



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

TESIS DOCTORAL

**DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS CANINA MEDIANTE UNA
TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL**

Autor: Méd. Vet. Martin Paula Lorena

Director: Dr. Stanchi Nestor Oscar

Codirector: Dra. Arauz María Sandra

Lugar de trabajo

**Servicio Central de Laboratorio del Hospital Escuela,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata**

Año 2018

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Tarabla Héctor Dante

Dr. Sguazza Guillermo Hernán

Dra. Brihuega Bibiana Felicitas

A mis padres Stella y Daniel

A mis hermanos Gabi, Pablo, Gisela y cuñado Pablo

A mis sobrinos Fermín y Joaquín

A mis mascotas Uruk y Peque y a las leptospiras

A mi Director Nestor Stanchi por su perseverancia a través de los años y a pesar de las dificultades que presenta, de crear un área de diagnóstico de leptospirosis y por depositar en mí la confianza para llevarlo adelante. Por transmitirme todos los conocimientos y experiencias para actuar o solucionar situaciones. Por escuchar y responder a todas mis dudas e inquietudes y por estar siempre presente cuando las cosas se complicaban por ejemplo “en vacaciones”.

A mi codirectora María Sandra Arauz por su deseo continuo de implementar actividades por y para la Facultad el cual permitió que el área de diagnóstico de leptospirosis pudiera crearse. Por representar el mejor ejemplo de combinación de saberes y disposiciones y por enseñarme que todo es posible si uno se lo propone. Por aguantarme cuando me pongo en “modo estresada”, por acompañarme en todos los momentos, a veces hasta largas horas o los fines de semana. Pero sobretodo porque además del crecimiento profesional por los conocimientos teóricos y prácticos brindados, me contagió la fortaleza de mantener ideas o decisiones propias y la fuerza para luchar por los objetivos!

A mis jurados por el valioso aporte que con sus correcciones y sugerencias han permitido enriquecer mis conocimientos en distintas áreas y pulir el resultado final de este trabajo.

A Bibiana, Graciela, Carmelo (Tito) y Silvy del Laboratorio de Patobiología del INTA Castelar por haberme brindado la posibilidad de entrenamiento en su laboratorio, por enseñarme detalladamente los conocimientos sobre el crecimiento y diagnóstico y por su buen recibimiento y apoyo continuo cada vez que necesité ayuda para “mis leptospiras”.

A Mercedes Lojo por haber sido una inspiración para realizar diagnóstico por PCR a través de la pasión con la que dictaba sus teóricos en la Carrera de Microbiología y por su valioso aporte de conocimientos de PCR en tiempo real.

A Lucia, Gerardo, Victoria, Alejandra y Magdalena del IGEVET por enseñarme a dar mis primeros pasos en el desarrollo de la PCR muchas veces interrumpiendo su trabajo.

A Gabriel, Nazarena, Eduardo y Paula del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur por haberme brindado la posibilidad de entrenamiento en diagnóstico molecular, por enseñarme

detalladamente los conocimientos sobre esta técnica, por escuchar mis dudas, por las sugerencias siempre muy productivas y por estar siempre presentes cada vez que lo necesité.

A Julio, Karina, Julián, Diego y Juana del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos por darme la posibilidad de utilizar las instalaciones y equipos, por su ayuda y buen recibimiento cada vez que entro a repicar “mis leptospiros” y por todas las veces que me alentaron a seguir adelante.

A mis compañeros del laboratorio Miguel, Eugenia, Cecilia, Cesar, Lorena por el buen recibimiento que encontré desde el primer día que llegué “para hacer leptospiros”, por ayudarme en el procesamiento de las muestras, por la contención y las palabras de aliento cuando me veían “enloquecer”.

A Florencia, Cecilia (Machi), Santiago y Luca por haberme ayudado en las tareas de diagnóstico de leptospirosis, por cubrirme cada vez que tenía que largar una PCR, escribir o preparar la presentación y por compartir la responsabilidad y el cariño que requieren las leptospiros para crecer!

A Fabio, Walter y Florencia del Laboratorio de Microbiología por su ayuda invaluable en la preparación del medio de cultivo,

A Viviana de Palma, Luciano Casas, Valeria Mogro, por haberme ayudado en la difícil tarea de conseguir muestras de pacientes caninos.

A Estela Bonzo, Alejandra Larsen, Santiago Corva, Francisco Reinaldi, Susana Córdoba y Eduardo Mórtola por su ayuda en la obtención de cepas y análisis estadístico.

A mis amigas y amigos Laura, Eleonora, Romina, Daniela, Martin, Florencia, Jorgelina, Sole, Gabi, Noe porque han estado presentes en cada momento que necesité para brindarme una palabra de contención, para estimularme a seguir adelante cuando me veían “agotada” o preocuparse continuamente si necesitaba algo. A mis amigos y compañeros de tango Ángel, Uli, Tito, Mario, Inés, Stella, Maxi por aguantarme más de una vez hablarles de leptospiros, por la contención y por los felices momentos que me hacen vivir!

A mis padres Stella y Daniel por el esfuerzo que hicieron para que pudiera estudiar, por inculcarme la responsabilidad y la pasión por lo que uno hace y por enseñarme a que en la vida muchas veces se debe empezar desde cero y sin embargo lograr el objetivo!

A mis hermanos Gabi y Pablo y mi sobrino Fermín, mi gemela Gisela, mi cuñado Pablo y mi sobrino Joaquín, por estar siempre presentes, por la ayuda invaluable que recibo cada día, por venir desde lejos muchas veces con lluvia o con frío para ayudarme en lo que necesito y por el amor que me brindan y lo feliz que me hace saber que son mi familia!

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES.....	III
ÍNDICE.....	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	V
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Introducción.....	5
1.2 Etiología.....	6
1.3 Taxonomía y clasificación.....	9
1.4 Epidemiología.....	11
1.5 Patogenia.....	15
1.6 Signos clínicos.....	19
1.7 Inmunidad.....	21
1.8 Diagnóstico.....	21
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
SECCIÓN 1	
Estandarización y validación en una etapa intralaboratorio de la técnica de PCR en tiempo real	
INTRODUCCIÓN.....	32

MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	53
SECCIÓN 2	
Aplicación de la técnica de PCR en tiempo real en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis	
INTRODUCCIÓN.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
RESULTADOS	65
DISCUSIÓN.....	75
CONCLUSIONES.....	84
CONCLUSIONES FINALES.....	86
ANEXO 1.....	87
ANEXO 2.....	90
ANEXO 3.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	93

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

Trabajos presentados en Congresos y Reuniones Científicas

Martin PL, Vicente ME, Meneses ML, Mazzoni S, Vidal D, Arauz MS. Seroprevalencia de leptospirosis en el partido de Punta Indio y factores de riesgo en caninos: resultados preliminares. 2017. XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. IV Jornada Latinoamericana III Jornadas de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNR. Presentación poster oral.

Martin PL, Di Cesare, LGS, Stanchi NO, Arauz MS. Estandarización de una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico de leptospirosis canina. 2017. XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. IV Jornada Latinoamericana III Jornadas de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNR. Presentación poster oral.

Moldes S, Martin PL, Mortola E. Estudio seroepidemiológico de leptospirosis canina en el partido de Lomas de Zamora. Reunión científico técnica. Jujuy. 2016. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Presentación poster.

Martin PL, Molina MC, Stanchi NO, Brihuega BF, Savignone CA, Arauz MS. Detección de *Leptospira spp* en caninos con diagnóstico presuntivo de la enfermedad a través de una PCR punto final. 2016. XVII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. IV Jornada Latinoamericana, II Jornadas de Ciencia y Tecnología. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias Facultad de Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. Presentación poster oral.

Martin PL, Molina MC, Stanchi NO, Corrada Y, Cuelli A, Cobos M, Ozaeta MB, De Palma V, Arauz MS. Prevalencia de leptospirosis en caninos de La Plata. Argentina. 2014. Libro. Resumen. XX Reunión científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico.

Trabajo presentado en Revista con referato

Martin PL, Arauz MS; Stanchi NO. 2015. Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en medicina veterinaria. Rev. Analecta Veterinaria. 35:1:1. 26-38.

Martin PL, Stanchi NO, Brihuega BF, Bonzo E, Galli L, Arauz MS. Diagnosis of canine leptospirosis: evaluation of two PCR assays in comparison with the microagglutination test. Trabajo enviado para su publicación en la revista Pesquisa Veterinária Brasileira (Manuscript ID PVB 5868).

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

µl: microlitro.

µm: micrometro.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALT-GPT: alanino aminotransferasa.

AST-GOT aspartato aminotransferasa

CMHbC: concentración media de la hemoglobina corpuscular.

C_t: del inglés *cycle threshold*

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato.

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EG: equivalente genoma

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FLA: fórmula leucocitaria absoluta.

FLR: fórmula leucocitaria relativa.

g/dl: gramos por decilitros.

GGT: gama glutamil transferasa.

GR: glóbulos rojos.

HbCM: hemoglobina corpuscular media.

IFCC-UV: Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico, método cinético.

IFI: técnicas de Inmunofluorescencia indirecta.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

IPC: del inglés, *Internal Positive Control*

LCR: líquido cefalorraquídeo

LPS: lipopolisacárido

M: molar.

mb: Megabases

MAT: test de microaglutinación

mM: milimolar

mg/ml: miligramos por mililitro

pb: pares de bases.

PME: proteínas de membrana externa.

PBS: solución de buffer fosfato.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

rpm: revoluciones por minuto.

seg: segundo.

spp.: especies individuales dentro de un género.

UI/L: unidad internacional por litro.

VCM: volumen corpuscular medio.

VR: valor de referencia

DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS CANINA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

PALABRAS CLAVES Caninos, Leptospirosis, PCR

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira* que afecta a numerosas especies de animales domésticos y silvestres. El diagnóstico en caninos se realiza demostrando seroconversión en muestras del paciente en el periodo agudo y convaleciente de la enfermedad mediante la prueba de microaglutinación (MAT) no obstante, la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede proporcionar una confirmación temprana de los casos sospechosos. El objetivo de este trabajo fue validar en una etapa intralaboratorio una técnica de PCR en tiempo real (qPCR) que utiliza cebadores dirigidos a un fragmento del gen *lipL32* (*lipL32*-qPCR). Posteriormente se evaluó su utilidad en el diagnóstico, a partir de muestras clínicas de caninos con sospecha de la enfermedad tomando, como referencia la prueba de MAT. La sensibilidad analítica a partir del ADN de cepas de referencia fue de 1×10^0 equivalente genoma/reacción. Al evaluar la especificidad analítica, todas las cepas patógenas fueron correctamente amplificadas mientras que con el ADN de 2 cepas saprófitas y otros microorganismos se obtuvieron resultados negativos. En muestras biológicas contaminadas experimentalmente la sensibilidad analítica fue de 1×10^2 bacterias/ml en sangre, 1×10^3 bacterias/ml en suero y 1×10^1 bacterias/ml en orina. La técnica *lipL32*- qPCR demostró mayor sensibilidad analítica a partir del ADN de cepas de referencia y de las muestras de sangre y orina contaminadas experimentalmente que una técnica de PCR convencional dirigida a un fragmento del gen *rrs* (*rrs*-PCR

convencional), excepto para las muestras de suero en las cuales se obtuvo el mismo valor. En el estudio a campo, se incluyeron un total de 51 caninos con sospecha clínica de la enfermedad. Con la prueba de MAT, 7 de 51 pacientes fueron considerados como casos confirmados. La técnica *lipL32*-qPCR fue positiva en 6 de los siete casos confirmados por MAT y permitió realizar el diagnóstico en dos pacientes seronegativos. Mientras que la técnica *rrs*-PCR convencional sólo detectó 4 de 7 casos confirmados. Al comparar la prueba de MAT y la *lipL32*-qPCR se observó una fuerte concordancia entre ambas (Kappa=0.76, 95 % IC 0.492-1.039). De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que la prueba *lipL32*-qPCR resulta un excelente complemento de la serología en la confirmación de casos sospechosos y permite diagnosticar un mayor porcentaje de caninos verdaderos positivos.

DIAGNOSIS OF CANINE LEPTOSPIROSIS BY A REAL-TIME PCR ASSAY

KEY WORDS Canine; Diagnosis; Leptospirosis; PCR

SUMMARY

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide distribution caused by bacteria of the genus *Leptospira* that affects species of domestic and wild animals. Canine leptospirosis is definitely diagnosed by demonstrating seroconversion in paired serum samples from the acute and convalescent period by the microagglutination test (MAT). However, the application of a polymerase chain reaction (PCR) assay can provide earlier confirmation of suspected cases. The objective of this study was to validate (analytical phase) a real-time PCR assay targeted *lipL32* gene and evaluate its applicability in clinical samples from dogs with presumptive diagnosis of leptospirosis by using the MAT as a reference. The analytical sensitivity of the *lipL32*-qPCR was 1×10^0 genome equivalent per reaction. The *lipL32*-qPCR amplified the pathogenic strains but was negative when evaluating the DNA of saprophytic strains and other microorganisms. The *lipL32* qPCR detected 1×10^2 bacteria/ml in whole blood samples, 1×10^3 bacteria/ml in serum samples and 1×10^1 bacteria/ml in urine samples. The performance of *lipL32* qPCR was compared to a conventional PCR assay targeted *rrs* gene (*rrs*-conventional PCR). The *lipL32*-qPCR demonstrated higher analytical sensitivity from the DNA of reference strains and experimentally contaminated biological samples, except for samples of serum in which the same value was obtained. In the field study, a total of 51 dogs with presumptive diagnosis of leptospirosis were included. Seven out of the 51 samples were considered as confirmed cases by MAT. The *lipL32* real-time PCR detected positive results in six of the seven

confirmed cases whereas the *rrs*-conventional PCR detected four. According to the results obtained, it is concluded that the *lipL32*-qPCR assay is a useful diagnostic tools in the confirmation of canine leptospirosis when used together with the MAT and allows the diagnosis of a higher percentage of true positive canine.

1. Introducción

La leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Leptospira* spp., que afecta a más de 160 especies de animales domésticos y silvestres que pueden padecer una afección de distinta gravedad o actuar como reservorios (Zunino & Pizarro, 2007). La enfermedad fue mencionada por primera vez en la literatura científica-médica en 1886 cuando Adolph Weil describió un tipo particular de ictericia en humanos, acompañada por esplenomegalia, disfunción renal, conjuntivitis y erupción cutánea (Adler, 2015). Desde entonces, la leptospirosis ha permanecido en forma endémica o causando brotes en numerosos países, probablemente debido al amplio espectro de animales que actúan como reservorios de la bacteria (Koizumi y col., 2008; Vanasco y col., 2008; Rahelinirina y col., 2010; Draghi y col., 2011; Paixão Mdos y col., 2014; Koval y col., 2017; Vihol y col., 2017). En este contexto, los caninos juegan un rol importante en la epidemiología de la enfermedad debido a que junto con los roedores, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*, se consideran los principales reservorios de la bacteria en zonas urbanas (Sepúlveda Montes y col., 2002; Brod y col., 2005; Cardona y col., 2010; Benacer y col., 2017). Además, pueden eliminar el microorganismo en la orina contaminando el ambiente sin mostrar signos clínicos de la enfermedad. Este hecho, constituye un problema en la salud pública debido a que aumenta el riesgo de exposición de los humanos (Rojas y col., 2010; Santanna y col., 2017).

La vigilancia de la leptospirosis es importante no sólo desde la salud animal sino también desde una perspectiva de salud pública, sobre todo teniendo en cuenta que es

una enfermedad de notificación obligatoria por Ley N° 15.465 (Régimen Legal de las Enfermedades de Notificación Obligatoria y Resolución 422/2003 del SENASA). Por lo tanto, una de las estrategias de control de la enfermedad es la detección temprana en el hospedador reservorio como también el correcto diagnóstico e inicio del tratamiento en animales enfermos. Es, en este aspecto, donde adquiere importancia el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos para la detección de infecciones clínicas o subclínicas en animales de compañía (Harkin y col., 2003 a,b; Rojas y col., 2010; Fink y col., 2015).

1.2 Etiología

El género *Leptospira* pertenece al orden *Spirochateales* y a la familia *Leptospiraceae*. Dentro de este género se reconocían dos especies, *Leptospira interrogans* que agrupaba las cepas patógenas y *Leptospira biflexa*, que incluía las cepas saprófitas aisladas del medioambiente (Levett, 2001). Sin embargo actualmente a través de técnicas moleculares y estudios filogenéticos se han logrado identificar más especies (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

El término leptospiras procede del griego *leptos* (fino) y del latín *spira* (espiral). Como su nombre lo indica, son bacterias delgadas con forma de espiral y uno o ambos extremos curvados o en forma de gancho. Miden aproximadamente 0,1 µm de diámetro por 6 a 20 µm de longitud. Las especies patógenas aisladas de un hospedador son más cortas y firmemente enrolladas que las cepas que han tenido repetidos pasajes en medios de cultivo o que las especies saprófitas (Faine, 1982; Adler, 2015). Por ser bacterias tan delgadas pueden pasar los filtros que retienen otros microorganismos (0,2 a 0,45 µm) y sólo pueden visualizarse por microscopía de fondo oscuro o de contraste de fase (Faine, 1982; Stanichi, 2007). No se tiñen con facilidad con los colorantes de anilina pero son

fácilmente visibles con tinciones de anticuerpos fluorescentes, tinción de plata de Warthin-Starry o tinción inmunohistoquímica (Faine, 1982, Delgado y col., 2007).

Al microscopio electrónico se observa que están constituidas por una membrana externa o envoltura, una membrana interna y un espacio periplásmico que contiene el peptidoglicano. La membrana externa contiene el lipopolisacárido (LPS) y numerosas lipoproteínas y proteínas transmembrana (Cullen y col., 2004). El LPS de *Leptospira* spp., es estructural e inmunológicamente similar al LPS de los microorganismos gramnegativos sin embargo, posee un potencial endotóxico menor posiblemente relacionado a características particulares del lípido A (Que-Gewirth y col., 2004). Entre las proteínas de membrana externa una proporción considerable está representada por lipoproteínas. Se han descrito varias aunque todavía no se comprende exactamente su rol en la patogenia de la enfermedad. Las OmpL1, LipL 21, LipL 41 y LipL 32 aparecen expuestas en la superficie, mientras que LipL 36 se encuentra en la capa interna de la membrana externa. Otras lipoproteínas descritas son LigA y LigB (Haake y col., 2004). La capa de peptidoglicano al igual que en otras bacterias le otorga la rigidez, forma y solidez no obstante, a diferencia de las bacterias gramnegativas, el peptidoglicano se encuentra más próximo a la membrana citoplasmática que a la membrana externa (Adler, 2015).

Poseen un movimiento activo de rotación y traslación que depende de dos flagelos periplasmáticos. Los mismos se encuentran situados entre la membrana externa y la pared celular, fijos en ambos polos de la bacteria con sus extremos libres extendidos hacia la parte media pero sin superponerse (Stanchi, 2007; Adler, 2015).

Las especies del género *Leptospira* utilizan como principal fuente de energía y carbono la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga (>C15). *L. biflexa* utiliza indistintamente ácidos grasos saturados o insaturados mientras que, *L. interrogans* requiere de ácidos grasos de cadena larga insaturados (sólo en presencia de ácidos

grasos insaturados es capaz de metabolizar ácidos grasos saturados). Debido a la toxicidad inherente de los ácidos grasos el crecimiento de *Leptospira in vitro* requiere de detoxificantes tales como albúmina o complejos sorbitol-ácidos grasos (Tween 80) incorporados en el medio (González y col., 2006). El glicerol añadido al medio de cultivo constituye una fuente de carbono adicional. Los iones de amonio suministrados en forma de sales constituyen la principal fuente de nitrógeno (Adler, 2015). Otros, requerimientos nutricionales incluyen tiamina, biotina (sólo algunas cepas), fosfatos, calcio, magnesio, hierro y vitamina B12. El componente no esencial piruvato de sodio mejora el crecimiento de las cepas fastidiosas (Faine, 1982; Stanchi, 2007).

