PÉREZ; R.C. HERNÁNDEZ. 2008. Diagnóstico de leptospirosis mediante la PCR en pacientes con síndrome febril icterohemorrágico. *RSVM*. 28(1): 24-30.

CDC. 2014. Leptospirosis. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, USA. En: <http://www.cdc.gov/leptospirosis/>. Consultado: 02-01-2017.

CÉSPEDES, M. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. *Rev Peru Med Exp*. 22(4): 290-307.

CÉSPEDES, M.; R. TAPIA; L. BALDA; D. GONZALEZ; C. PERALTA; P. CONDORI. 2007. Estandarización y validación de una prueba de Pcr para el diagnóstico precoz de leptospirosis humana. *Rev Peru Med Exp*. 24(1): 20-26.

CHAVARRÍA JOYA, L.; D.L. GUTIÉRREZ; W. MÉNDEZ HURTADO; J. MOSCOSO GAMA. 2015. *Leptospira*: revisión del agente causal de una enfermedad zoonótica. *Biociencias*. 10(2): 65-80.

CHIANI, J. 2013.: *Desarrollo y validación de técnicas diagnósticas de leptospirosis canina*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Argentina. 112 p.

COSTA, F.; M.S. MARTINEZ SILVEIRA; J.E. HAGAN; R.A. HARTSKEERL; M.G. REIS; A.I. KO. 2012. Surveillance for leptospirosis in the Americas, 1996–2005: a review of data from ministries of health. *Rev Panam Salud Pública*. 32(3): 169–77.

CRODA, J.; J.G.R. RAMOS; J. MATSUNAGA; A. QUEIROZ; A. HOMMA; L.W. RILEY; D.A. HAAKE; M.G. REIS; A.I. KO. 2007. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *JCM*. 45(5): 1528-1534.

CUMBERLAND, P. C.; C.O.R. EVERARD; P.N. LEVETT. 1999. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 61(5): 731–734.

ETTINGER, S.J. Y E.C. FELDMAN. 2002. *Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato.* Vol. I y II. 5ta ed. Ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina.

GARCÍA, L.; D. FERAUDL; S. LUGOLL; H. MACHADOLL; M.A. ABELEDO. 2014. Comparación entre un ELISA indirecto y la técnica de aglutinación microscópica para la detección de anticuerpos antileptospirales en caninos. *Rev Salud Anim.* 36(2): 118-123.

GODINEZ SANTOS, J. 2013. *Manual de diagnóstico microbiológico de Leptospira Interrogans.* Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México. Zaragoza, España. 175p.

GREENE, C.E. 2008. *Enfermedades Infecciosas del Perro y el Gato.* Vol. 1, 3ra ed. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina.

GUALTIERI, C.A.S.; C. CARLÍN; L. PERALTA; C. PEIRONE; V. GATTARELLO; L. MARC; H. MOLTENI; M.B. ARESTEGUI; S. FRANÇOIS. 2013. Evaluación clínica, bioquímica y hematológica de caninos seropositivos a distintos serovares de *Leptospira interrogans.* *In Vet.* 14(2): 131-139.

GUERRA, M.A. 2013. Leptospirosis: Public health perspectives. *Biologicals.* 41(5): 295-297.

HARTLEBEN, C.P.; F.M. LEAL; L.G. MONTE; D.D. HARTWIG; F.K. SEIXAS; S.A. VASCONCELLOS; B. BRIHUEGA; O.A. DELLAGOSTIN. 2013. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. *Curr Microbiol.* 66(2): 106–109.

HARTSKEERL, R.A.; M. COLLARES PEREIRA; W.A. ELLIS. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 17(4): 494-501.

HERNÁNDEZ RIVERA, J.C.H.; J.R. PANIAGUA SIERRA; L. SERRANO ALEJANDRI; M.J. PÉREZ LÓPEZ; M, SALAZAR MENDOZA. 2017. Leptospirosis con daño renal irreversible, reporte de caso y revisión de la literatura. *Gac Med Bilbao.* 114(3): 114-117.

INTA. 2014. *Curso teórico práctico de epidemiología y diagnóstico de leptospirosis*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina.