Los medios de cultivo actualmente utilizados para el desarrollo de *Leptospira* spp., son Fletcher y Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). El crecimiento de los contaminantes de las muestras clínicas puede ser inhibido por la adición de 5-fluorouracilo, gentamicina, ácido nalidíxico o rifampicina (Faine, 1999). El desarrollo en el medio semisólido (0,1-0,2 % de agar) alcanza una densidad máxima en una zona por debajo de la superficie del tubo que se vuelve cada vez más turbia a medida que avanza la incubación. Este crecimiento se relaciona con la tensión óptima de oxígeno y es conocido como anillo o disco de Dinger (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Tanto las especies patógenas como saprófitas crecen en condiciones aeróbicas con un rango de pH de 7,2 a 7,6 y a una temperatura entre 28 a 30 °C. No obstante, sólo las especies saprófitas desarrollan a bajas temperaturas (11 a 13 °C). El tiempo de duplicación para especies patógenas *in vitro* (cuando ya han tenido adaptación al medio de cultivo) se estima en 6-8 horas mientras que cuando son recientemente aisladas de un hospedador se extiende a 14-18 horas con un retraso en el inicio del crecimiento de días o semanas. Por el contrario, las especies saprófitas desarrollan más rápido con un tiempo de duplicación de 4,5 horas (Adler, 2015). Debido al lento crecimiento que exhiben las

especies patógenas se recomienda que los cultivos se incuben por el término de 6 meses antes de considerarlos como negativos (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

1.3 Taxonomía y clasificación

Como fue mencionado, antiguamente el género *Leptospira*, se dividía en dos especies basado en los requerimientos nutricionales y propiedades fenotípicas. De esta manera, *L. biflexa* crece a 13 °C y en presencia del análogo de la purina 8-azaguanina (225 µg/ml), mientras que *L. interrogans* no presenta tales características (Adler, 2015). A su vez, según la clasificación serológica mediante la prueba de absorción-aglutinación cruzada (CAAT, por sus siglas en inglés *Cross Agglutination Absorption Test*), cada una de estas especies se encontraba dividida en serovares según las diferencias antigénicas de los carbohidratos que componen el LPS (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Los serovares que compartían antígenos en común eran agrupados en serogrupos sin embargo, estos no tienen una base taxonómica (Levett, 2004; Greene, 2012). Hasta el momento se han descrito más de 250 serovares para *L. interrogans* agrupados en 24 serogrupos y unos 60 serovares para *L. biflexa* (Rodriguez & Irlene 2011; Schuller y col., 2015).

Actualmente, debido a la aparición de nuevas técnicas moleculares y genéticas la clasificación fenotípica fue reemplazada por una clasificación genotípica basada en estudios del ADN (hibridación ADN-ADN) y en el análisis de secuencia comparativa de la subunidad ARN 16S del ARN ribosómico (16S ARNr) (Cerqueira & Picardeau, 2009). Según esta nueva clasificación se describen 21 especies que incluyen todos los serovares de *L. interrogans sensu lato* y *L. biflexa sensu lato* (Adler, 2015). De acuerdo al estudio filogenético de las especies mencionadas se identifican tres grupos o clados comprendidos por cepas patógenas, intermedias y saprófitas (Figura 1). Asimismo, otros

marcadores taxonómicos utilizados como la secuenciación de los genes *rpoB* (La Scola y col., 2006), *gyrB* (Slack y col., 2006) y *ligB* (Cerqueira y col., 2009) permitieron obtener resultados consistentes con el análisis de secuencia comparativa del 16S ARNr en términos de la agrupación de cepas en estos grupos (Cerqueira y col., 2009).

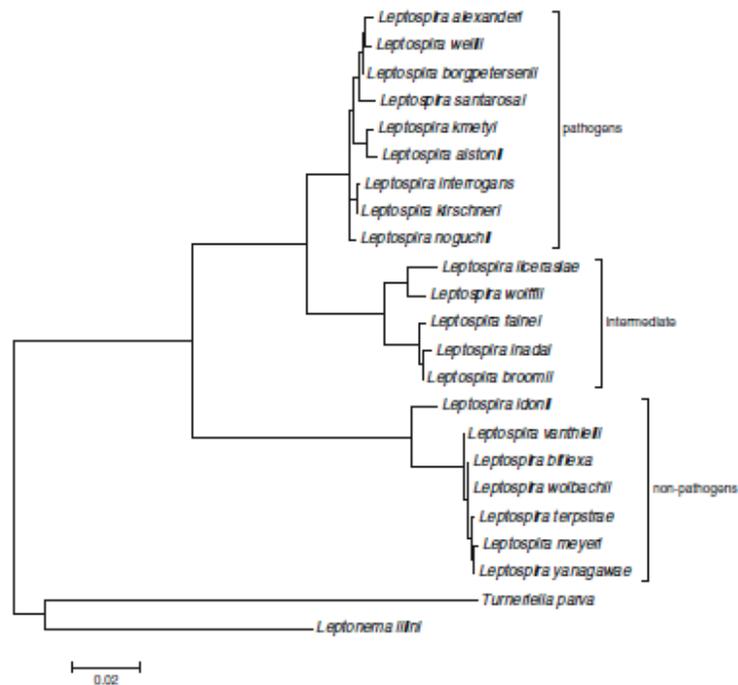


Figura 1: Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr de *Leptospira* spp., que muestra tres grupos comprendidos por cepas patógenas, saprófitas e intermedias (Adaptado de Adler, 2015).

Si bien, ambas clasificaciones coexisten, las especies de *Leptospira* ahora reconocidas no corresponden a las dos previamente mencionadas (*L. interrogans* s. l. y *L. biflexa* s. l.). Además, algunos serovares patógenos y no patógenos se encuentran dentro de varias especies como puede observarse en la tabla 1. (Cerqueira & Picardeau, 2009).

Tabla 1: Serovares de *Leptospira* encontrados en diferentes especies.

Serovar	Especie
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Bulgarica	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hardjo	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i>
Kremastos	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Mwogolo	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Paidjan	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Szwajizak	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Valbuzzi	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>

1.4 Epidemiología

La epidemiología de la leptospirosis es compleja debido a que en la presentación de la enfermedad influyen factores del ambiente, del hospedador y del agente. Con respecto al ambiente, la infección con *Leptospira* spp., se ha descrito en todo el mundo sin embargo, presenta mayor incidencia en los países de clima cálido, con altas precipitaciones anuales, pobre saneamiento ambiental, escaso control de roedores y manejo de sistemas mixtos de animales de producción (Vanasco y col., 2000; Adler, 2015). En general, en las regiones templadas aumenta su incidencia en verano u otoño cuando la temperatura es el factor limitante para la sobrevivencia del microorganismo,

mientras que, en las regiones de clima tropical se presenta en las épocas lluviosas donde la desecación es el factor limitante para su sobrevivencia (Levett, 2004; Greene, 2012).

Con respecto al agente la *Leptospira* spp., no se replica fuera del hospedador y puede permanecer viable por varios meses en suelos húmedos contaminados con orina de animales infectados (Greene, 2012). La sobrevivencia en estos ambientes es favorecida cuando se presentan condiciones de desarrollo óptimas como pH neutro o ligeramente alcalino y temperaturas entre 0 °C y 25 °C; mientras que temperaturas menores, deshidratación o exposición a rayos ultravioletas la disminuyen (Vanasco 2000; Greene, 2012).

Recientemente, se ha demostrado que *Leptospira* spp., tiene la capacidad de formar biocapas es decir, una comunidad de bacterias embebidas en una matriz extracelular adherida a una superficie. Estas agregaciones celulares son compatibles con la vida saprofítica en el agua y podrían favorecer a los microorganismos patógenos en la colonización del hospedador (Brihuega y col., 2012).

Con respecto a la infección, los animales pueden actuar como reservorios u hospedadores accidentales. Los reservorios son aquellos que portan *Leptospira* spp., principalmente en los túbulos contorneados del riñón (Adler, 2015). Además luego de la infección se observa escaso o nulo efecto clínico o daño patológico sobre el hospedador, excepto bajo ciertas circunstancias en las cuales se pierde el equilibrio agente-hospedador como es el caso de hembras en gestación, neonatos, coinfecciones con virus o estados de inmunosupresión (Levett, 2001; Adler, 2015). Por otra parte, los hospedadores accidentales son aquellos que al contraer la infección no logran el equilibrio entre agente y hospedador y por lo general presentan una enfermedad clínica aguda más severa (Greene, 2012). Dentro de los mamíferos, se han descrito numerosas relaciones entre reservorios y serovares de *Leptospira* adaptados a dicho hospedador sin embargo,

los pequeños roedores son considerados los principales reservorios de cepas de *Leptospira* patógenas (Barthi y col., 2003). También los zorros, armadillos, comadrejas, cuises, animales poiquiloterms y mamíferos marinos mantienen *Leptospira* spp., en un determinado medio (Lilenbaum y col., 2002a, Brihuega y col., 2007; Stanchi y col., 2007). Algunos ejemplos de especies de animales que actúan como reservorios y los serovares adaptados a estos son enumerados en la tabla 2.

Tabla 2: Hospedadores reservorios de serovares de *Leptospira* spp. (Adaptado de Barthi y col., 2003).

Hospedador reservorio	Serovar de <i>Leptospira</i> adaptado a ese hospedador
Porcinos	Pomona, Tarassovi
Bovinos	Hardjo, Pomona
Equinos	Bratislava
Caninos	Canicola
Ovinos	Hardjo
Rata	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Ratón	Ballum

La prevalencia de leptospirosis canina varía en cada región dependiendo del lugar y momento de realización del estudio, como también de la población de la cual se extrajeron las muestras (caninos sanos o caninos con signología compatible). Hasta la década de los 90 los serovares más comunes asociados con enfermedad clínica en todo el mundo fueron Canicola e Icterohaemorrhagiae. Desde entonces hubo un cambio importante en la epidemiología de la enfermedad y comenzaron a reportarse casos asociados con otros serovares menos comunes como Grippotyphosa, Australis, Sejroe y Pomona (Birnbaum y col., 1998; Adin & Cowgill, 2000; Fontaine, 2006; Geisen y col.,

2007). La vacunación durante más de 50 años contra los serovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* pudo ser una de las causas para que disminuyera su incidencia (Rentko y col., 1992; Benacer y col., 2017). Otro factor mencionado como causante del cambio en la frecuencia de aparición de nuevos serovares, es la exposición de los caninos a ambientes frecuentados por animales silvestres portadores de otras cepas de *Leptospira* spp. (Greene, 2012).

En Argentina se reportaron valores de prevalencia para la zona del Gran Buenos Aires de 33 al 57 % siendo los serovares predominantes *Pyrogenes*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Cynopteri* (Rubel y col., 1997; Tealdo y col., 2007). Mientras que en la zona de La Plata, Berisso y Ensenada la prevalencia reportada fue de 25 %, siendo los serovares más comunes *Castellonis*, *Canicola*, *Copenhageni* y *Pyrogenes* (Arias y col., 2005; Martin y col., 2014). En la ciudad de Rosario la prevalencia hallada fue del 14,1 % con la presentación de los serovares *Castellonis* (54,54 %), *Canicola* (31,81 %), *Pyrogenes* (4,54 %), *Pomona* (4,54 %) e *Icterohaemorrhagiae* (4,54 %) (Seghesso-Zabala y col., 2013).

Al evaluar los factores de riesgo que se asocian a leptospirosis en humanos generalmente se encuentran actividades recreacionales (por ejemplo, deportes acuáticos), ocupacionales (trabajo en áreas rurales o exposición a animales de producción), contacto con aguas superficiales contaminadas, eventos de origen natural como inundaciones o, más recientemente, la tenencia de pequeños roedores, como mascotas (Vanasco y col., 2008; Mori y col., 2017). Por el contrario en caninos los eventos que se asocian a la presentación de la enfermedad aún no están completamente definidos. Estudios realizados en distintos países sobre este tema han incluido variables como raza, sexo, edad, estado reproductivo, contacto con animales silvestres o de producción, residencia urbana o rural y utilidad de la mascota (Ward, 2002; Alton y col.,

2009). Mientras que en otros se tuvieron en cuenta variables medioambientales como precipitaciones anuales, estación del año u ocurrencia de inundaciones (Adin & Cowgill, 2000; Jorge y col., 2017). Algunos autores han reportado que la enfermedad fue más frecuente en caninos que residían cerca de fuentes de agua o estaban expuestos indirectamente a animales silvestres (Ghneim y col., 2007) o bien que estaba positivamente correlacionada con el nivel de precipitaciones anuales (Adin & Cowgill, 2000; Jorge y col., 2017). Asimismo, se ha descrito que factores como el sexo macho, la raza indefinida y actividades de caza o pastoreo incrementaban la aparición de leptospirosis en caninos (Adin & Cowgill, 2000; Ward, 2002). Sin embargo, en otros estudios el sexo y la raza no fueron importantes marcadores de riesgo (Alton y col., 2009; Lee y col., 2014). Recientemente, Azócar-Aedo & Monti (2016) realizaron un meta-análisis sobre los factores de riesgo de leptospirosis canina y encontraron que la raza mestiza, las actividades de caza o pastoreo y la ocurrencia de inundaciones constituían factores de riesgo (OR >1), mientras que la variable canino menor de un año fue un factor protector contra la infección (OR <1), no obstante ninguna de estas variables fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, el sexo macho y la residencia urbana fueron factores de riesgo estadísticamente significativos (OR 1,6 y 1,58 respectivamente) para contraer la enfermedad.

1.5 Patogenia

Los animales adquieren la infección mediante contacto directo o indirecto. La transmisión directa ocurre por contacto con sangre, tejidos u orina de los animales infectados (Levett, 2001). También se ha descrito la transferencia venérea, transplacentaria, a través de heridas por mordedura o por ingestión de tejidos infectados (Sykes y col., 2011). La transmisión indirecta ocurre a través de exposición a aguas,

suelos o alimentos contaminados con *Leptospira* spp., tomando mayor relevancia cuando los factores medio-ambientales son óptimos para la sobrevivencia de la bacteria fuera del hospedador (Levett, 2001). En estudios experimentales se halló la presencia de ADN en tejidos de garrapatas y se comprobó la transmisión experimental de la infección en animales de laboratorio, sin embargo, la importancia de estos hallazgos en la transmisión de la enfermedad canina aún es desconocida (Greene, 2012; Wójcik-Fatla y col., 2012).

Una vez en el espacio vascular la *Leptospira* spp., se multiplica y distribuye en todos los tejidos y órganos principalmente en riñón, bazo, hígado, sistema nervioso central, globo ocular y tracto genital donde se multiplican. Esta etapa aguda conocida como fase de leptospiremia dura alrededor de una semana (Greenle y col., 2005). Las manifestaciones clínicas agudas coinciden con esta primera fase y son más frecuentes de ver en animales jóvenes y en infecciones producidas por serovares no adaptados al hospedador (Adler, 2015). Luego hay una segunda etapa conocida como fase inmune que comienza alrededor de la segunda semana. Este período se caracteriza por la aparición de anticuerpos específicos, la desaparición de bacterias del torrente sanguíneo, localización en órganos protegidos del sistema inmune y el comienzo de la eliminación de bacterias por la orina (Stanchi 2007). La duración de la eliminación urinaria varía de acuerdo a la especie y al serovar infectante (Adler, 2015).

La magnitud del daño producido en los distintos órganos afectados, varía de acuerdo a la virulencia de la cepa, al número de microorganismos y a la susceptibilidad del hospedador. En la leptospirosis aguda la primera lesión que se observa es el daño del endotelio de los pequeños vasos por un efecto tóxico directo que conduce a alteraciones de la microcirculación y manifestaciones hemorrágicas como petequias y sufusiones en membranas mucosas y superficie de órganos (Greene, 2012). En el riñón, el daño inicialmente, es producido por la colonización y replicación de *Leptospira* spp., en las

células del túbulo proximal y en la luz tubular (Birnbaum y col., 1998). Los riñones se presentan tumefactos y al corte exhiben un infiltrado pálido en la región cortico-medular. En el examen histológico se observa nefritis túbulo-intersticial aguda con degeneración tubular y glomerular probablemente inducida por las proteínas de membrana externa del microorganismo (Yang y col., 2002; Greenle y col., 2004). La lesión renal ocasiona disminución de la tasa de filtración glomerular con la consecuente elevación de metabolitos como la urea, creatinina y fósforo (Greenle y col., 2004; Miller y col., 2007).

El hígado también sufre lesiones durante la leptospiremia. Una grave disfunción hepática puede ocurrir sin cambios histopatológicos importantes, debido al daño subcelular producido por las toxinas (Greene, 2012). Macroscópicamente, se puede observar aumentado de tamaño con demarcación de sus lóbulos. Mientras que al examen histológico se ven cambios degenerativos leves en los hepatocitos, colestasis y necrosis focal e infiltrado perivascular de linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos (Greenle y col., 2004). El compromiso hepático se manifiesta a través del aumento de las enzimas hepáticas (alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina), disminución de los niveles séricos de albúmina, incremento de bilirrubina (Miller y col., 2007; Adler, 2015).

La lesión pulmonar aguda se debe a los efectos de las toxinas sobre el tejido pulmonar. La vasculitis puede ocasionar exudación de líquido dentro de los pulmones y en pocas ocasiones puede ocurrir hemorragia pulmonar aguda. Además de la acción de las toxinas, otro mecanismo propuesto para explicar la patología pulmonar se basa en un proceso autoinmune (Croda y col., 2010). Los músculos presentan lesiones características que consisten en necrosis de fibras, vacuolización, hialinización e infiltrado inflamatorio. La lesión muscular se manifiesta a través del aumento de la actividad enzimática de la creatin-fosfoquinasa y la aspartato aminotransferasa. (Miller y col., 2007)

En la leptospirosis crónica las lesiones son principalmente en los riñones y se observan macroscópicamente como áreas focales grisáceas rodeadas de un halo hiperémico. Al examen microscópico la principal lesión descrita es una nefritis intersticial focal que puede progresar a atrofia tubular y fibrosis renal (Monahan y col., 2009). Se cree que la inducción de esta lesión es debida a la acumulación de componentes de la matriz extracelular en las células de los túbulos, a través de las proteínas de la membrana externa (Fraga y col., 2011). La hepatitis activa crónica ha sido una secuela de la enfermedad con algunos serovares (Greene, 2012). La lesión ocular puede presentarse semanas a meses posterior a la enfermedad aguda, por lo que se considera que también es mediada por un proceso autoinmune (Fraga y col., 2011).

Si bien la patogenia de la leptospirosis ha sido caracterizada en caninos, todavía no se conocen en profundidad los factores responsables de la virulencia, ni sus bases moleculares. Entre los mecanismos mencionados, la motilidad y la producción de hialuronidasa juegan un rol importante en la diseminación de la bacteria en los tejidos. (Bharti y col., 2003; Stanchi, 2007). Otros elementos que utiliza el microorganismo para establecer y mantener la infección son las proteínas de unión a la matriz extracelular y a otros ligandos del hospedador como laminina, colágeno tipo IV y fibrinógeno (Fraga y col., 2011). En *L. interrogans* serovar Canicola se ha identificado una proteína de unión a la fibronectina la cual, no se presenta en las cepas saprófitas (Reyes y col., 2007). Los LPS de *Leptospira* spp., estimulan la adherencia de los neutrófilos y la activación plaquetaria que puede contribuir al desarrollo de inflamación y desordenes de la coagulación. El LPS y otros componentes de la membrana externa estimulan la actividad de los macrófagos con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias como la Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de necrosis tumoral alfa (FNT α). Se ha demostrado una proteína citotóxica en los serovares Pomona y Copenhageni, que produce vasculitis capilar en todos los

órganos y tejidos afectados. Asimismo, se ha reportado la producción de enzimas hemolíticas como fosfolipasa y esfingomielinasa C, que afectan la fosfatidiletanolamina y esfingomielina de la membrana del eritrocito, comprobadas en serovares Castellonis, Hardjo, Pomona y Tarasovi (Levett, 2001). Otra enzima hallada en cepas patógenas es la esfingomielinasa H, que se diferencia de la C en que su acción principal es la formación de poros en la membrana de la célula *target* (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). La lipoproteína LipL 32 se encuentra conservada entre las especies de *Leptospira* patógenas y no ha sido identificada en las especies saprófitas. Es altamente inmunogénica y está involucrada en la patogenia de la nefritis intersticial (Hauk y col., 2011). Es expresada en altos niveles tanto en cultivos como en la infección natural en mamíferos (Haake y col., 2000). Otras proteínas de membrana como LipL 41 y OmpL 1 son también antígenos importantes en la respuesta inmune humoral hacia *Leptospira* spp. y se expresan en altos niveles durante la infección, actuando en forma sinérgica (Haake y col., 2000; Haake y col., 2004). La lipoproteína LipL 36 es expresada en el cultivo pero no *in vivo* (Haake y col., 2000; Levett, 2001; Cullen y col., 2005) por lo tanto no se encuentra involucrada en la patogénesis luego que la *Leptospira* spp. ingresa al organismo. Asimismo las proteínas Lig A y B parecen estar vinculadas con la adhesión a la fibronectina y son expresadas sólo por cepas patógenas (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

1.6 Signos clínicos

La infección en los caninos puede tomar un curso subclínico o clínico. A su vez, la enfermedad clínica puede presentarse en forma sobreaguda, aguda, subaguda o crónica y la gravedad clínica se ve influenciada por factores tales como, edad del perro, estado inmunitario y virulencia del serovar infectante (Fontaine, 2006; Greene, 2012). El período de incubación hasta el desarrollo de los signos clínicos es de aproximadamente 7 días en

estudios experimentales pero puede variar de acuerdo al estado inmunocompetente del paciente y a la dosis de microorganismos infectante (Schuller y col., 2015).

Las manifestaciones clínicas son variadas y ninguna es patognomónica. Entre las más frecuentes se encuentran: anorexia, letargia, vómitos, diarrea, pérdida de peso, hiperestesia muscular y deshidratación (Adin & Cowgill, 2000; Greenle y col., 2004; Goldstein y col., 2006). Los caninos que presentan falla renal además manifiestan poliuria, polidipsia o falla renal con oliguria o anuria. Los animales que desarrollan una falla hepática muestran signos de ictericia, inapetencia, pérdida de peso, ascitis o encefalopatía hepática. La hematemesis, hematoquesia, hemoptisis, melena, epistaxis y hemorragias petequiales también pueden presentarse debido a la trombocitopenia y coagulación intravascular diseminada (Fontaine, 2006; Schuller y col., 2015).

La uveítis es un signo frecuente en equinos y humanos y ha sido asociado con la persistencia de *Leptospira* spp., en el humor vítreo, inflamación crónica y reactividad cruzada de anticuerpos anti-*Leptospira* con antígenos oculares (Levett 2001; Verma & Stevenson, 2012). Sin embargo en caninos con leptospirosis es más frecuente observar conjuntivitis, descarga ocular muco-purulenta, panuveítis, congestión de los vasos episclerales y desprendimiento o hemorragia retiniana (Townsend y col., 2006). Los signos respiratorios como taquipnea, disnea o tos se presentan debido a neumonía por aspiración o acidosis por el síndrome de distress respiratorio agudo o síndrome de hemorragia pulmonar. Esta entidad es bien reconocida en la leptospirosis humana y en algunos caninos en Europa (Kohn y col., 2010; Razuk Filho y col., 2016).

Los desórdenes reproductivos no son frecuentes en caninos, no obstante, existen reportes de infertilidad y abortos asociados con la infección por el serovar Bratislava (Schuller y col., 2015) y se logró aislar una cepa del serogrupo Djasiman (Pomona) de un feto abortado en nuestro país (Rossetti y col., 2005).

1.7 Inmunidad

La respuesta inmune desencadenada por la infección con *Leptospira* spp., es fundamentalmente humoral en humanos y en caninos (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). La IgM es liberada en las primeras semanas del curso de la enfermedad, razón por la que altos títulos de IgM, sugieren un estado agudo de la enfermedad, mientras la IgG aumenta entre la segunda y tercera semana, encontrándose su pico hasta un mes post infección (Geisen y col., 2007).

De los componentes de la membrana externa el LPS es el antígeno al cual están dirigidos los anticuerpos aglutinantes, opsónicos y protectores. Cabe destacar que, la inmunidad mediada por el LPS está restringida a los serovares con LPS serológicamente relacionados (Haake y col., 2000; Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Las proteínas de la membrana externa a su vez, juegan un rol importante en la inmunidad hacia la infección y se han convertido en potenciales *targets para* el desarrollo de pruebas diagnósticas y de vacunas. En comparación con la inmunidad conferida por el LPS, la inmunidad mediada por las proteínas de membrana externa confiere inmunidad cruzada (Dey y col., 2004; Koizumi y col., 2005; Wang y col., 2007; Hartwig y col., 2010).

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de leptospirosis basado solamente en la signología clínica es difícil, debido a las diversas formas de presentación de la enfermedad y a la ausencia de signos clínicos patognomónicos. Es por ello que se combinan los datos obtenidos mediante la anamnesis, el examen físico, estudios hematológicos, bioquímica clínica y urianálisis para arribar al diagnóstico presuntivo, el que luego se confirma mediante pruebas serológicas o

pruebas que detectan al agente etiológico o su ADN (aislamiento bacteriano, observación microscópica o aplicación de técnicas moleculares).

Estudios hematológicos, bioquímica clínica y urianálisis

Las anormalidades hematológicas más comunes encontradas en caninos con leptospirosis son leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda y monocitosis, aunque durante la etapa de leptospiremia puede presentarse leucopenia. También se observa trombocitopenia leve a moderada como resultado del consumo aumentado, secuestro esplénico o destrucción inmunomediada de las plaquetas (Fontaine, 2006; Schuller y col., 2015). La anemia se ha observado en la mitad de los caninos con leptospirosis y puede ser leve a moderada debido a pérdidas por el tracto gastrointestinal, hemorragia pulmonar o por enfermedad inflamatoria (Miller y col., 2007; Greene, 2012; Schuller y col., 2015).

En los caninos con falla renal las anormalidades bioquímicas más comunes son aumento de la urea y creatinina séricas (Adin & Cowgill, 2000). La disfunción hepática ocasiona aumento de la actividad sérica de las enzimas alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina así como hiperbilirrubinemia (Adin & Cowgill, 2000; Miller y col., 2007). Los caninos con alteraciones musculares pueden tener actividad creatin-fosfoquinasa aumentada. Por lo general, las alteraciones electrolíticas son paralelas al grado de disfunción renal y gastrointestinal. En la mayoría de los casos se pueden observar hiponatremia, hipocloremia, hipopotasemia e hiperfosfatemia, mientras que la hiperpotasemia se detecta en aquellos caninos con falla renal oligúrica a anúrica (Knöpfler y col., 2017).

Las anormalidades en el análisis de orina incluyen glucosuria, proteinuria glomerular o tubular y presencia de cilindros granulosos, leucocitos y eritrocitos en el sedimento (Nelson, 2005; Miller y col., 2007; Knöpfler y col., 2017). En la mayoría de los

casos se observa isostenuria aunque la hipostenuria puede estar presente (Schuller y col., 2015).

Pruebas serológicas

1. Aglutinación microscópica

La prueba de aglutinación microscópica (MAT), es el método serológico de referencia para el diagnóstico de leptospirosis tanto humana como animal (Levett, 2001; Bharti y col., 2003). La misma, consiste en enfrentar el suero diluido del paciente sospechoso, con los antígenos (cultivos vivos) de *Leptospira* spp. En la realización de la prueba deben incluirse cepas representativas de todos los serogrupos conocidos en la región, además de aquellos para los cuales la especie en la que se realiza el diagnóstico es considerada reservorio (Levett, 2004; Adler, 2015).

En caninos se parte de una dilución del suero 1:100 y se enfrenta con los distintos antígenos para verificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. Se considera reactivo un suero que aglutina el 50 % de *Leptospira* spp., en comparación con un testigo. Posteriormente, aquellos sueros que reaccionaron a la primera prueba son diluidos en progresión geométrica en base 2 hasta la última dilución que presentó la aglutinación mencionada y se considera como título final (OIE, 2008).

Para una correcta interpretación de los resultados obtenidos mediante la prueba de MAT, se deben evaluar muestras del paciente en el período agudo y convaleciente para evidenciar seroconversión (aumento de cuatro veces en el título entre ambas muestras). Esto permite confirmar una infección aguda por *Leptospira* spp., debido a que los títulos resultantes de vacunación o exposición previa no se modifican. Sin embargo, la obtención de la segunda muestra es difícil en la práctica clínica de rutina, por lo cual algunos autores consideran que un título alto en una única muestra (> 1/800; sin estar

vacunado) en presencia de signos clínicos y con historia compatible de exposición a factores de riesgo confirma el diagnóstico (Geisen y col., 2007; Greene, 2012; Jorge y col., 2017).

En la leptospirosis crónica la prueba de MAT presenta una limitación para la confirmación del caso debido a que los títulos de anticuerpos pueden ser muy bajos o estáticos (Harkin y col., 2003b; Adler, 2015). Otras limitaciones de esta prueba incluyen la necesidad del mantenimiento de cultivos vivos, la verificación de la identidad de los serovares utilizados, los posibles resultados falsos negativos si el serovar no está incluido en el panel de antígenos y la imposibilidad de confirmar el caso en aquellos pacientes que mueren antes de la extracción de la segunda muestra para evidenciar seroconversión (Levett, 2004; Sykes y col., 2011; Cerqueira y col., 2010).

2. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés, ELISA)

Se han desarrollado varios métodos de ELISA para el diagnóstico de leptospirosis en caninos utilizando diferentes preparaciones de antígenos, protocolos o plataformas (prueba en placa o dipstick). Entre los antígenos utilizados se encuentran las preparaciones de células enteras, las proteínas de membrana externa (PME) o más recientemente las proteínas recombinantes (Arias y col., 1999; Sathiyamoorthy y col., 2017). La utilización de PME recombinantes es útil en los casos donde se quiere confirmar el diagnóstico de infección aguda, debido a que son reactivas frente a anticuerpos de todas las cepas patógenas (Dey y col., 2004). Además los ensayos de ELISA IgM permiten confirmar la infección aguda. A pesar de sus ventajas como prueba tamiz carece de la capacidad de caracterizar serovares y todo resultado positivo con ELISA debería ser confirmado por MAT. (Vanasco y col., 2007; Schuller y col., 2015).

3. Otras técnicas serológicas

La prueba de Aglutinación Macroscópica en placa con antígeno termorresistente es una determinación fácil de realizar y de bajo costo. Se utiliza una suspensión densa de *Leptospira* spp., tratadas con calor, a la cual se enfrenta suero del paciente y se observa la presencia de aglutinación. El antígeno es una fracción común al género *Leptospira* spp. y por lo tanto reacciona frente a cualquier serovar. La prueba presenta como ventaja la posibilidad de detectar anticuerpos hacia el cuarto día del inicio de la enfermedad, haciéndose negativa hacia el día 45. Este método es útil como prueba tamiz, sin embargo los resultados deben confirmarse con la prueba de referencia (Lilenbaum y col., 2002a; Picardeau y col., 2014).

Otras pruebas serológicas desarrolladas como métodos alternativos para diagnóstico, son inmunofluorescencia indirecta (IFI), contraelectroforesis, reacción de fijación del complemento, Lepto- dipstick (IgM), Audiodot, entre otras. En forma general presentan como ventaja la posibilidad de otorgar un resultado en corto tiempo. Sin embargo todas deben ser confirmadas por MAT (García y col., 2009).

Detección del agente etiológico

1. Aislamiento

La demostración de *Leptospira* spp., en sangre o en diversos órganos tras un estudio *post mortem* de animales que muestren signos clínicos, es considerada diagnóstica (Adler, 2015). Sin embargo, la demostración de bacterias en el tracto genital, riñones u orina debe ser interpretada con cautela debido a que puede tratarse de animales portadores (Levett, 2001; Greene, 2012). La demostración de *Leptospira* spp.,

en fluidos corporales u órganos internos de fetos abortados es considerada diagnóstica de infección crónica en la madre y evidencia de infección activa en el feto (Adler, 2015).

El cultivo de *Leptospira* spp., puede realizarse a partir de muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) durante la primera semana o de orina durante la segunda semana. Cuando el tiempo de infección es desconocido el examen simultáneo de sangre y orina puede aumentar la sensibilidad diagnóstica. Es necesario utilizar dos medios de cultivos diferentes como Fletcher y EMJH a fin de aumentar las probabilidades de recuperación. Los cultivos son incubados a 29 \pm 1 °C hasta 6 meses, debido a que el crecimiento inicial puede ser lento y deben examinarse bajo microscopía de fondo oscuro cada 7-10 días (Adler, 2015). Los aislamientos son posteriormente identificados hasta nivel de especie y/o serovar con métodos serológicos o con métodos moleculares (Ahmed y col., 2011).

El aislamiento e identificación es el método de elección para identificar serovares circulantes en una región geográfica particular lo cual permite su incorporación a la prueba de MAT y su utilización en el desarrollo de vacunas. Sin embargo presenta importantes desventajas, entre ellas (Faine, 1982; Galloway y col., 2010).

- La administración de antibióticos reduce la probabilidad de un aislamiento exitoso y puede conducir a resultados falsos negativos (Adler, 2015).
- El tiempo requerido para la incubación no hacen al cultivo un método útil para el diagnóstico temprano y la toma de decisiones en la clínica (Faine, 1982; Galloway y col., 2010).
- La contaminación por otros microorganismos es frecuente (Faine, 1982; Galloway y col., 2010).

2. Observación microscópica

La visualización de *Leptospira* spp., por microscopía de campo oscuro a partir de muestras de orina, sangre o LCR se ha empleado para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo presenta baja sensibilidad debido a que se requieren como mínimo 1×10^4 células/ml para poder visualizarlas y baja especificidad ya que otros microorganismos o restos de fibrina pueden ser confundidos con *Leptospira* spp. Por lo tanto es conveniente que la observación de bacterias por esta técnica sea confirmada con otros métodos. Asimismo se han aplicado varios métodos de tinción argéntica, inmunofluorescente e inmunohistoquímica para la detección directa de *Leptospira* spp., a partir de improntas o muestras de tejidos obtenidas durante la necropsia (Chad y col., 2002; Brihuega, 2010).

3. Pruebas moleculares

El desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular para la identificación y tipificación de microorganismos permite determinar de manera precisa el agente etiológico actuante y entender la epidemiología de una enfermedad. En lo que respecta al diagnóstico de leptospirosis la necesidad de tener un resultado rápido ha llevado al desarrollo de técnicas de detección molecular siendo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la más difundida en todo el mundo (Ahmed y col., 2011). Una de las ventajas que presenta la utilización de la PCR es que permite la detección de ADN de *Leptospira* spp., sin la necesidad del aislamiento del microorganismo (Stoddard y col., 2009). Además, a diferencia del aislamiento que requiere de bacterias viables para su desarrollo, la técnica de PCR detecta ADN de microorganismos tanto viables como no viables (Sykes y col., 2011; Adler, 2015). Asimismo, permite la confirmación de casos sospechosos en la fase aguda de la enfermedad, incluso antes, de que los anticuerpos sean detectables por las pruebas serológicas convencionales (Harkin y col., 2003b). Por

otro lado, contribuye a la detección de animales con enfermedad crónica en los cuales los bajos niveles de anticuerpos impiden realizar un diagnóstico correcto (Harkin y col., 2003a; Adler, 2015).

En la últimas décadas se han publicado numerosos trabajos acerca de la aplicación de la PCR en el diagnóstico de leptospirosis tanto para humanos como para caninos, a partir de diversas muestras clínicas tales como sangre, suero y orina, (Mérien y col., 1992, Levett y col., 2005, Slack y col., 2006, Ahmed et al. al. 2009, Rojas y col., 2010, Garcia Monte y col., 2012, Koizumi y col., 2013, Xu y col., 2014). Las diferencias principales entre los mismos, se basan en la selección de los cebadores y en la variante de la PCR utilizada (convencional y de tiempo real). Con respecto a los cebadores, existen ensayos de PCR que utilizan genes comunes a todas las especies de *Leptospira* spp., incluyendo el gen *rrs*, *gyrB*, *flaB* y *secY*, mientras que otros se dirigieron a genes específicos de patógenos que incluyen *lipL32*, *ligA* y *ligB* (Mérien y col., 1992, Levett y col., 2005, Palaniappan y col., 2005, Slack y col., 2006, Ahmed y col., 2009, Rojas y col., 2010, Ahmed y col., 2012, Garcia Monte y col., 2012, Koizumi y col., 2013, Xu y col., 2014). Estos ensayos se han utilizado para controlar la colonización renal en la infección experimental (Ahmed y col., 2012), para evaluar la eliminación urinaria de *Leptospira* spp. (Harkin y col., 2003a, Rojas y col., 2010, Fink y col., 2015, Gentilini, y col., 2015) y para detectar *Leptospira* spp., en pacientes sospechosos (Harkin y col., 2003b, Fraune y col., 2013, Koizumi y col., 2013, Xu y col., 2014, Recavarren y col., 2015). En medicina humana, han demostrado ser una herramienta adecuada para confirmar el diagnóstico clínico (Levett y col., 2005, Stoddard y col., 2009, Villumsen y col., 2012). Sin embargo, los ensayos de PCR estandarizados para el diagnóstico de leptospirosis humana podrían no tener el mismo rendimiento cuando se aplican a muestras de caninos (Schuller y col., 2015).

La incorporación de la técnica de PCR en tiempo real permitirá detectar un mayor porcentaje de caninos verdaderos positivos a leptospirosis en comparación con la prueba de aglutinación microscópica y el aislamiento.

Objetivo general

Mejorar el diagnóstico de leptospirosis canina a través de la utilización de una técnica de PCR en tiempo real y brindar información sobre las cepas aisladas en la población canina proveniente de las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada que ingresa como paciente al Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

Objetivos específicos

Estandarizar una técnica de PCR en tiempo real con cepas de referencia de *Leptospira* spp., utilizando un control interno de amplificación.

Validar la técnica de PCR en tiempo real estandarizada en una etapa intralaboratorio.

Aplicar la técnica de PCR en tiempo real en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis.

Aplicar la prueba de aglutinación microscópica (MAT) en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis.

Realizar el aislamiento en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis.

Comparar los resultados obtenidos con cada una de las técnicas diagnósticas utilizadas.

Con el objetivo de lograr una mejor comprensión se procedió a dividir las etapas del desarrollo del trabajo de tesis en 2 secciones:

Sección 1: Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real y validación en una etapa intralaboratorio.

Sección 2: Comparación de diferentes técnicas diagnósticas en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis.

Estandarización y validación en una etapa intralaboratorio de la técnica de PCR en tiempo real

1.1 INTRODUCCIÓN

El proceso de detección de un agente infeccioso mediante la técnica de PCR se desarrolla en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma y finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio en la PCR convencional, o mediante la medición de fluorescencia en la PCR en tiempo real (qPCR) (Costa, 2004). Para llevar a cabo la detección de la fluorescencia se han desarrollado dos métodos diferentes. En un caso se monitorea el aumento de la cantidad de ADN de doble cadena utilizando un agente intercalante fluorescente (*SYBR green*) y en el otro se usan sondas que hibridan en la zona interna de la secuencia del amplificado. La ventaja de la utilización de sondas recae en su mayor especificidad, debido a que un tercer oligonucleótido, además de los cebadores, debe unirse al fragmento *target*, por lo cual la fluorescencia registrada corresponde únicamente a la generada por el producto de amplificación (Costa, 2004; Gibson, 2006).

Asimismo, existen dos aspectos importantes a tener en cuenta en la utilización de la técnica de PCR cualquiera sea su variante: los controles utilizados y el proceso de

validación seguido. En todo ensayo de PCR se debe incluir un control negativo (mezcla de reacción de PCR sin ADN molde), un control externo positivo y un control interno de amplificación (incluido en cada uno de los tubos de PCR con el ADN problema). La importancia de incluir un control interno de amplificación, radica en que permite identificar resultados falsos negativos causados por inhibidores de la PCR (Costa, 2004). Por lo tanto, si una muestra diera negativa al fragmento de ADN buscado, pero existiera amplificación del control interno se puede concluir que el *target* buscado está ausente o por debajo del límite de detección de la técnica (Hoorfar y col., 2004).