JOSEPH, S.; N. THOMAS; E. THANGAPANDIAN; V.P. SINGH; R. VERMA; S.K. SRIVASTAVA. 2012. Evaluation and comparison of native and recombinant LipL21 protein-based ELISAs for diagnosis of bovine leptospirosis. *J Vet Sci*. 13(1): 99–101.

LEVETT, P.N. 2007. Sequence-Based Typing of *Leptospira*: Epidemiology in the Genomic era. *PLoS Negl Trop Dis*. 1(2): 120-121.

LIMMATHUROTSAKUL, D.; E.L. TURNER; V. WUTHIEKANUN; J. THAI PADUNGPANIT; Y. SUPUTTAMONGKOL; W. CHIERAKUL; L.D. SMYTHE; N.P.J. DAY; B. COOPER; S.J. PEACOCK. 2012. Fool's Gold: Why Imperfect Reference Tests Are Undermining the Evaluation of Novel Diagnostics: A Reevaluation of 5 Diagnostic Tests for Leptospirosis. *Clin Infect Dis*. 55(3): 322–331.

LUNA, A.M.A.; C.L.P. MOLES; R.D. GAVALDÓN; V. NAVA; G.F. SALAZAR. 2008. La Leptospirosis Canina y su Problemática en México. *Rev Salud Anim*. 30(1): 1-11.

MADIGAN, M.T.; J.M. MARTINKO; J. PARKER. 2009. **Brock. Biología de los Microorganismos**. 12da ed. Ed. Prentice Hall Pearson Education.

MARTIN, P.L. 2018. *Diagnóstico de leptospirosis canina mediante una técnica de PCR en tiempo real*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina. 110 p.

MEDRANO GALARZA, C.; C.A. DÍAZ ROJAS; E.A. DALMAU BARROS. 2011. Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá. *Rev Med Vet*. (21): 133-145.

MENY, P.; E. HERNÁNDEZ; F. SCHELOTTO; G. VARELA. 2014. Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IF-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis. *Rev Méd Urug*. 30(2): 88-92.

MOLDES, S.R. 2017. *Estudio seroepidemiológico de leptospirosis canina en el Partido de Lomas de Zamora*. Trabajo final integrador. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 28 p.

MONTESDEOCA CASTILLO, E.N. 2017. “*Diagnóstico, aplicación y evaluación de un plan sanitario para enfermedades infecciosas reproductivas (Brucelosis y Leptospirosis) en cabras y ovejas de la hacienda Tunshi*”. Trabajo Final de Grado. Rio Bamba, Ecuador.73 p.

MORAL, M. 2014. *Enfermedades infecciosas: Leptospirosis, diagnóstico de leptospirosis*. Guia para el equipo de salud Nro 9. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires, Argentina. 49 p.

MURUGESAN, K.; S. SANTHANAM; A. KUMARASAMY; N. KALIMUTHUSAMY. 2014. B-Cell-Specific Peptides of *Leptospira interrogans* LigA for Diagnosis of Patients with Acute Leptospirosis. *CVI*. 21(3): 354 –359.

NELSON, R.W. y C.G. COUTO. 2010. *Medicina Interna de Animales Pequeños*. Vol. 2, 4ta ed. Ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina.

NINGAL, S.P.; M.B. KOTHULE; N.Y. JADHAV; S.D. KADAM; Y.S. KATARE; S.A. HAPSE. 2015. A Review on Leptospirosis. *World J Pharm Pharm Sci*. 4(09): 1531-1543.

OIE. 2008. *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. World Organization for Animal Health.París, Francia.

OMS. 2008. *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. Organización Mundial de la Salud. Rio de Janeiro, Brasil. 127p.

PÉREZ ELIAS, Y.; A.M. OBREGÓN FUENTES; I. DEL C. RODRÍGUEZ REYES; M.J. ALFONSO GONZÁLEZ. 2015. Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Rev Cub Med Mil*. 44(4): 416-427.

REGALADO SEGUI, J.D.; C. LOPEZ ACOSTA; P. PEDROSO PEÑA; L.R. RAMOS PEREZ. 1990. Serologic study of patients with leptospirosis using TR antigen. *Rev Cubana Med Trop*. 42(2): 208-218.