Con referencia al proceso de validación, los experimentos deberían incluir información básica correspondiente a los siguientes parámetros:

- Rango dinámico, que indica el intervalo de concentraciones o número de copias cuantificable establecido por medio de curva de calibración, bajo las cuales el método funciona de manera lineal. El mismo, permite establecer la eficiencia de amplificación de la PCR considerada como aceptable cuando se encuentra entre 92 y 100 % (Bustin y col., 2009).
- Sensibilidad analítica se refiere al número de copias mínimo en una muestra que puede ser medido con un ensayo; mientras que, la sensibilidad diagnóstica, es el porcentaje de individuos con un desorden dado, a quienes el ensayo identifica como positivos para esa condición (Tarabla, 2000; Bustin y col., 2009). En los protocolos de PCR convencional, la sensibilidad analítica se halla entre 100 a 1.000 copias del genoma del microorganismo en estudio (OIE, 2008). La misma, puede mejorarse mediante la aplicación de lo que se conoce como PCR anidada, así como mediante la comprobación de los productos amplificados por hibridación con sondas marcadas (Postic y col., 2000). Por su parte, en la qPCR la sensibilidad es igual o superior a la de una PCR anidada (<10 copias del genoma),

pero con un riesgo de contaminación menor, debido a que no es necesario el manejo posterior de los productos amplificados (Kubista y col., 2006).

- Especificidad analítica, se refiere a la detección de la secuencia específica que se desea analizar; mientras que la especificidad diagnóstica, es el porcentaje de individuos sin el atributo buscado, a quienes el ensayo identifica como negativos para esa condición (Tarabla, 2000; Bustin y col., 2009). Con respecto a la primera, la elección correcta de los cebadores como también la evaluación de microorganismos estrechamente relacionados mediante la técnica a estudiar, permiten incrementar su valor (OIE, 2008).

En medicina humana numerosos trabajos han evaluado los parámetros mencionados, a partir de cultivos puros de microorganismos o de muestras experimentalmente contaminadas con *Leptospira* spp. (Smythe y col., 2002; Luchessi y col., 2004; Levett y col., 2005; Ahmed y col., 2009; Stoddard y col., 2009; Bourhy y col., 2011; Thaipadunpanit y col., 2011). No obstante, en veterinaria los datos concernientes a estos temas son escasos (Branger y col., 2005).

Por lo mencionado, en esta sección se realizó la estandarización y validación (etapa intralaboratorio) de una técnica de qPCR (*lipL32*-qPCR) con cultivos de microorganismos y material biológico (sangre con anticoagulante, suero y orina) experimentalmente contaminado.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Cepas bacterianas

Las 15 cepas de *Leptospira* spp., incluidas en el trabajo fueron seleccionadas teniendo en cuenta que se encuentran entre los genotipos más frecuentemente descritos en nuestra zona (Grune-Loffler y col., 2014). Las mismas fueron cedidas gentilmente por el centro de referencia de leptospirosis: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Castelar (Argentina). Las bacterias fueron repicadas en medio de cultivo de Fletcher (Fletcher Medium Base, BD Difco, France) e incubadas a 28 °C. Una vez que se observó macroscópicamente la formación de los anillos de Dinger en los tubos de cultivo y se constató la presencia de *Leptospira* spp., en el microscopio de fondo oscuro, los cultivos fueron colocados en un cepario a temperatura controlada de laboratorio (22 °C) y repicados cada tres meses. La lista de cepas de referencia utilizadas se muestra en la tabla 3. Para la realización de los ensayos de estandarización y validación de la técnica *lipL32*-qPCR se realizaron dos subcultivos consecutivos en medio líquido EMJH (*Leptospira* Medium Base EMJH, BD Difco, France) que fueron incubados a 28 °C. Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron preparados siguiendo el protocolo e indicaciones expuestas en el Anexo 1.

Además, se incluyeron cepas de otros microorganismos pertenecientes a distintos géneros de bacterias, parásitos u hongos que podrían estar presentes en las muestras clínicas a estudiar y causar amplificación de ADN inespecífica (Greene, 2012; Gentilini y col., 2015). La selección de los microorganismos incluidos en este estudio, se basó en trabajos previos realizados en medicina veterinaria (Rojas y col., 2010; Gentilini y col., 2015). El ADN correspondiente a estos microorganismos fue cedido gentilmente por los centros de diagnóstico como el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Instituto Malbrán y el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad

Nacional de La Plata (Argentina). Los mismos incluyeron: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morgani*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudointermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus canis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burdogferi*, *Candida albicans* y *Hepatozoon canis*.

Tabla 3: Cepas de referencia de *Leptospira* spp., utilizadas en el estudio.

Especies	Serogrupo	Serovar	Cepa
Patógenas			
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Pomona	Pujato	Pujato
	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
	Sejroe	Wolffi	3705
	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. noguchii</i>	Pomona	Proechimys	1161 U
<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
No-patógenas			
<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Semarang	Patoc I

1.2.2 Preparación del ADN molde

La obtención del ADN molde se realizó a partir de cada cultivo de *Leptospira* spp. Se utilizó un método de extracción QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) según las indicaciones del fabricante (Anexo 2). La concentración del ADN genómico extraído se expresó en ng/μL y la pureza mediante la razón 260/280 nm para lo cual se utilizó un espectrofotómetro NanoVue (GE). El ADN de cada cepa fue conservado a -20 °C hasta su procesamiento. En todos los casos se incluyó un control negativo de extracción que consistió en agua estéril libre de nucleasas la cual fue procesada como el resto de las muestras durante la extracción de ADN, para verificar la ausencia de contaminación en la sala.

1.2.3 Protocolo de la técnica *lipL32*-qPCR

- **Cebadores y sonda**

Se utilizaron los cebadores descritos por Villumnsen y col., (2012) (Tabla 4) que amplifican un fragmento de 87 pares de bases (bp) del gen *lipL32* que codifica una lipoproteína de membrana externa presente sólo en especies patógenas de *Leptospira*. Para identificar el amplicón se utilizó una sonda de hidrólisis del tipo TaqMan con la misma secuencia de nucleótidos descrita por el autor. No obstante, se realizó una modificación con respecto a la marcación fluorescente de la sonda. En el extremo 5' se utilizó el colorante reportero FAM (6-carboxifluoresceína) mientras que en el extremo 3' se adicionó un apagador de fluorescencia del tipo no fluorescente Iowa Black FQ (IBFQ, *Integrated DNA Technologies*, USA). Además, esta sonda incorpora un apagador de fluorescencia interno denominado ZEN con lo cual se reduce la fluorescencia *background* (ruido de fondo). Los cebadores y sonda fueron sintetizados en *Integrated DNA Technologies* (Coralville, Iowa, EEUU).

Tabla 4: Secuencia de oligonucleótidos utilizadas en este estudio.

Cebadores y sonda	Secuencia (5'3')	Referencia
LipL32 Forward	AGAGGTCTTTACAGAATTTCTTTCCTACTACCT	Villumsen
LipL32 Reverse	TGGGAAAAGCAGACCAACAGA	y col., 2012
LipL32-(Sonda)	/56-FAM/AAGTCAAAG/ZEN/GATCTTTCGTTGC/3IABkFQ	

- **Condiciones de PCR**

Las condiciones de ciclado fueron las propuestas por Villumsen y col., (2012), con leves modificaciones en el volumen final de reacción, concentración de cebadores, concentración de sonda y número de ciclos. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, consistiendo de 1X de KAPPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X) ABI Prism (KAPA Biosystems, Massachusetts, USA), 900 nM de cada cebador, 250 nM de sonda y 5 µl de ADN molde. El ciclado se realizó con una etapa de activación enzimática de 95 °C durante 3 min, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, seguida de 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg y 60 °C durante 1 min.

El ensayo incluyó un control interno de amplificación TaqMan Exogenous Internal Positive Control (IPC) (Applied Biosystems, USA) para evaluar inhibición o condiciones subóptimas de amplificación. El IPC utilizado en este estudio es un *target* heterólogo que incluye cebadores y una sonda del tipo TaqMan marcada con el colorante reportero VIC en el extremo 5' y el apagador de fluorescencia TAMRA en el extremo 3'. Como control negativo se utilizó agua ultra pura (Invitrogen) y como control positivo se utilizó ADN de *L. interrogans* serovar Canicola Hond Utrecht IV. Además, en todas las reacciones se incluyó el control negativo de extracción de ADN. Todos los ensayos se realizaron por

triplicado utilizando un termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Los datos fueron analizados utilizando el software proporcionado con el equipo (StepOne™ Software v.2.2.2, Applied Biosystems, USA).

Las actividades se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Microbiológicos de Alimentos. El mismo cuenta con salas separadas físicamente para la realización de las distintas etapas del diagnóstico mediante PCR como: cabina de preparación de reactivos (mezcla de reacción), cabina de extracción y carga de ADN y cabina de adquisición de imágenes (productos amplificados). Asimismo, se siguió una rutina de trabajo que aseguró que los productos amplificados no puedan regresar a los sectores previos.

1.2.4 Validación en una etapa intralaboratorio

a) Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del ensayo *lipL32*-qPCR con y sin la adición del IPC se utilizaron las cepas de *L. interrogans* serovar Canicola Hond Utrecht IV y serovar Copenhageni M20. El ADN de un cultivo puro fue extraído mediante el método comercial QIAamp DNA minikit (QIAGEN, Germany) como fue mencionado en el punto 1.2.2. La concentración de ADN fue determinada mediante un equipo NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, USA). El número de equivalentes genoma (EG) fue calculado teniendo en cuenta un tamaño de genoma de 4,659 Mb y asumiendo que una copia del genoma corresponde a una bacteria (Ren y col., 2003; Nascimento y col., 2004; Villumsen y col., 2012; Miotto y col., 2017).

Se realizó una curva estándar a partir del ADN de cada una de las cepas mencionadas diluido serialmente en orden de 10 (1×10^6 hasta 1×10^0 EG/reacción), la cual se amplificó y se determinó por triplicado. A partir de la curva estándar se determinó el rango dinámico, sensibilidad analítica, coeficiente R^2 y eficiencia de amplificación para

cada una de las cepas. La eficiencia de amplificación fue determinada a partir de la pendiente de la curva de calibración mediante el software proporcionado con el equipo StepOne™ Software v.2.2.2 (Applied Biosystems, USA) (Bustin y col., 2009).

En nuestro trabajo se consideró como punto de corte para establecer una muestra como positiva, la dilución en la cual el ensayo detectó el ADN *target* en al menos dos de las tres replicas realizadas (OIE, 2008; Ahmed y col., 2009). El valor de corte del ciclo umbral (C_t , del inglés *cycle threshold*) fue determinado calculando el valor de C_t promedio de la última dilución positiva en los replicados de la curva estándar de diferentes corridas (Miotto y col., 2017).

b) Especificidad analítica

Para investigar si la técnica *lipL32*-qPCR amplificaba correctamente el ADN de cepas patógenas de *Leptospira* y no producía amplificación inespecífica de cepas no patógenas y de otros géneros de bacterias, parásitos y hongos se analizó el ADN correspondiente a los microorganismos mencionados en el punto 1.2.1.

Las cepas de *Leptospira* spp., fueron evaluadas a una concentración correspondiente a 1×10^3 EG/reacción (Gentilini y col., 2015).

c) Evaluación de la *lipL32*-qPCR en muestras biológicas contaminadas experimentalmente

Para determinar si los parámetros de sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación eran afectados por el potencial efecto inhibitorio de materiales biológicos como sangre, suero u orina se realizaron ensayos de contaminación experimental utilizando estas matrices.

Las muestras fueron obtenidas de un canino clínicamente sano provenientes de un criadero de la raza Ovejero Alemán que mantenía una colonia cerrada. Para verificar que el animal fuera negativo a leptospirosis se realizó la prueba MAT de acuerdo a las recomendaciones de la OIE, 2008. Una vez confirmado la condición de libre de la enfermedad se extrajeron muestras de sangre y orina para ser utilizadas en los experimentos de contaminación artificial. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena cefálica y se colocaron en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (K3 EDTA, DVS) y en tubos plásticos sin anticoagulante (DVS), mientras que la orina fue recolectada mediante sondaje uretral bajo condiciones asépticas y colocada en frascos recolectores estériles (DVS).

La contaminación experimental de cada una de las muestras biológicas se realizó inmediatamente luego de la extracción con la cepa *L. interrogans* Canicola Hond Utrecht IV proveniente de un cultivo puro de 7 días de incubación a 28 °C. La concentración bacteriana se determinó por conteo utilizando una cámara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, USA) según el protocolo mencionado en el Anexo 3. La concentración se ajustó a 1×10^7 bacterias/ml y se realizaron diluciones en las muestras de sangre con EDTA, sangre sin anticoagulante y orina de acuerdo a la Figura 2:

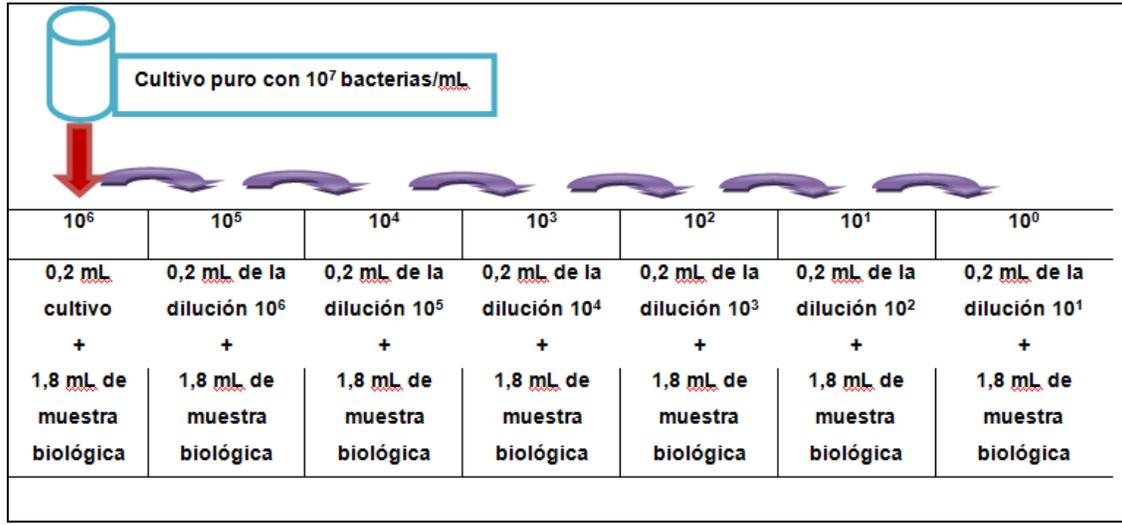


Figura 2: Esquema de dilución bacteriana en las muestras contaminadas experimentalmente (sangre con anticoagulante, suero y orina).

El ADN de cada una de las diluciones (sangre con anticoagulante, suero y orina) se extrajo con un método comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 2). El ADN eluido fue conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se realizaron los ensayos de PCR.

A partir de estas muestras se realizó una curva estándar (1×10^6 hasta 1×10^0 bacterias/ml), la cual se amplificó por triplicado. Las condiciones de ciclado de la PCR y los controles utilizados en cada corrida fueron los mismo que se mencionaron en el punto 1.2.3b). Particularmente en estos ensayos se adicionó un control a la reacción que consistió en el ADN obtenido de cada tipo de muestra (sangre con EDTA, suero y orina) sin contaminar para verificar la ausencia de *Leptospira* spp. De cada curva estándar se determinó el rango dinámico, sensibilidad analítica, coeficiente R^2 y eficiencia de

amplificación. El punto de corte y la fórmula empleada para calcular la eficiencia de amplificación a partir de la pendiente se realizó según lo indicado en el punto 1.2.4a).

d) Comparación de la *lipL32*-qPCR con una técnica de PCR convencional

Para evaluar el desempeño de la técnica *lipL32*-qPCR se compararon los resultados de sensibilidad (cepas de referencia y muestras experimentalmente contaminadas) y especificidad analítica con los resultados obtenidos mediante una PCR convencional (*rrs*-PCR convencional). La misma, fue utilizada previamente por otros autores para la validación de un ensayo de qPCR (Miotto y col., 2017) y se basa en un ensayo género específico que amplifica un fragmento de 331 pb del gen *rrs* (Merien y col., 1992). La amplificación fue realizada según el protocolo original con algunas modificaciones. La mezcla de reacción fue preparada en un volumen de 25 μ l, conteniendo 200 μ M de cada desoxinucleotido trifosfato, 2 mM $MgCl_2$, 1 μ M de cada cebador (A y B), 1U Taq DNA Polymerase (Productos Bio-Lógicos, Argentina) y 5 μ l de ADN molde. El ciclado se realizó con una etapa de activación enzimática de 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, *annealing* a 63 °C durante 60 s, extensión a 72 °C durante 60 s y una extensión final a 72 °C 10 min. Como control negativo se utilizó agua ultra pura (Invitrogen) y como control positivo se utilizó ADN de *L. interrogans* serovar Canicola Hond Utrecht IV. Además, en todas las reacciones se incluyó el control negativo de extracción de ADN. Todos los ensayos se realizaron en triplicado utilizando un termociclador Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler PCR (Bio-Rad, CA, USA). Los productos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 2 % conteniendo bromuro de etidio (1 μ g/ml). Las bandas fueron observadas bajo luz ultravioleta (296 nm) y las imágenes se registraron utilizando el software: Doc-It LS Image Acquisition and Analysis Software (UVP, Upland, CA, USA).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Validación de la técnica *lipL32*-qPCR

a) Sensibilidad analítica

Mediante la técnica de *lipL32*-qPCR estandarizada se obtuvieron los productos de amplificación correspondiente al ADN de las dos cepas evaluadas y al IPC, sin observarse diferencias en el desempeño de la técnica cuando se amplificaron cepas sin añadir el IPC a la reacción y luego de añadir el mismo. El punto de corte para considerar una muestra como positiva, establecido mediante los ensayos de estandarización, se correspondió con un valor de C_t igual o menor a 35.

Para evaluar el efecto de remoción de los inhibidores de la PCR, los valores de C_t del IPC en los ensayos en que se obtuvo un resultado negativo para *Leptospira* spp., fueron comparados con el valor de C_t del pocillo correspondiente al control negativo (Villumnsen y col., 2012). La cantidad mínima de IPC requerida para no generar falsos resultados negativos con la PCR fue la misma que la indicada por el fabricante. La duración de la corrida de PCR fue de aproximadamente 90 min mientras que el diagnóstico completo pudo realizarse en 2 ½ horas.

En ausencia de IPC, la sensibilidad analítica de la técnica de *lipL32*-qPCR fue de 1×10^0 y 1×10^1 EG/reacción para *L. interrogans* serovar Canicola Hond Utrecht IV y serovar Copenhageni M20 respectivamente. Mientras que al utilizar el IPC el valor de este parámetro fue de 1×10^0 EG/reacción para ambas cepas evaluadas. Los valores del rango dinámico, eficiencia de amplificación y coeficiente R^2 para cada una de las cepas evaluadas sin añadir el IPC a la reacción y luego de añadir el mismo se resumen en la

Tabla 5. A modo de ejemplo en la Figura 3, se muestra la curva estándar y la gráfica de amplificación obtenida con la cepa del serovar Canicola luego de añadir el IPC.

Tabla 5: Resultados de rango dinámico, eficiencia de amplificación y coeficiente R^2 obtenido a partir de cepas de referencia mediante la técnica *lipL32*-qPCR.