ROMERO-VIVAS, C.M. y A.K. FALCONAR. 2016. *Leptospira* spp. y Leptospirosis Humana. *Salud Uninorte*. 32(1): 123-143.

ROSARIO FERNÁNDEZ, L.A.; D.F. ARENCIBIA ARREBOLA; N. BATISTA SANTIESTEBAN; W. JIRÓN TORUÑO; B.Y. VALDÉS ABREÚ; Y.E. SUÁREZ

FERNÁNDEZ; J.F. INFANTE BOURZAC. 2012. Leptospirosis, una revisión actualizada. En: www.produccion-animal.com.ar. Consultado: 15-06-2018

SÁNCHEZ, I.; W. BELLO; K. ESPAÑA; P. LEON; O. ORTIZ; R. OSORIO; R. TRECO. 2017. Identificación de *Leptospira* serovariedad *Icterohaemorrhagiae* en un paciente canino con enfermedad renal en el municipio de Florencia – Caquetá, Colombia: descripción de un caso clínico. *Rev Electrón vet.* 18(10): 1-8.

SCHUST, M. V.; L.E. SAMARTINO; G. ROMERO; C. AUTERI; B.F. BRIHUEGA. 2011. *Acreditación de la técnica MAT para la determinación de leptospirosis*. Iberolab, VI congreso virtual iberoamericano sobre gestión de calidad en laboratorios.

SEDANO, A.; J. PINTO; J. SIUCE; S. CALLE. 2015. Estandarización de una Técnica de PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan para la Detección de *Leptospira* spp Patógenas en Orina de Canes Domésticos. *Rev Inv Vet Perú.* 27(1): 158-168.

SEIJO, A.C. y J. MAZZONELLI. 1993. Evaluación del antígeno termorresistente en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *ABCL.* 27(4):487-491.

SEPÚLVEDA QUINTERO, G.L. 2017. *Situación actual de Leptospirosis en humanos, caninos y fauna silvestre de Latinoamérica*. Trabajo Final de Grado Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. 24 p.

SILVA, R.F. y S. RIEDEMANN. 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): 268-274.

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

TORRES CASTRO, M.; S. HERNÁNDEZ BETANCOURT; P. AGUDELO FLÓREZ; E. ARROYAVE SIERRA; J. ZAVALA CASTRO; F. PUERTO. 2015. Revisión actual de la epidemiología de la Leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 54(5): 620-625.

TROYANO, L.; D. AMIN; G. BAGNIS; C. VISSIO; A. CHANIQUE; V. MARTIN. 2017. Leptospirosis canina: descripción del primer caso clínico en “El Cerrito”. *Rev Electrón vet.* 18(11): 1-11.

VANASCO, N.B.; J. LOTTESBERGER; M.F. SCHMELING; I.A. GARDNER; H.D. TARABLA. 2007. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. *Rev Panam Salud Pública.* 21(6):388–395.

VANASCO, N.B.; M.F. SCHMELING; Y. CHIANI; J. LOTTESBERGER; H.D. TARABLA. 2012. Diagnóstico de leptospirosis humana: evaluación de la aglutinación macroscópica en diferentes etapas de la enfermedad. *Salud Públ Méx.* 54(5): 530-536.

VELASCO-CASTREJÓN, O.; B. RIVAS SÁNCHEZ; J. ESPINOZA HERNÁNDEZ; E. MARTÍNEZ HERNÁNDEZ. 2007. Diagnóstico de leptospirosis crónica, comparación entre la aglutinación microscópica y 3 técnicas diagnósticas confirmatorias. *Rev cubana med trop* 59(1): 8-13.

YE, C.; W. YAN; P.L. MCDONOUGH; S.P. MCDONOUGH; H. MOHAMED; T.J. DIVERS; Y.F. CHANG; Z. YANG. 2014. Serodiagnosis of Equine Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Four Recombinant Protein Markers. *CVI.* 21(4): 478-483.

ZUNINO, E. y R. PIZARRO. 2007. Leptospirosis: puesta al día. *Rev Chil Infect.* 24(3): 220-226.