Cepas de referencias	Rango dinámico	Coefficiente R^2	Eficiencia (%)
Sin adición del IPC			
<i>L. interrogans</i> Canicola HU IV	$10^6 - 10^0$	0,99	100,88
<i>L. interrogans</i> Copenhageni M20	$10^6 - 10^1$	1	100,63
Con adición del IPC			
<i>L. interrogans</i> Canicola HU IV	$10^6 - 10^0$	0,99	100,88
<i>L. interrogans</i> Copenhageni M20	$10^6 - 10^0$	0,99	100

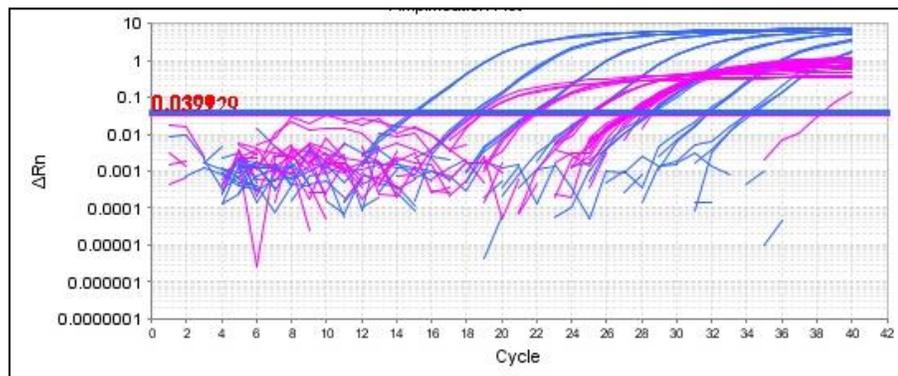
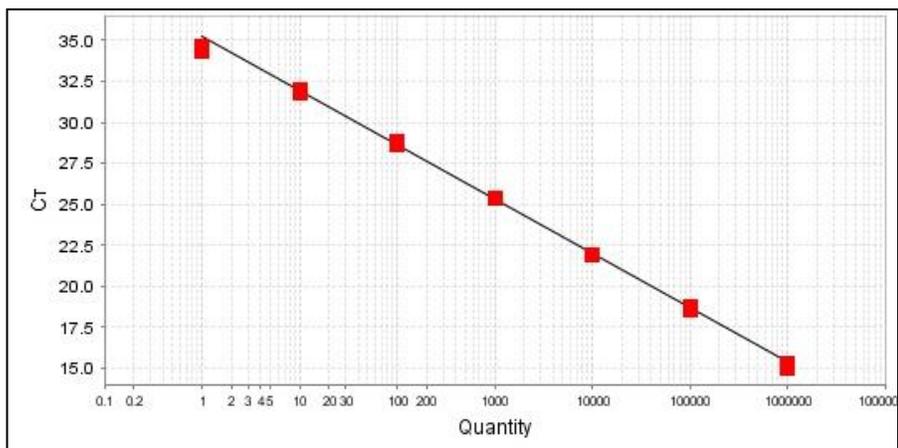


Figura 3: Curva estándar y gráfico de amplificación de la *lipL32*-qPCR a partir de diluciones seriadas del ADN *L. interrogans* serovar Canicola con la adición del IPC a la reacción.

b) Especificidad analítica

Con la utilización de la *lipL32*-qPCR, la totalidad de las cepas patógenas presentaron una señal positiva para el gen *lipL32*, cuando se utilizó el ADN correspondiente a 1×10^3 EG/ reacción, sin observarse amplificación inespecífica de ADN. El promedio de C_t en las cepas evaluadas fue de 24,02.

Al evaluar el ADN de otros microorganismos pertenecientes a distintos géneros de bacterias, parásitos u hongos todas las reacciones fueron negativas.

En todos los ensayos la secuencia del IPC fue positiva demostrando la ausencia de inhibición en las corridas. El promedio de valor de C_t en todos los casos fue de 28.

c) Evaluación de la *lipL32*-qPCR en tiempo real en muestras biológicas contaminadas experimentalmente

La sensibilidad analítica de la *lipL32*-qPCR a partir de estas muestras fue de 1×10^2 bacterias/ml en sangre con anticoagulante y 1×10^3 bacterias/ml en suero. Mientras que, en las muestras de orina, la sensibilidad analítica fue 1×10^1 bacterias /ml). Las muestras de sangre con anticoagulante, suero y orina del canino sin contaminar fueron negativas.

La secuencia del IPC fue positiva en todas las corridas realizadas demostrando la ausencia de inhibición en las corridas. El promedio de valor de C_t en todos los casos fue de 28.

Los resultados del rango dinámico, coeficiente R^2 y eficiencia de amplificación para las muestras de sangre con anticoagulante, suero y orina contaminadas experimentalmente se muestran en la Tabla 6. La Figura 4 muestra la curva estándar obtenida con cada una de las muestras contaminadas experimentalmente.

Tabla 6: Resultados de rango dinámico, eficiencia de amplificación y coeficiente R² obtenido a partir de muestras contaminadas experimentalmente.

	Rango dinámico	Coeficiente R ²	Eficiencia (%)
Muestras			
Sangre con EDTA	1x10 ⁶ -1x 10 ²	0,992	99,07
Suero	1x10 ⁶ -1x 10 ³	0,99	93,07
Orina	1x10 ⁶ -1x 10 ¹	0,999	112,5

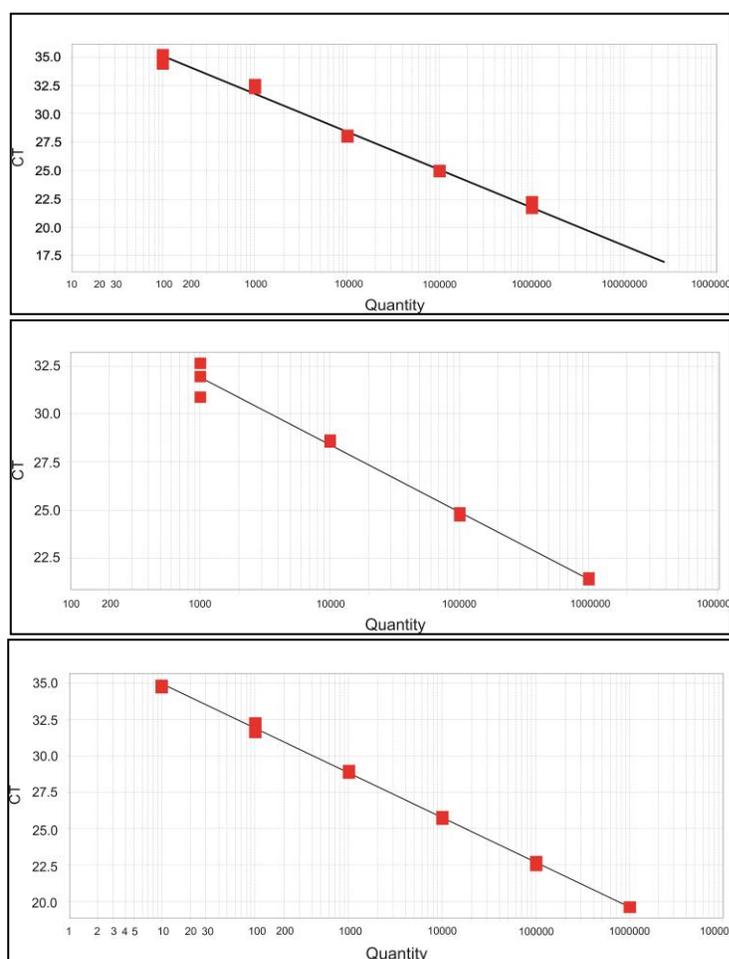


Figura 4: Curva estándar de la *lipL32*-qPCR a partir de diluciones seriadas de *Leptospira* spp. en las muestras contaminadas experimentalmente (sangre con anticoagulante, suero y orina).

d) Comparación de la *lipL32*-qPCR con la técnica *rrs*-PCR convencional

La sensibilidad analítica de la *rrs*-PCR convencional a partir del ADN de las cepas de referencia fue de 1×10^1 EG/reacción, siendo menos sensible que la *lipL32*-qPCR. En las muestras contaminadas experimentalmente se obtuvo la misma sensibilidad analítica al evaluar las muestras de suero siendo la misma de 1×10^3 bacterias/ml. Mientras que en sangre fue de 1×10^3 bacterias/ml y en orina de 1×10^2 bacterias/ml, ambos valores mayores que los obtenidos con la *lipL32*-qPCR. Con respecto a la especificidad no se observaron diferencias con la técnica *lipL32*-qPCR excepto para la amplificación de las especies saprófitas *L. meyeri* serovar Ranarum y *L. biflexa* serovar Patoc, que en este caso fueron positivas.

1.4 DISCUSIÓN

El manejo y tratamiento adecuado de caninos con leptospirosis requiere de un correcto y temprano diagnóstico, motivo por el cual, la aplicación de una técnica de qPCR representa una alternativa útil en comparación a los métodos convencionales (Harkin y col., 2003b; Ahmed y col., 2012). En este estudio la técnica *lipL32*-qPCR descripta presentó una alta sensibilidad analítica a partir de cepas de referencia coincidiendo con los resultados obtenidos en estudios previos realizados en humanos y caninos (Villumsen y col., 2012, Xu y col., 2014 Fink y col., 2015, Recavarren y col., 2015; Miotto y col., 2017). Asimismo, la importancia de establecer un valor de corte durante la validación del ensayo con el fin de evitar resultados falsos positivos, ya ha sido demostrada por otros autores (Charles y col., 2011; Gentilini y col., 2015; Miotto y col., 2017). En este trabajo, la realización de los ensayos de sensibilidad y especificidad analíticas permitieron definir un

correcto valor de corte (valores de C_t iguales o menores a 35) para considerar posteriormente una muestra como positiva.

Por otra parte, la incorporación del IPC en el ensayo *lipL32*-qPCR permitió verificar si la eficiencia de amplificación había sido afectada durante el proceso. En este contexto, algunos investigadores han utilizado cebadores dirigidos a fragmentos de genes endógenos, tales como los que codifican enzimas del metabolismo celular (glicerol-aldehído-fosfato deshidrogenasa o citocromo C oxidasa) como control interno de amplificación (Barker y col., 2010, Recavarren y col., 2015). Esta opción presenta la ventaja de evaluar la presencia de inhibidores y el procedimiento de extracción de ADN en aquellas muestras que cuentan con la presencia de células somáticas (sangre entera o tejidos). Sin embargo, no es útil para muestras como suero y orina debido a que la presencia de células en este tipo de muestras es usualmente baja (Gentilini y col., 2015). Por lo tanto un resultado negativo para el control de amplificación puede ser erróneamente analizado como inhibición. En nuestro estudio la incorporación de un control interno de amplificación exógeno, permitió evitar la necesidad de contar con la presencia de células somáticas para una correcta amplificación. Con este enfoque obtuvimos un resultado positivo de amplificación del IPC en todas las reacciones, demostrando la ausencia de inhibidores en las corridas. En contraste Recavarren y col., (2015), utilizaron un control interno de amplificación endógeno y tuvieron que excluir de su estudio 37 muestras de suero debido a que la amplificación del control interno no fue adecuada (valor de C_t por encima de 35).

Con respecto a la especificidad analítica, al igual que lo reportado en publicaciones previas, todas las cepas patógenas evaluadas fueron correctamente amplificadas en una concentración de 1×10^3 EG/reacción. Mientras que se obtuvo un resultado negativo al

evaluar el resto de los microorganismos que podrían estar presentes en las muestras clínicas y causar amplificación inespecífica (Rojas y col., 2010; Gentilini y col., 2015).

Cabe mencionar en este aspecto, que la utilización de ensayos de PCR dirigidos a un fragmento del gen *lipL32* presenta como limitante la incapacidad de detectar especies de *Leptospira* clasificadas como intermedias, debido a que carecen de dicho gen (Haake y col., 2000). No obstante, el rol que cumplen estas especies en la epidemiología y enfermedad clínica de los caninos y humanos, aún es incierto. Algunos autores han reportado la presencia de estas especies en cuadros clínicos humanos (Levett, 2006; Slack y col., 2008; Balamurugan y col., 2013). Asimismo, en países como Irán y Ecuador se ha reportado la presencia de *L. wolffii* y *L. inadai* en muestras caninas (Zaqueri y col., 2010; Chiriboga y col., 2015), sin embargo, en caninos de nuestra región sólo se ha reportado la circulación de *L. interrogans* (Grune-Löffler y col., 2014). Recientemente, Chiani y col., (2016) caracterizaron cepas aisladas de casos humanos en Argentina, demostrando la presencia de dos especies intermedias *L. wolffii* y *L. broomii*. En su estudio *L. broomii* fue aislada de un paciente que requirió hospitalización sin signos de enfermedad severa. Por el contrario, *L. wolffii* fue aislada de un caso fatal de síndrome respiratorio, sin embargo el suero de ese paciente fue positivo mediante una técnica de PCR a *L. interrogans*, apoyando la idea de la doble infección y de que la severidad del cuadro fue causada probablemente por *L. interrogans*. Por todo lo expuesto, se requieren estudios adicionales para esclarecer su rol en esta enfermedad.

La realización de ensayos de sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación en muestras de sangre con anticoagulante, suero y orina contaminadas experimentalmente, es relevante ya que la matriz a partir de la cual se extrae el ADN puede presentar sustancias que actúen como inhibidores de la PCR, modificando los valores obtenidos con cepas de referencia (Branger y col., 2005). En nuestro trabajo la técnica *lipL32*-qPCR

mostró valores de sensibilidad analítica en muestras de sangre con anticoagulante de 1×10^2 bacterias/ml, coincidiendo con estudios realizados por Bourhy y col., (2011) y Stoddard y col., (2009). Mientras que en las muestras de suero, los valores de sensibilidad analítica (1×10^3 bacterias/ml) y eficiencia de amplificación (93,07 %) fueron menores que aquellos obtenidos en sangre entera. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Bourhy y col., (2011) y Stoddard y col., (2009) quienes han reportado hallazgos similares a los nuestros. Una posible explicación de este hecho es que las bacterias podrían quedar retenidas en el coágulo sanguíneo y por lo tanto disminuir su número en la fracción de suero que se utiliza para la extracción del ADN (Stoddard y col., 2009). En muestras de orina, la técnica *lipL32*-qPCR demostró una sensibilidad y eficiencia de amplificación de 1×10^1 bacterias/ml y 112 % respectivamente, resultados similares a los reportados en humanos y en otros estudios realizados en ratas (Smythe y col., 2002; Stoddard y col., 2009, Rojas y col., 2011).

Al evaluar el desempeño de la técnica *lipL32*-qPCR descrita en nuestro estudio en comparación con una PCR convencional utilizada previamente por Miotto y col., (2017) para validar su ensayo de una qPCR, obtuvimos valores de sensibilidad analítica superiores mediante la técnica *lipL32*-qPCR. No obstante, al comparar los resultados obtenidos con la PCR convencional utilizada en nuestro estudio, la sensibilidad analítica en las muestras de orina fue mayor que la reportada por Miotto y col., (2017) quien obtuvo un valor de 1×10^4 bacterias/ml. Asimismo, otros autores que han utilizado una PCR convencional con cebadores desarrollados por Gravekamp y col (1993) para la detección de *Leptospira* spp., en orina de humanos y caninos obtuvieron resultados positivos a partir de 1×10^4 bacterias/ml (Luchessi y col., 2004; Fink y col., 2015).

1.5 CONCLUSIONES

- Para la obtención de un valor de corte adecuado en la implementación de la técnica de PCR en tiempo real es recomendable realizar ensayos de estandarización y validación en una etapa intralaboratorio, lo cual evita resultados falsos positivos causados por amplificaciones inespecíficas.

- En los ensayos de PCR se debe incluir un control interno de amplificación que permita verificar la ausencia de inhibición en las corridas. Asimismo, la utilización de un control de amplificación externo hace innecesaria la presencia de células somáticas en las muestras para una correcta amplificación.

-Se recomienda el método de extracción y purificación de ADN comercial utilizado en este trabajo para las muestras biológicas de sangre, suero y orina debido a que permitió eliminar eficazmente la presencia de sustancias inhibitorias.

- Los ensayos de contaminación experimental en muestras de sangre con EDTA, suero y orina permitieron conocer la sensibilidad analítica en cada tipo de muestra biológica demostrando que el suero no constituye la fracción de elección.

- De acuerdo a la sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación de la *lipL32*-qPCR obtenida en las muestras contaminadas experimentalmente, la orina constituye la muestra de elección. Además, teniendo en cuenta la patogenia de la enfermedad, el ADN bacteriano puede ser encontrado por más tiempo en orina que en sangre o suero por lo cual se refuerza la utilidad de esta técnica en la muestra mencionada para la detección de *Leptospira* spp.

-La técnica *lipL32*-qPCR demostró ser más sensible que la técnica *rrs*-PCR convencional y permitió realizar la prueba en un menor tiempo y sin riesgo de contaminación del ambiente con productos amplificados.

Aplicación de la técnica de PCR en tiempo real en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis

2.1 INTRODUCCIÓN

Para la confirmación de casos sospechosos de leptospirosis canina como se ha mencionado, se combinan los datos obtenidos mediante la anamnesis, el examen físico, estudios hematológicos, bioquímica clínica y urianálisis para arribar al diagnóstico presuntivo. En este contexto, los estudios de laboratorio clínico constituyen pruebas complementarias utilizadas de rutina para la aproximación diagnóstica en diversas patologías. Asimismo, contribuyen a una caracterización rápida del estado clínico del animal permitiendo elaborar un pronóstico más certero (Gualtieri y col., 2012).

Posteriormente, la confirmación del diagnóstico de leptospirosis se realiza mediante la prueba de MAT, en donde se evalúan muestras del paciente en el periodo agudo y convaleciente de la enfermedad para evidenciar seroconversión (aumento de 4 veces en el título de anticuerpos entre ambas muestras) (Schuller y col., 2015). No obstante, los anticuerpos pueden no ser detectables hasta 13 días post-infección lo que conlleva a que ciertos pacientes no reciban el diagnóstico correcto si los títulos convalecientes no son evaluados (Brown y col., 1996; Harkin y col., 2003b). Es en este aspecto donde el desarrollo de diversos protocolos de PCR representa, una alternativa útil como complemento de la serología para la confirmación del caso sospechoso, aunque aún existen controversias al respecto. (Harkin y col., 2003b; Stoddard y col., 2009; Fraune y col., 2013; Miotto y col., 2017).

Por lo mencionado en esta sección se implementó la técnica *lipL32*-qPCR validada en una etapa intralaboratorio en muestras de pacientes (sangre con anticoagulante, suero y orina) con sospecha clínica de la enfermedad en comparación con la prueba de MAT, el cultivo bacteriano y la técnica *rrs*-PCR convencional. Asimismo, con el fin de evaluar los factores de riesgo, signos clínicos y hallazgos de laboratorio asociados a leptospirosis en caninos, se completó una ficha clínica epidemiológica de cada paciente.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Muestras clínicas incluidas en el estudio

En el trabajo se incluyeron muestras provenientes de caninos atendidos en el Hospital Escuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina bajo el consentimiento informado del propietario. El cálculo del tamaño de la muestra se realizó según Faine, (1982) (Figura 5) para lo cual se tuvo en cuenta una prevalencia serológica de leptospirosis del 25 % (Arias y col., 2005, Martín y col., 2014).

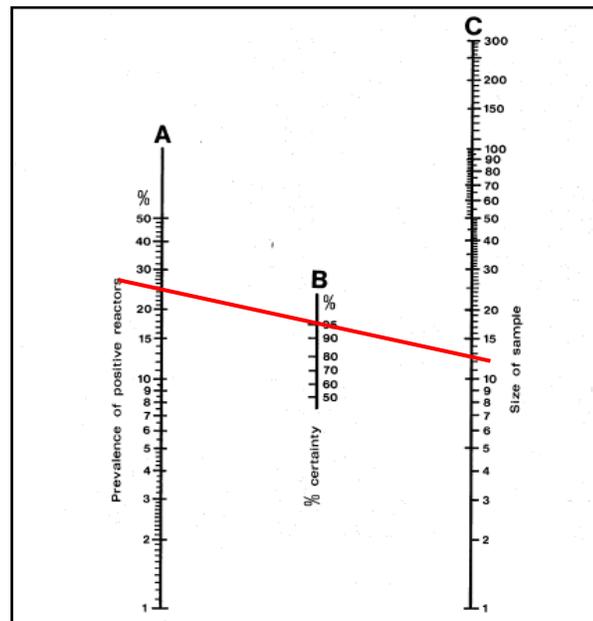


Figura 5: Tamaño de muestra, porcentaje de certeza e incidencia para la realización de estudios serológicos o de otro tipo aplicado a poblaciones (Adaptado de Faine, 1982).

Se incluyeron sólo los caninos con diagnóstico clínico presuntivo de leptospirosis que procedían de las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada, que no habían recibido tratamiento con antimicrobianos y para los cuales se pudieron realizar en forma completa la encuesta epidemiológica, el examen clínico y la extracción de las muestras biológicas requeridas para el estudio (sangre con anticoagulante EDTA, sangre sin anticoagulante y orina).

Para la clasificación de la población en estudio se adoptó la definición de caso basada en la Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en pequeños animales publicada por el Ministerio de salud:

- Caso confirmado: fueron definidos como aquellos pacientes con signos clínicos y epidemiología compatible con leptospirosis (exposición a inundaciones, barro, basurales o contacto con aguas estancadas, contacto con animales enfermos o roedores). Sumado a: 1) En la prueba de MAT con una única muestra con resultado positivo con un título mayor o igual a 800 en uno o más serovares, sin antecedentes de haber recibido vacuna reciente contra la enfermedad. 2) Seroconversión a MAT, demostrado por el aumento de al menos dos títulos entre muestras pareadas extraídas con un intervalo de 15 días. 3) Aislamiento bacteriano en cultivo en medios especiales y/o detección de ADN de *Leptospira* spp., por medio de PCR de sangre, orina y material de necropsia.
- No caso: fueron definidos como aquellos pacientes que teniendo diagnóstico clínico presuntivo de leptospirosis no cumplían con los criterios de laboratorio mencionados para la confirmación de la enfermedad.

De cada paciente se obtuvieron los siguientes datos:

- Datos epidemiológicos: utilidad de la mascota, hábitos callejeros, contacto con basurales, contacto con roedores o presencia de aguas estancadas cerca de la vivienda (Rubel y col., 1997).
- Datos de la historia clínica: raza, sexo, edad, signos clínicos como anorexia, decaimiento, vómitos, diarreas, poliuria-polidipsia, pérdida de peso, ictericia, melena, conjuntivitis, congestión de vasos episclerales, necrosis lingual, disnea, dolor abdominal, dolor lumbar, mialgia y/o abortos (Birnbbaum y col., 1998; Knöpfler y col., 2017).

Una vez obtenidas las muestras, fueron ingresadas y codificadas en la base de datos del Servicio Central de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. El procesamiento de las mismas se realizó dentro de las 6 horas de extracción e incluyó la realización de estudios hematológicos, bioquímicos y análisis orina en primera instancia. Simultáneamente, se separaron alícuotas de cada tipo de muestra para la realización de la técnica *lipL32*-qPCR, *rrs*-PCR convencional, la prueba de MAT y aislamiento bacteriano.

2.2.2 Estudios hematológicos

El hemograma se realizó a partir de la sangre con anticoagulante EDTA respetando la relación sangre/anticoagulante. Para el procesamiento de las muestras se utilizó un Contador Celular Sysmex K-20, con el cual se determinaron los siguientes parámetros:

- Hematocrito (%)
- Dosaje de la concentración de hemoglobina (g/dl)
- Recuento de eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$)
- Recuento de leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)

- Índices hematimétricos: volumen corpuscular medio (VCM); hemoglobina corpuscular media (HbCM) y concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHbC)
- Recuento de Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)

Todos los valores de hematocrito obtenidos con el contador celular se corroboraron manualmente a través del uso de una microcentrífuga marca Rolco con ábaco incorporado (12.000 rpm durante 5 min) como control de calidad. Luego, a partir del plasma del tubo del microhematocrito se midieron los sólidos totales mediante refractometría. Por último se realizó el frotis sanguíneo. Los mismos fueron teñidos con el colorante May Grünwald (Merk®) durante 5 min. Luego se les agregó solución *buffer* (pH 7,5) sin lavar el colorante anterior por 5 min más. Pasado ese tiempo se lavó con agua de la canilla y se cubrieron con el colorante Giemsa (Merk®) diluido (1 ml de *buffer* / 2 gotas de Giemsa), durante 20 min. Por último se lavaron y dejaron secar a temperatura ambiente hasta su lectura. Todos los frotis fueron observados con un microscopio Nikon ECLIPSE E400, (1000X) para la obtención de la fórmula leucocitaria relativa (FLR), fórmula leucocitaria absoluta (FLA) y morfología de las células sanguíneas. Los resultados se expresaron siguiendo las normas vigentes en hematología clínica (Weiss & Wardrop., 2010).

2.2.3 Estudios bioquímicos

Se realizaron a partir de las muestras de sangre sin anticoagulante. Las mismas fueron colocadas en un baño térmico a 37 °C durante 15 min y luego centrifugadas durante 10 min a 3000 rpm. Una vez separado el suero se colocó en tubos *ependorf* y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento. Se determinó la concentración de 6 parámetros bioquímicos, utilizando los siguientes métodos: glucosa, (glucosa

oxidasa/peroxidasa); urea, (punto final); creatinina, (Jaffe-cinética); alanino amino transferasa (IFCC-UV) y Proteínas (Biuret) y albúminas (bromocresolftaleína). Para el procesamiento, se utilizaron reactivos de Lab. Wiener®/ Lab. Biosystems® y un autoanalizador marca Incca. Los resultados se expresaron siguiendo las normas vigentes en bioquímica clínica (Kaneko, 1997).

2.2.4 Análisis de orina

Se realizó a partir de la muestra de orina recolectada en recipientes estériles de poliestireno con tapa a rosca de cierre hermético (DVS). El procesamiento físico químico y del sedimento urinario se realizó dentro de las 6 horas a partir de su extracción.

En el examen físico de la orina se consignó:

- Aspecto: (límpido, ligeramente turbio y turbio)
- Color: (normal: amarillo ámbar; anormal: otros colores)
- Densidad: (realizada por refractometría)

El examen químico se realizó mediante tiras reactivas (Multistix 10 SG Laboratorio Bayer) determinando los siguientes parámetros:

- Proteínas
- pH
- Glucosa
- Cuerpos cetónicos
- Bilirrubina
- Sangre
- Urobilinógeno
- Leucocitos
- Nitritos

Para la observación del sedimento urinario se colocaron 5 ml de orina en un tubo cónico de centrifuga centrifugándose durante 10 min a 2000 rpm, descartándose el

sobrenadante. Una gota del sedimento fue colocada entre porta y cubreobjetos observándose en un microscopio Nikon ECLIPSE E400, (400X). Se registró la presencia de los diferentes elementos orgánicos e inorgánicos a través de la siguiente planilla.

Planilla de trabajo para la observación del sedimento urinario:

Células epiteliales	Eritrocitos Leucocitos	Fibras de Mucus	Cristales	Cilindros	Bacterias
Escamosas Transición Renales	Número de células por campo				
Escasa: < 5 x campo	1 <5 x campo	Escasa	Escasa	Escasa	Ausencia
Regular: 5-10 x campo		Regular	Regular	Regular	Presencia
Abundante: >10 x campo		Abundante	Abundante	Abundante	
Observaciones					

2.2.5 Prueba de MAT en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis

Se realizó a partir de la alícuota de suero de los pacientes caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis. Para llevar a cabo la prueba de MAT se emplearon como antígenos vivos 6 serovares de *Leptospira* (Tabla 7).

Tabla 7: Cepas de *Leptospira* utilizadas para la prueba serológica de MAT.

Serogrupo	Serovar	Cepa	Especie
Ballum	Castellonis	Castellon 3	<i>L borgpetersenii</i>
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	<i>L interrogans</i>
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	<i>L interrogans</i>
Pomona	Pomona	Pomona	<i>L interrogans</i>
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	<i>L interrogans</i>
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	<i>L kirschneri</i>

El suero de cada paciente se enfrentó con los distintos antígenos para verificar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp., partiendo de una dilución 1:100. Luego de incubar la mezcla 1 h a 37 °C se observó con microscopio de fondo oscuro en búsqueda de aglutinación. Se consideró reactivo un suero que aglutina el 50 % de *Leptospira* spp., en comparación con un testigo. Aquellos sueros que reaccionaron en la primera prueba fueron diluidos en progresión geométrica en base 2 hasta la última dilución que presentó la aglutinación mencionada y fue considerada como título final.

2.2.6 Aislamiento bacteriano en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis.

Se realizó a partir de alícuotas de sangre y orina de los pacientes caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis.

- Muestra de orina: Para la recolección de las muestras de orina se entregó a cada veterinario un tubo falcon de 15 ml conteniendo solución de buffer fosfato (PBS) doble concentración con el fin de atenuar el efecto nocivo del pH. Una vez llegada la muestra al laboratorio se sembró asépticamente 1ml previo pasaje por filtro Millipore (0,22 µm) en el primero de una serie de cuatro tubos de medio de cultivo de Fletcher. A continuación se realizaron diluciones 1:10 en los tubos siguientes.
- Muestras de sangre: Para la realización del aislamiento a partir de las muestras de sangre se partió de un tubo con de medio de cultivo Fletcher entregado a cada veterinario actuante con el fin de colocar 2 gotas de sangre en forma estéril en el mismo. Una vez llegados al laboratorio se retiró la tapa en forma estéril y se sembró la muestra en una serie de cuatro tubos como fue descrito para la muestra de orina.

Luego de la siembra los tubos fueron incubados a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y examinados semanalmente por microscopía de fondo oscuro durante un periodo de 6 meses. Al cabo de este periodo se descartaron los tubos que no presentaron desarrollo bacteriano.

2.2.7 Técnica *lipL32*-qPCR en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis

Se utilizaron muestras de sangre con EDTA, suero y orina de cada paciente incluido en el estudio. El ADN fue extraído de cada alícuota utilizando el método comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 2). El ADN eluido fue mantenido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los ensayos de PCR en tiempo real.

Previamente a la extracción de ADN, las muestras de orina fueron procesadas según el protocolo descrito por Luchessi y col., (2004) con el fin de aumentar las probabilidades de detección de *Leptospira* spp., de la siguiente manera: se partió de 10 ml de orina la cual fue centrifugada utilizando una centrifuga marca Rolco a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente el sobrenadante fue colocado en tubos *ependorf* de 1,5 ml y se centrifugaron nuevamente a 13.000 rpm durante 30 min. El *pellet* resultante fue resuspendido en 200 μl de PBS.

Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado siguiendo el protocolo validado mencionado en la Sección 1. Las muestras fueron consideradas como positivas cuando dos o más reacciones de las réplicas presentaban un valor de C_t por debajo del valor de corte establecido (Ahmed y col., 2009; Miotto y col., 2017). El paciente se consideró como positivo cuando se observó el resultado mencionado en alguna de las muestras de sangre con EDTA, suero u orina (Knöpfler y col., 2017).

Con el fin de evaluar el desempeño de la técnica de *lipL32*-qPCR, las muestras de los pacientes también fueron evaluadas mediante la *rrs*-PCR convencional siguiendo el protocolo mencionado en la sección 1.

2.2.8 Análisis estadístico

a) Se realizó un análisis descriptivo mediante el cálculo de las proporciones y promedio de: los datos epidemiológicos, historias clínicas, resultados hematológicos, bioquímicos, urianálisis, prueba de MAT, aislamiento y técnicas *lipL32*-qPCR y *rrs*-PCR convencional.

La prueba exacta de Fisher fue utilizada para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de pacientes con respecto a los datos epidemiológicos, signos clínicos y hallazgos de laboratorio.

El valor de *Odss ratio* e Intervalo de Confianza 95 % fueron utilizados para estimar la asociación entre las variables dependientes (caso confirmado/no caso) y las variables independientes relevadas en los datos epidemiológicos (factores de riesgo).

b) La comparación entre la técnica de *lipL32*-qPCR y la prueba de MAT; la técnica *rrs*-PCR convencional y la prueba de MAT y entre ambas PCR se determinó mediante el cálculo del índice Kappa con 95 % de intervalo de confianza. De acuerdo a los valores de Kappa la concordancia entre los ensayos fue clasificada como: 0–0.20 escasa, 0.21– 0.40 leve, 0.41–0.60 moderada, 0.61–0.80 fuerte y 0.81–1 perfecta (Landis & Koch, 1977).

Todos los análisis fueron realizados utilizando software de dominio público (Vccstat v3.0, Epidat 4.2, Open Epi 2.03).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Muestras clínicas incluidas en el estudio

Se incluyeron un total de 51 caninos con sospecha clínica de leptospirosis de los cuales 7 fueron considerados como confirmados mediante la prueba de MAT de acuerdo al criterio adoptado (13,7 %). Mientras que, tomando en conjunto los resultados de la prueba de MAT y de la *lipL32*-qPCR, el número de casos confirmados fue de 9 (17,6 %). El resto de los 42 pacientes fueron considerados como no casos (82,4 %).

Con respecto a la procedencia de los pacientes sospechosos, el mayor porcentaje fue de la ciudad de La Plata (45,09 %), seguido de Ensenada (37,25 %) y Berisso (17,64 %). Mientras que en los casos confirmados el porcentaje fue mayor en Berisso (33,3 %) seguido de Ensenada (15,8 %) y La Plata (13 %).

El total de la población de caninos estuvo representada por pacientes entre 6 meses y 14 años de edad con 27 machos (52,9 %) y 24 hembras (47,1 %). Con respecto a la raza, 27 pacientes fueron puros (52,9 %) y 24 mestizos (47,1 %). En el grupo de casos confirmados el rango de edad estuvo representado por pacientes entre 6 meses y 8 años con un valor promedio de 5,3 años. Seis de 9 pacientes confirmados fueron de sexo macho (66,7 %) y 3 fueron hembras (33,3 %). En relación a la raza 5 de 9 fueron mestizos (55,6) y 4 de raza pura (44,4 %). El porcentaje de machos y mestizos entre los casos confirmados fue mayor que en el grupo de los no casos, no obstante las diferencias no fueron significativas (Tabla 8).

Los datos epidemiológicos correspondientes a la encuesta demostraron que en el total de la población canina con sospecha clínica de leptospirosis el 94,1 % estuvo representado por mascotas utilizadas como compañía siendo baja la frecuencia de animales destinados a guardia, caza o pastoreo (1,96 % en cada uno). Otras variables en orden decreciente de frecuencia de aparición fueron contacto con roedores (70,6 %),

hábitos callejeros (43,1 %), cercanía de aguas estancadas (31,4 %) y contacto con basurales (23,5 %).

En el grupo de animales considerados como casos confirmados el mayor porcentaje fue de animales utilizados como compañía (88,9 %) mientras que sólo un canino era destinado a actividades en ambientes rurales (pastor) (11,1 %). Con respecto a las variables sexo macho, raza indefinida (mestizos), hábitos callejeros, contacto con roedores y contacto con aguas estancadas se observó un mayor porcentaje en el grupo de caninos considerados como casos confirmados en comparación con el grupo de no casos. No obstante la asociación de la leptospirosis con las variables mencionadas no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabla 8).

Tabla 8: Variables independientes relevadas en las encuestas.

Variable	Casos confirmados		No casos		Odds ratio (95% IC)	Valor de p
	Nº respuestas	Nº (%)	Nº respuestas	Nº (%)		
Sexo macho	9	6 (66,7)	42	21 (50)	2,00 (0,44-9,07)	0,5931
Raza mestiza	9	5 (55,6)	42	19 (45,2)	1,51 (0,35-6,44)	0,8430
Hábitos callejeros	9	6 (66,7)	42	16 (38,1)	3,25 (0,71-14,85)	0,2312
Exposición a Roedores	9	7 (77,8)	42	29 (69)	1,57 (0,29-8,61)	0,9365
Basurales	9	2 (22,2)	42	10 (23,8)	0,91 (0,16-5,13)	0,9999
Aguas estancadas	9	5 (55,6)	42	11 (26,2)	3,52 (0,80-15,53)	0,1896

En la evaluación clínica, del total de la población canina con sospecha clínica de leptospirosis los signos observados fueron anorexia (78,4 %), decaimiento (76,5 %) y vómitos (58,8 %). Seguidos de dolor abdominal (25,5 %), pérdida de peso, polidipsia-poliuria (23,5 %), diarrea e ictericia (21,6 %). Otros de menor presentación incluyeron hipertermia (15,7 %), congestión de vasos epiesclerales (15,7 %), dolor lumbar (11,7 %), mialgias (11,7 %), conjuntivitis (9,8 %), disnea (9,8 %), melena (7,8 %), hemorragias (5,9 %) y necrosis lingual (3,9 %).

En el grupo de animales considerados como casos confirmados se observó un mayor porcentaje de signos clínicos como anorexia, decaimiento, vómitos, diarrea, polidipsia-poliuria, ictericia, hemorragias, conjuntivitis, congestión de vasos epiesclerales, necrosis lingual, dolor abdominal, dolor lumbar y mialgias que en el grupo de no casos. No obstante, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($p>0.05$). La presencia de disnea o aflicción respiratoria no fue observada en ninguno de los casos confirmados. Asimismo, en ninguna hembra de la población estudiada se registró el aborto como signo clínico (Tabla 9).

Tabla 9: Signos clínicos en el grupo de caninos considerados como casos confirmados y no casos de leptospirosis.

Signos clínicos	Casos confirmados		No casos		Valor de <i>p</i>
	Nº respuestas	Nº positivos	Nº respuestas	Nº positivos	
Anorexia	9	8 (88,8)	42	32 (76,2)	0,735
Decaimiento	9	9 (100,0)	42	30 (71,4)	0,133
Vómitos	9	6 (66,6)	42	24 (57,1)	0,890
Diarrea	9	3 (33,3)	42	8 (19,0)	0,590
Polidipsia-poliuria	9	3 (33,3)	42	9 (21,4)	0,780
Pérdida peso	9	3 (33,3)	42	15 (35,7)	0,999
Ictericia	9	2 (22,2)	42	9 (21,4)	0,999
Hemorragias	9	2 (22,2)	42	1 (2,4)	0,153
Conjuntivitis	9	1 (11,1)	42	4 (9,5)	0,999
Congestión de vasos epiesclerales	9	3 (33,3)	42	5 (11,9)	0,273
Necrosis lingual	9	1 (11,1)	42	1 (2,4)	0,649
Disnea	9	-	42	5 (11,9)	-
Dolor abdominal	9	2 (22,2)	42	6 (14,3)	0,866
Dolor lumbar	9	2 (22,2)	42	4 (9,5)	0,567
Mialgias	9	2 (22,2)	42	4 (9,5)	0,567

2.3.2 Estudios hematológicos

Los valores hematológicos promedios obtenidos en la población canina total con sospecha clínica de leptospirosis fueron 38,8 % de hematocrito, $22,1 \times 10^3$ células/ μ l en el recuento de leucocitos y $21,7 \times 10^3$ plaquetas/ μ l en el recuento de plaquetas.

En el grupo de casos confirmados el valor promedio de hematocrito fue de 43 % no registrándose anemia en ningún paciente. Por el contrario, el 42,9 % de los pacientes considerados como no casos presentaron anemia con diferencias significativas entre ambos grupos (p 0,025) (Tabla 10).

En relación a los hallazgos de la serie blanca, en el 55,6 % de los casos confirmados se observó leucocitosis neutrofílica, siendo en tres animales con desvío a la

izquierda (presencia de neutrófilos en banda > a 500 células/ μl) mientras que en el resto la neutrofilia fue a expensas de neutrófilos maduros. Por otro lado, en el grupo de los caninos considerados como no casos, la leucocitosis se observó en el 40,5 % de los pacientes, no obstante las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($p>0,05$) (Tabla 10).

El valor promedio de plaquetas se encontró por debajo del rango de referencia (VR: $200-500 \times 10^3$ plaquetas/ μl) observándose trombocitopenia en el 55,6 % de los pacientes considerados como casos confirmados. En dos de los pacientes de este grupo la trombocitopenia fue marcada con recuentos de 18×10^3 y 68×10^3 plaquetas/ μl . Mientras que en los pacientes considerados como no casos la trombocitopenia se observó en el 52,4 %, sin diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 10).

Tabla 10: Hallazgos hematológicos en el grupo de caninos considerados como casos confirmados y no casos de leptospirosis.

Parámetros	Casos confirmados (9)		No casos (42)		Valor de p
	Promedio	Nº positivos	Promedio	Nº positivos	
Hematocrito (%)	43	-	37,5	18 (42,9)	0,025
Recuento de leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	23	5 (55,6)	21,9	17 (40,5)	0,642
Recuento de plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	18,4	5 (55,6)	22,3	22(52,4)	0,999

2.3.3 Estudios bioquímicos

Los resultados de las variables bioquímicas analizadas en la población canina total con sospecha clínica de leptospirosis indicaron que los valores de urea, creatinina y ALT se presentaron aumentados en el 76,5; 53 y 35,3 % respectivamente.

Al evaluar la función renal se observaron diferencias significativas entre ambos grupos debido, a que el 100 % de los caninos del grupo de animales considerados como confirmados presentaron aumento de la urea y creatinina, mientras que en el grupo de no casos el aumento de los metabolitos mencionados se observó en el 57,1 % y 42,8 %

respectivamente. Con respecto a la actividad aumentada de la ALT se observó un mayor porcentaje en el grupo de casos confirmados, no obstante las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) (Tabla 11). En los pacientes del grupo de casos confirmados el resultado obtenido en el resto de los metabolitos evaluados se mantuvieron dentro del rango de referencia.

Tabla 11: Resultados bioquímicos en el grupo de caninos considerados como casos confirmados y no casos de leptospirosis.

Parámetros	Casos confirmados		No casos		Valor de p
	Promedio	Nº positivos	Promedio	Nº positivos	
Urea-(mg/dl)	192,7	9 (100)	168,6	24 (57,1)	0,025
Creatinina(mg/ml)	7,9	9 (100)	4,5	18 (42,8)	0,003
ALT(UI)	95	4 (44,4)	183,2	16 (38,1)	0,724

2.3.4 Análisis de orina

En el total de la población de caninos con sospecha de leptospirosis se observó que el 43 %, presentó una densidad urinaria por debajo del valor de referencia para la especie (VR: >1020). En el grupo de caninos considerados como casos confirmados se evidenció que un mayor porcentaje de pacientes presentaban disminución de la densidad urinaria y proteinuria con respecto al grupo de no casos, no obstante las diferencias observadas no fueron significativas (Tabla 12).

Los hallazgos en el sedimento urinario no fueron relevantes (sedimento inactivo) excepto para un canino del grupo considerado como confirmado, el cual presentó abundante cantidad de cilindros granulosos gruesos y finos y regular cantidad de células renales y de transición.

Tabla 12: Resultados del análisis físico-químico de la orina en el grupo de caninos considerados como casos confirmados y no casos de leptospirosis.

Parámetros	Casos confirmados		No casos		Valor de <i>p</i>
	Promedio	Nº positivos	Promedio	Nº positivos	
Densidad urinaria	1019	7 (77,8)	1028	15 (35,7)	0,528
Proteinuria	30	5 (55,5)	100	17 (40,5)	0,642

2.3.5 Prueba de MAT en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis

En el total de la población de caninos con sospecha de leptospirosis se observó que un 66,6 % fueron no reactivos y un 33,3 % reactivos, distribuyéndose el porcentaje de presentación de los serovares de la siguiente manera: Canicola y Copenhageni 76,5 %, Castellonis 29,4 % y Pomona 5,9 %.

El diagnóstico mediante la prueba de MAT permitió incluir a 7 de los 51 pacientes con sospecha clínica de leptospirosis en el grupo de animales considerados como casos confirmados. En 5 de estos se obtuvo una única muestra mientras que en 2 se analizaron muestras del período agudo y convaleciente lo cual permitió evidenciar seroconversión. En la Tabla 13 se muestran los serovares reaccionantes y los títulos de anticuerpos hallados en cada paciente. En 6 de los 7 casos confirmados se observó coaglutinación de dos o tres serovares siendo la asociación observada entre Castellonis, Canicola y Copenhageni 57,1 % (4/7), Canicola y Copenhageni 14,2 % (1/7) y Castellonis y Canicola 14,2 % (1/7). Sólo un caso no presentó coaglutinación y fue reactivo al serovar Copenhageni.

En el grupo de caninos clasificados como no casos determinado mediante la prueba de MAT, el 77,3 % (34/44) fue no reactivo y el 22,7 % (10/44) fue reactivo con títulos de 1:100 a 1:400 frente a los serovares Canicola y Copenhageni.

No se observó aglutinación frente a los serovares Pyrogenes y Grippotyphosa en ninguno de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 13: Serovares y títulos de anticuerpos en el grupo de caninos considerados como casos confirmados por la prueba de MAT.

Paciente	Primer muestra			Segunda muestra		
	Castellonis	Canicola	Copenhageni	Castellonis	Canicola	Copenhageni
1	1:1600	1:6400	1:400	-	-	-
2	1:800	1:6400	1:400	-	-	-
3			1:1600	-	-	-
4	1:200	1:400	1:100	1:400	1:1600	
5		1:800	1:100	1:800	1:3200	1:800
6	1:200	1:3200	1:200	-	-	-
7	1:400	1:800		-	-	-

2.3.6 Aislamiento bacteriano en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis

Se sembraron en total 51 muestras de orina y de sangre de todos los pacientes con sospecha clínica de leptospirosis no obstante, en ninguno de los cultivos se observó desarrollo bacteriano luego de 6 meses de incubación.

2.3.7 Técnica *lipL32*-qPCR en muestras clínicas de caninos con diagnóstico presuntivo de leptospirosis

La técnica *lipL32*-qPCR fue positiva en 6 de los siete casos confirmados mediante la prueba de MAT. Con respecto al tipo de muestra, los seis pacientes tuvieron un resultado positivo a partir de la muestra de orina con valores de C_t que oscilaron entre 15,9-35. En un solo paciente se observó amplificación en la muestra de sangre y suero con un valor de C_t de 29 y 33 respectivamente.

Con respecto al grupo de animales considerados como no casos según el criterio mencionado, 42 de los 44 fueron también negativos mediante las técnicas *lipL32*-qPCR y *rrs*-PCR convencional. Mientras que 2 de los 44 pacientes mostraron amplificación en muestras de orina con ambas técnicas de PCR. El valor de C_t obtenido con la *lipL32*-qPCR fue de 25,7 y 27,7.

El IPC utilizado en cada ensayo fue positivo en todas las reacciones demostrando la ausencia de inhibición en las corridas. En todas las muestras positivas se observó amplificación en las reacciones por triplicado.

La técnica *rrs*-PCR convencional mostró amplificación en 4 de los 6 pacientes positivos mediante la *lipL32*-qPCR.

En la tabla 14 se resumen los resultados de los casos confirmados obtenidos mediante las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas (MAT, aislamiento, *lipL32*-qPCR y *rrs*-PCR convencional). Las Figuras 6 y 7 muestran algunos de los resultados positivos en muestras de orina mediante las dos técnicas de PCR utilizadas.

Tabla 14: Resultados de los casos confirmados obtenidos mediante las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas.

Paciente	MAT Serovares y títulos						<i>lipL32</i> - qPCR	<i>rrs</i> -PCR	Aislamiento
	1°M			2°M					
	Cas	Can	Cop	Cas	Can	Cop			
1	1600	6400	400				+	+	-
2	800	6400	400				+	+	-
3			1600				-	-	-
4	200	400	100	400	1600		+	-	-
5		800	100	800	3200	800	+	-	-
6	200	3200	200				+	+	-
7	400	800					+	+	-
8		No reactivo					+	+	-
9		No reactivo					+	+	-

Ref: Cas: castellanis, Can: Canicola, Cop: Copenhageni

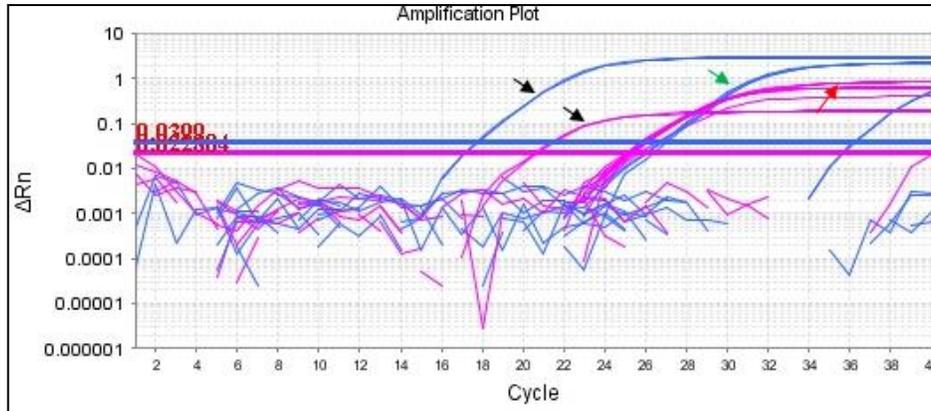


Figura 6: Gráfico de amplificación correspondiente a la *lipL32*-qPCR realizada a partir de sangre con EDTA, suero y orina de un paciente con sospecha de leptospirosis. Flechas negras: corresponden al pocillo del control positivo (curva azul) más el IPC (curva rosa). Flecha verde: corresponde a las curvas de la muestra de orina positiva por triplicado. Flecha roja corresponde a las curvas del IPC de la muestra positiva y del resto de las muestras negativas.

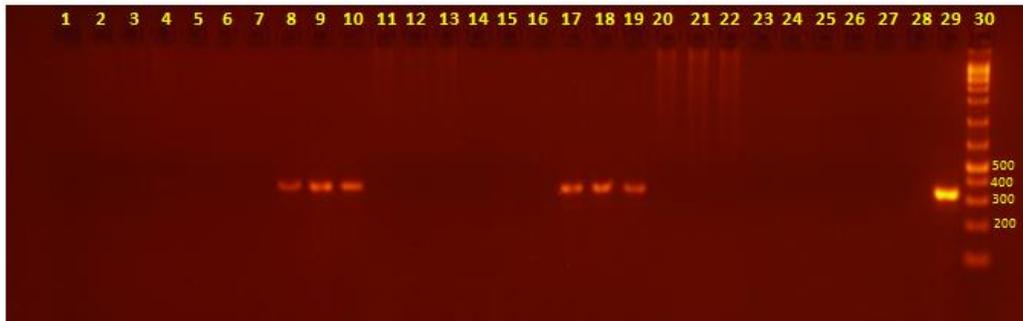


Figura 7: Gel de agarosa de la *rrs*-PCR convencional. Calle 1: control negativo de PCR. Calle 2-7: muestras de sangre con EDTA y suero negativas. Calle 8-10: muestra de orina del mismo paciente positiva. Calle 11-13: muestras de sangre con EDTA y suero negativas. Calle 17-19: muestra de orina del mismo paciente positiva. Calle 20-28: muestras de sangre con EDTA, suero y orina negativas. Calle 29: control positivo de PCR correspondiente a una banda de 331pb. Calle 30: Marcador de peso molecular de ADN, 100bp.

2.3.8 Análisis estadístico

a) El análisis descriptivo fue realizado en los puntos 2.3.1 al 2.7.7.

b) La comparación entre la técnica *lipL32*-qPCR y la prueba de MAT realizada mediante el cálculo del índice Kappa con 95 % de intervalo de confianza mostró una fuerte concordancia (Kappa=0,76; 95 % IC 0,492-1,039). Mientras que la concordancia observada entre la *rrs*-PCR convencional y la prueba de MAT fue moderada (Kappa=0.56, 95 % IC 0,286-0,833).

La comparación entre la *lipL32*-qPCR y la *rrs*-PCR convencional mostró una fuerte concordancia (Kappa=0,779; 95 % IC 0,512-1,047).

2.4 DISCUSIÓN

En nuestro país no existen por el momento datos de la incidencia de leptospirosis canina a diferencia de lo que ocurre en medicina humana. Las principales causas de este hecho se podrían atribuir por un lado a la falta de notificación de los casos a través del sistema de vigilancia y denuncia obligatoria en animales de compañía. Por otro lado, las limitaciones de las pruebas serológicas y de aislamiento conllevan a que los veterinarios comiencen un tratamiento ante la sospecha clínica sin confirmar el caso. Es en este contexto donde adquiere importancia la implementación de una metodología diagnóstica que permita confirmar la enfermedad de manera rápida y específica.

Los factores de riesgo para leptospirosis canina han sido mencionados en estudios previos no obstante, los resultados difieren en la asociación de determinadas variables con la enfermedad. En cuanto al sexo macho, en nuestro trabajo se observó asociación (OR>1) no obstante la misma no fue significativa posiblemente debido al escaso número de muestras en cada grupo. Azócar-Aedo & Monti (2016) y Rubel y col., (1997) demostraron que la variable sexo macho constituía un factor de riesgo significativo para

leptospirosis. En contraste, Birnbaum y col., (1998) y Ghneim y col., (2007) no hallaron predisposición a la enfermedad según el sexo. Mientras que, Ramírez y col., (2017) reportaron como factor de riesgo al sexo hembra (OR: 2.9 $p < 0.05$).

Con respecto a la raza indefinida Ghneim y col., (2007) y Azócar-Aedo y col., (2016) demostraron que esta variable era un factor de riesgo sin embargo la asociación con la enfermedad no fue estadísticamente significativa al igual que lo observado en nuestros resultados. Mientras que Kikuti y col., (2012) no encontraron asociación entre la raza y la infección. En nuestro trabajo, el hábito callejero se observó en mayor porcentaje entre los caninos del grupo de casos confirmados comparados con los no casos sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Rubel y col., (1997) y Silva & Riedemann, (2007) reportaron que el contacto con la calle fue el factor de riesgo más importante para la población canina. Esto podría deberse a la presencia de microambientes favorables para la supervivencia de la bacteria, presencia de roedores que contaminen esos ambientes y a la transmisión directa entre perros, o entre perros y roedores (Rubel y col., 1997). Asimismo, en relación a la exposición de los caninos a roedores y aguas estancadas observamos un mayor porcentaje entre los caninos del grupo de casos confirmados pero la diferencia no fue estadísticamente significativa coincidiendo con lo reportado por otros autores (Rubel y col., 1997; Ramírez y col., 2017). En relación al contacto con basurales los porcentajes entre el grupo de casos confirmados y no casos fueron similares no obstante las diferencias no fueron significativas. Por el contrario, Rubel y col., (1997) encontraron una proporción mayor de serorreactivos entre animales que tenían contacto con basurales sin embargo esta asociación no fue estadísticamente significativa ($p 0,06$).

Una limitación de nuestro trabajo en relación a la asociación de la enfermedad con las variables relevadas fue el bajo número de pacientes en cada grupo (casos confirmados y no casos) lo cual podría afectar el análisis estadístico. Por lo expuesto, no podemos afirmar que las variables mencionadas constituyan factores de riesgo para leptospirosis canina.

Los signos clínicos más comunes observados en el grupo de casos confirmados fueron inespecíficos e incluyeron anorexia, decaimiento y vómitos seguidos de congestión de vasos episclerales y diarrea coincidiendo con lo reportado por otros autores (Rentko y col., 1992; Birnbaum y col., 1998; Adin & Cowgill, 2000). A pesar de haber observado un mayor porcentaje de los mencionados signos clínicos con respecto al grupo de no casos ninguno presentó diferencias estadísticamente significativas.

En relación a la presencia de ictericia, se encontró un porcentaje (22 %) similar a lo obtenido Birnbaum y col., (1998) y Gualtieri y col., (2012). Este último investigador sugiere una relación entre la presencia de ictericia, cepas del serogrupo Icterohaemorrhagiae y la presentación de cuadros clínicos más severos debido a la producción de hemolisinas. En concordancia con el concepto mencionado en nuestro estudio se observó un paciente icterico con títulos de 1:1600 para el serovar Copenhageni que murió antes de poder realizar la segunda muestra para evidenciar seroconversión.

En estudios previos, han sido reportados cambios pulmonares en pacientes caninos con leptospirosis. (Rentko y col., 1992, Harkin & Gartrell 1996, Birnbaum y col., 1998, Goldstein y col., 2006). Kohn y col., 2010 reportaron un aumento en la enfermedad pulmonar en caninos muy similar al síndrome de hemorragia pulmonar por leptospirosis en humanos. No obstante, Knöpfler y col., (2017) no hallaron una relación entre los signos clínicos respiratorios y los cambios radiológicos, atribuyendo a la acidosis y el dolor como otras causas de disnea en estos pacientes. Coincidiendo con estos hallazgos, en nuestro

trabajo ningún caso confirmado presentó signos respiratorios. Asimismo, Klopfleisch y col., (2010) describieron un síndrome de hemorragia pulmonar en caninos semejante al síndrome descrito en humanos, no obstante, *Leptospira* spp., no pudo ser identificada en forma constante con los métodos diagnósticos empleados. Por lo tanto, la etiología de este síndrome en caninos continua siendo poco clara (Klopfleisch y col., 2010).

En otros trabajos la anemia leve a moderada fue mencionada en el 33 % y 63 % de pacientes con leptospirosis (Birnbaum y col., 1998; Knöpfler y col., 2017) y generalmente fue atribuida a factores como pérdida de sangre por el tracto gastrointestinal a consecuencia de la uremia, hemorragia pulmonar e inhibición de la hematopoyesis por la respuesta inflamatoria (Knöpfler y col., 2017). No obstante, de acuerdo a nuestros resultados ninguno de los pacientes considerados como casos confirmados presentó anemia, coincidiendo con lo hallado por Rentko y col., (1992), quienes obtuvieron un valor promedio de 41 %. En contraste el 42,9 % de los pacientes del grupo considerado como no caso presentó anemia con diferencias significativas. Este hallazgo puede ser atribuido a otras enfermedades inmunomediadas, inflamatorias o metabólicas que causen anemia (Weiss & Wardrop., 2010). Por su parte, la leucocitosis con neutrofilia y desvío a la izquierda es un hallazgo hematológico esperable en caninos con infección bacteriana. Sin embargo, en el grupo de pacientes considerados como casos confirmados sólo el 55,6 % presentaron leucocitosis neutrofílica aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo de no casos. El recuento normal de leucocitos en pacientes con leptospirosis ya ha sido reportado en caninos y en humanos y, posiblemente, se deba a las fluctuaciones del recuento de estas células dependientes de la etapa y severidad de la infección (Rentko y col., 1992; Adin & Cowgill, 2000; Weiss & Wardrop, 2010; Greene, 2012; Ananthi y col., 2013; Knöpfler y col., 2017). La trombocitopenia es una alteración hematológica comúnmente descrita en

pacientes con leptospirosis y es probablemente debida a la vasculitis que se desarrolla en la fase de bacteriemia de la enfermedad con activación y agregación plaquetaria y secuestro en casos de esplenomegalia (Greene, 2012; Knöpfler y col., 2017). En nuestro trabajo el 55 % de los casos confirmados presentaron trombocitopenia coincidiendo con los resultados obtenidos por Adin & Cowgill (2000) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo de no casos.

La leptospirosis es considerada una de las causas infecciosas más frecuentes de insuficiencia renal en caninos. En nuestro estudio observamos que el incremento de la urea y la creatinina fueron las anomalías bioquímicas detectadas en el 100 % de los pacientes considerados como confirmados presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de no casos. Algunos investigadores han mencionado que una severa azotemia se asoció con un pronóstico reservado en caninos con leptospirosis (Rentko y col., 1992; Adin & Cowgill, 2000). En coincidencia con estos reportes Knöpfler y col., (2017) describieron valores más elevados de urea y creatinina en caninos que no sobrevivieron a la enfermedad en comparación con aquellos que se recuperaron. Con respecto a las alteraciones en la funcionabilidad hepática observamos aumento de la actividad de la ALT en el 44 % de los pacientes considerados como casos confirmados sin presentar diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de no casos. Estudios previos han encontrado porcentajes y valores promedios similares de esta enzima órgano-específica (Adin & Cowgill, 2000; Knöpfler y col., 2017).

El urianálisis reveló que el grupo de caninos considerados como casos confirmados presentó un valor promedio de densidad urinaria por debajo del rango de referencia para la especie (<1020) sin presentar diferencias estadísticamente significativas. Este hallazgo es frecuentemente reportado en caninos con leptospirosis e

indica una incapacidad del riñón para concentrar la orina (Adin & Cowgill, 2000; Sykes y col., 2011).

En nuestro estudio no se hallaron animales seroreactivos al serovar Pyrogenes ni Grippotyphosa a diferencia de otros trabajos publicados (Arias y col., 2005; Gualtieri y col., 2012; Seghesso-Zabala y col., 2013) Estas diferencias en la prevalencia de distintos serovares probablemente se deban, entre otros factores, al área de la cual se extrajeron las muestras, a los factores de riesgo al que se encontraban expuestos los animales y a la selección de pacientes incluidos en el estudio (clínicamente sanos o con signología compatible de leptospirosis).

Si bien el aislamiento de *Leptospira* spp., es considerado una prueba confirmatoria de la enfermedad la recuperación de bacterias viables en muestras clínicas presenta limitaciones importantes. Entre las principales se pueden mencionar la contaminación con microorganismos de más rápido crecimiento y el lento desarrollo de las cepas patógenas por lo cual no es aplicable para la confirmación temprana de casos sospechosos (Sykes y col., 2011; Schuller y col., 2015). Los cultivos con resultados negativos a partir de muestras de riñones caninos ha sido reportado (Silva & Riedemann, 2007; Benacer y col., 2017). En nuestro estudio, coincidiendo con esos reportes, no se logró aislar al microorganismo en ningún paciente a pesar de haber confirmado la enfermedad mediante serología y PCR en 9 caninos. Este hecho era previsible debido a la baja sensibilidad analítica que presenta el aislamiento de esta bacteria, al bajo número de muestras confirmadas sembradas y en especial al tipo de muestras, todas provenientes de un animal vivo por lo cual no se pudo utilizar riñón con el fin de aumentar las probabilidades de aislamiento.

Varios autores han evaluado la técnica de PCR en caninos naturalmente infectados pero los resultados son discrepantes. Harkin y col., (2003b) demostraron la

utilidad de un ensayo de PCR convencional dirigido al gen que codifica para la subunidad ribosomal 23S a partir de muestras de orina obteniendo una sensibilidad y especificidad del 100 % y 88,3 % respectivamente. En contraste, Fraune y col., (2013) no detectaron ningún caso positivo mediante una PCR anidada dirigida al gen *lipL32* realizado a partir de muestras de sangre (*n* 15) y de orina (*n* 10) de caninos que habían sido diagnosticados por la prueba de MAT. Asimismo, otros investigadores utilizaron una PCR anidada con cebadores que amplifican un fragmento del gen *flaB* obteniendo una menor sensibilidad (62 %) comparada con la prueba de MAT realizada en muestras pareadas (90,9 %) (Koizumi y col., 2013). Aunque la sensibilidad de los ensayos de PCR anidada son comparables a los de la PCR en tiempo real otras razones podrían haber influenciado en los resultados obtenido por estos autores. Por ejemplo, la falla de la PCR anidada en detectar ADN de *Leptospira* spp., en casos serológicamente confirmados puede ser atribuida a la ausencia de microorganismos a consecuencia de la administración de antimicrobianos o la degradación del ADN durante la conservación de la muestra. En nuestro estudio la técnica *lipL32*-qPCR fue positiva en 6 de los 7 casos confirmados por MAT. Además, permitió la confirmación temprana de la enfermedad en los dos casos que se contó con la muestra pareada y el diagnóstico se estableció luego de observar seroconversión. Este resultado reafirma la utilidad del ensayo en la confirmación temprana de la enfermedad como fue descrita por otros autores (Harkin y col., 2003b). Con respecto al número de casos confirmados, estudios realizados en caninos por Xu y col., (2014) y Fink y col., (2015) han mostrado un bajo porcentaje coincidiendo con nuestros resultados. La causa de estos hallazgos es posiblemente debida al uso continuado de la vacunación desde hace décadas con la consecuente reducción de la manifestación clínica de la enfermedad (Rentko y col., 1992; Benacer y col., 2017).

La probabilidad de detección de *Leptospira* spp., en animales enfermos se encuentra influenciada, entre otros factores, por la elección de las muestras a enviar para el diagnóstico por parte del veterinario. En este contexto es frecuente que la única muestra enviada sea suero para la búsqueda de anticuerpos mediante la prueba de MAT. No obstante, Branger y col., (2005) reportaron resultados negativos mediante una PCR realizada a partir de muestras de sangre después del cuarto día de infección experimental. Mientras que a partir de muestras de orina obtuvieron resultados positivos desde el día 8 hasta el 26. Xu y col., (2014) evaluaron 207 muestras de sangre con anticoagulante y sólo 9 de orina de estos pacientes mediante 3 ensayos de PCR en tiempo real y obtuvieron 3 casos positivos que mostraron amplificación en muestras de orina y sólo uno fue positivo simultáneamente en sangre. En nuestro estudio el mayor porcentaje de muestras positivas fue obtenido a partir de la orina. Por lo tanto para incrementar la posibilidad de un resultado positivo sería conveniente analizar en forma conjunta orina y sangre del mismo paciente (Schuller y col., 2015).

En 2 de los 44 pacientes no reactivos serológicamente se observó un resultado positivo mediante la técnica *lipL32*-qPCR y *rrs*-PCR convencional a partir de muestras de orina. Desafortunadamente no se pudo obtener una segunda muestra para evaluar la seroconversión. No obstante, estos animales tenían datos epidemiológicos, signos clínicos y alteraciones en los parámetros de la bioquímica clínica (incremento de la concentración de urea y creatinina séricas) compatibles con leptospirosis. Estos resultados coinciden con lo reportado en otras publicaciones en las cuales fue observado la amplificación de ADN de *Leptospira* spp., en animales seronegativos (Harkin y col., 2003b; Xu y col., 2014; Fink y col., 2015; Recavarren y col., 2015; Knöpfler y col., 2017). Asimismo, reportes previos han demostrado que los resultados serológicos pueden ser negativos en la fase aguda de la enfermedad o inconstantes cuando los microorganismos

se encuentran localizados en sitios protegidos del sistema inmune (Harkin & Gartrell, 1996; Birnbaum y col., 1998). Las posibles explicaciones de hallar animales seronegativos en una única muestra de MAT pero positivos por la técnica de PCR son múltiples. En primer lugar podría constituir un resultado falso positivo debido a la amplificación inespecífica del ADN de microorganismos presentes en la orina (Fink y col., 2015; Miotto y col., 2017). En segundo lugar los animales podrían estar infectados con serovares que no fueron incluidos en el panel de antígenos utilizados en la prueba de MAT. Finalmente, pueden reflejar una mayor sensibilidad de la técnica de PCR comparada a la serología cuando se realiza en la etapa aguda de la enfermedad, especialmente en animales que han estado expuestos a factores de riesgo y presentan signología compatible.

El hallazgo de resultados negativos con la técnica de PCR en animales con diagnóstico confirmado mediante serología fue reportado por Fraune y col., (2013). La principal causa de estos resultados es la instauración del tratamiento con antimicrobianos antes de la extracción de las muestras o la inadecuada conservación de las mismas. En nuestro trabajo el único resultado falso negativo correspondió a un paciente derivado de una clínica privada por lo cual no podemos descartar la administración previa de antimicrobianos.

La técnica *lipL32-qPCR* presentó una fuerte concordancia con la prueba de MAT y permitió detectar un mayor porcentaje de animales positivos que lo hallado por otros autores (Xu y col., 2014). Mientras que la concordancia observada entre la *rrs-PCR* convencional y la prueba de MAT fue moderada.

A pesar de la fuerte concordancia observada entre ambas técnicas de PCR, la *rrs-PCR* convencional falló en detectar dos pacientes positivos mediante la *lipL32-qPCR*. Este hallazgo podría ser atribuido a la presencia de una baja carga bacteriana en las muestras de orina de estos pacientes debido a que en ambos casos el valor de C_t

obtenido con la *lipL32*-qPCR fue de 34,5 muy próximo al valor de corte establecido. Miotto y col., (2017), obtuvieron un mayor número de muestras de orina positivas con la técnica *rrs*-PCR convencional en comparación con un ensayo en tiempo real dirigido al gen *lipL32*. No obstante, luego de la secuenciación de los productos amplificados se observó que 3 de 5 muestras positivas proveniente de animales con sospecha clínica correspondían a amplificaciones inespecíficas (en 2 casos relacionadas a bacterias no cultivables y en otro a *Canis lupus familiaris*).

2.5 CONCLUSIONES

- La evaluación en conjunto de la anamnesis, los datos epidemiológicos y signos clínicos constituyen un aporte importante para establecer la sospecha de leptospirosis canina y solicitar estudios de laboratorio para la aproximación diagnóstica.

-De acuerdo a nuestros resultados, la presencia de azotemia, con o sin leucocitosis en animales expuestos a factores de riesgo y signología compatible sugiere una fuerte sospecha de leptospirosis. Por lo cual, sería recomendable que ante esta posibilidad el veterinario actuante indique la realización de las pruebas confirmatorias de la enfermedad e inicie las medidas de prevención pertinentes para evitar el contagio a los humanos y a otros animales.

- El diagnóstico definitivo de leptospirosis en animales no reactivos o con bajos títulos de anticuerpos con la prueba de MAT en una única muestra, no debería descartarse si los datos epidemiológicos, clínicos y alteraciones en los parámetros de laboratorio son compatibles.

- Las muestras a enviar para el diagnóstico directo por PCR deben incluir siempre sangre con EDTA y orina de cada paciente sin importar el tiempo de evolución de la enfermedad que declare el propietario.
- La prueba de PCR en tiempo real resulta un excelente complemento de la prueba de MAT en la confirmación de casos sospechosos o probables y permite diagnosticar una mayor cantidad de caninos verdaderos positivos.
- La técnica de *lipL32*-PCR utilizada en este estudio podría ser aplicada en estudios epidemiológicos de búsqueda de animales portadores dada la sensibilidad analítica y eficiencia de amplificación demostrada en las muestras de orina.

CONCLUSIONES GENERALES

Para la realización de un diagnóstico apropiado de leptospirosis canina mediante la técnica de PCR a partir de muestras biológicas (sangre, suero y orina) se deben contemplar factores pre-analíticos tales como el momento de la extracción de la muestra, la conservación de la misma y el método de extracción y purificación de ADN utilizado. En este contexto es recomendable que la toma de muestras se realice antes de la administración del tratamiento antimicrobiano, que sea enviada al laboratorio rápidamente y que se utilicen métodos de extracción que contemplen etapas de eliminación de inhibidores, como el utilizado en este estudio.

- En la interpretación de los resultados negativos obtenidos con la técnica de PCR debe tenerse en cuenta que los mismos podrían estar ocasionados por presencia de factores inhibitorios en la muestra o por errores en el proceso de amplificación. La inclusión de un control interno de amplificación en el ensayo *lipL32*-qPCR como el utilizado en este estudio, permite verificar la ausencia de tales factores.

- La técnica *lipL32*-qPCR realizada a partir de muestras de sangre y orina de caninos con diagnóstico clínico presuntivo de leptospirosis, resulta un excelente complemento de la prueba de MAT para la confirmación temprana de los casos sospechosos. Asimismo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio permite diagnosticar un mayor porcentaje de caninos verdaderos positivos.

Preparación de medios de cultivo para el desarrollo de *Leptospira* spp.

MEDIO DE FLETCHER:

Para su preparación se utiliza el medio de cultivo comercial: Fletcher Medium Base (BD Difco, France) para lo cual se disuelven los siguientes componentes en agua destilada:

- Peptona 0,3 g
- Extracto de carne 0,2 g
- NaCL 0,5 g
- Agar 1,5 g

Luego se lleva a ebullición, se deja enfriar y se ajusta el pH a 7,6. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, una vez que la temperatura del medio disminuye a 45-50 °C se adiciona suero de conejo inactivado (56 °C durante 30 min) y esterilizado por filtración en una proporción del 10 %. El medio preparado se dispensa en tubos de vidrio con tapa a rosca y se controla por esterilidad durante 48 horas a 37 °C.

MEDIO EMJH:

Para su preparación se utiliza el medio de cultivo comercial: Leptospira Medium Base EMJH (BD Difco, France) al que se le agrega asépticamente el enriquecimiento: Leptospira Enrichment EMJH (BD Difco, France). Este último puede realizarse en forma artesanal a partir de la preparación de cada una de los componentes partiendo de soluciones stock.

Preparación del medio base:

- Fosfato de sodio 1,0 g
- Fosfato monopotásico 0,3 g
- Cloruro de sodio 1,0 g
- Cloruro de amonio 0,25 g
- Tiamina 0,005 g

Disolver 2,3 g de medio liofilizado en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 y autoclavar 121 °C / 15 min. Luego agregar asépticamente 100 ml del enriquecimiento.

El medio de cultivo base puede realizarse en forma líquida, semisólida o sólida. Para lo cual se debe:

- Líquido: se mezcla 1 volumen de enriquecimiento con 9 volúmenes de medio basal (esterilizado en autoclave a 121 °C/15 min), trabajando en condiciones asépticas. Se dispensa en tubos.
- Semisólido: se agrega 2 g de agar en 900 ml de medio base. Se calienta hasta disolver. Se autoclava a 121 °C / 15 min. Se deja entibiar (45-50 °C) y se mezclan 1 volumen de enriquecimiento tibio con 9 de medio basal semisólido. Se dispensa en tubos.
- Sólido: se prepara el medio base usando 500 ml de agua destilada en lugar de 900 ml. Separadamente se disuelven 10 g de agar en 400 ml de agua destilada. Se autoclavan independientemente a 121 °C / 15 min. Se mezclan, se dejan enfriar (50 °C) y se agrega 100 ml de enriquecimiento pre-calentado (50 °C). Se dispensa en placas.

Elaboración del enriquecimiento en forma artesanal:

- a) Preparación de soluciones stock (cada una de las drogas es disuelta en 100 ml de agua destilada estéril):

Reactivo	En 100 ml
Sulfato zinc 7H ₂ O	0,4 g
Cloruro Magnesio 6H ₂ O	1,5 g
Cloruro calcio 2H ₂ O	1,5 g
Sulfato ferroso 7H ₂ O*	0,5 g
Tween 80	10 g
Cianocobalamina B12	0,02 g
Piruvato de sodio	10 g
Glicerol	10 g (10 ml)

Estas soluciones, una vez preparadas, deben ser mantenidas a 4 °C. No es necesario ajustarles el pH. (*) El sulfato ferroso debe ser recién preparado.

b) Preparación del suplemento

En un vaso de precipitados se colocan 10 g de Albúmina en 50 ml de agua destilada estéril. Luego se añaden las siguientes cantidades de cada solución stock:

Reactivo	Cantidad a agregar
Sulfato zinc	1 ml
Cloruro Magnesio	1 ml
Cloruro calcio	1 ml
Sulfato ferroso	10 ml
Tween 80	12,5 ml
Cianocobalamina	1 ml
Piruvato de sodio	1 ml
Glicerol	1 ml

Se agrega agua destilada estéril hasta completar 100 ml. Se ajusta el pH: 7,4. Se esteriliza por filtración (0,22 µM).

Si al medio EMJH (en cualquiera de sus 3 formas) se le agrega 1-2 % (v/v) de suero de conejo inactivado y estéril, se lo enriquece más, logrando aumentar el número de aislamientos.

Métodos de extracción de ADN de *Leptospira* spp.

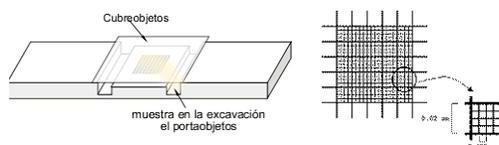
Los métodos comerciales de extracción y purificación de ADN (QIAamp DNA Mini Kit , QIAGEN y High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Germany) utilizados en este estudio se adjuntan como archivos *pdf* y se deja a continuación el enlace de cada uno de ellos.

<https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>.

https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/high-pure-pcr-template-preparation-kit-directions-for-use.pdf

Conteo de *Leptospira* spp.

Para su realización se utiliza la cámara de Petroff-hausser la cual consiste en un portaobjetos con una excavación de 0,02 mm de profundidad en un área de 1 milímetro cuadrado, con una rejilla dividida en 25 cuadrados grandes los cuales a su vez se subdividen en 16 cuadrados de 4X4 (400 celdillas).



El conteo se realiza a partir de una muestra representativa y homogénea del cultivo a valorar. Para lo cual se realizan las siguientes diluciones:

1/5 (0,1 ml cultivo + 0,4 ml diluyente)

1/10 (0,1 ml cultivo + 0,9 ml diluyente)

1/20 (0,1 ml cultivo + 1,9 ml diluyente)

1/40 (0,1 ml cultivo + 3,9 ml diluyente)

Se adiciona a cada dilución 50 μ l de solución de formaldehído al 10 %, tamponada con fosfato y se esperará 10 minutos para inactivar.

Se coloca el cubrecámara sobre la cámara cuyos bordes serán humedecidos con vaselina y se ejercerá suave presión hasta la aparición de los anillos de difracción de la luz.

Se coloca el extremo de la pipeta en el borde del cubrecámara y se dejará que la cámara se cargue por capilaridad (el líquido no debe desbordar la cámara, ni deben quedar glóbulos de aire ni zonas sin cargar). Se deja reposar 5 minutos antes de iniciar el recuento.

Se examina la cámara usando microscopio de fondo oscuro y aumento de 10x. Las células deben observarse repartidas uniformemente por toda la cámara. De no ser así, se repetirá la operación de carga.

Posteriormente se utiliza el aumento de 40x y se observan 5 cuadrados pequeños (4 de los bordes y 1 central) y se contará el número de bacterias en cada uno. Para normalizar el recuento en cada cuadrado pequeño se contarán todas las bacterias contenidas en él y aquellas que se encuentren sobre los bordes superior e izquierdo, dejando sin contar las que se encuentran sobre los límites inferior y derecho. El conteo se realiza por duplicado y se saca un promedio.

Para el cálculo se considerará aquella dilución en la que se cuentan 10-12 bacterias por campo y se realiza con la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias / ml} = \frac{\text{Total de bacterias contadas} \times \text{dilución} \times 20.000.000}{\text{N}^\circ \text{ cuadrados pequeños contados}}$$

Adin CA, Cowgill LD. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). J Am Vet Med Assoc. 2000; 216(3):371-5.

Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol. 2010; 287-296.

Adler B. *Leptospira* and Leptospirosis. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 2015.

Ahmed A, Engelberts MFM, Boer, KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. PLoSONE. 2009; 4 (9): e7093.

Ahmed A, Grobusch MP, Klatser PR and Hartskeerl RA. Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. J Bacteriol Parasitol. 2011. S5-002.

Ahmed A, Klaasen HLBM, van der Veen M, van der Linden H, Goris MGA, Hartskeerl RA. Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of *Leptospire*s in Canine Samples. Adv. Microbiol. 2012, 2, 162-170.

Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, Ojkic D, Prescott JF. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. Can J Vet Res. 2009; 73:167–175.

Ananthi B, Lata Sriram, Sumathi G. Evaluation of different laboratory parameters in the diagnosis of leptospirosis. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 2013; 2, (48): 9395-9403.

Arias D, Arauz S, Stornelli A, Stanchi N, Renner E, Martino P, Gatti M. Comparación de cuatro antígenos para la determinación de anticuerpos antileptospiras en serología

por ensayo inmuno enzimático (ELISA) en leptospirosis canina. Rev Biomed. 1999; 10:167-172.

Arias D, Arauz S, Stornelli A, Ramírez B, Stanchi N. Prevalencia serológica a tres cepas de *Leptospiras* en caninos de La Plata, Berisso y Ensenada. REIE. 2005; 3 (1): 29-30.

Azócar-Aedo L, Monti G. Meta-Analyses of Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Dogs. Zoonoses Public Health. 2016; 63(4):328-36.

Balamurugan V, Gangadhar NL, Mohandoss N, Assadi Thirumalesh SR, Dhar M, Shome R, Krishnamoorthy P, Prabhudas K, Rahman H. Characterization of leptospira isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. Springerplus. 2013; 2: 362

Barker EN, Tasker S, Day MJ, Warman SM, Woolley K, Birtles R, Georges KC, Ezeokoli CD, Newaj-Fyzul A, Campbell MD, Sparagano OA, Cleaveland S, Helps CR. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" in dogs. Vet Microbiol. 2010;140(1-2):167-70.

Benacer D, Thong KL, Ooi PT, Souris M, Lewis JW, Ahmed AA, Mohd Zain SN. Serological and molecular identification of *Leptospira* spp. in swine and stray dogs from Malaysia. Tropical Biomedicine. 2017. 34(1): 89–97.

Bharti A, Nally J, Ricaldi M, Diaz MM, Lovett M, Levett P, Gilman R, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet. Infect. Dis. 2003; 3: 757-771.

Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolp JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: Serological and clinicopathological features. J Small Anim Pract. 1998; 39:231-236.

Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. J Clin Microbiol. 201;49(6):2154-60.

Branger C, Blanchard B, Fillonneau C., *et al.* Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiol Lett. 2005; 243, 437-445

Brihuega B, Samartino L, Auteri C, Venzano A, Caimi K. *In vivo* cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina. Rev Arg Microbiol. 2012 44: 138-143.

Brihuega B, Pavan M, Cairo F, Auteri C, Funes D, Romero G, Samartino L. *Leptospira* patógena en riñón de *Didelphys albiventris* (comadreja). Rev Arg Microbiol. 2007; 39:19.

Brihuega, B. Leptospirosis-Técnicas diagnósticas. REIE. 2010; N 5.

Brown CA, Roberts AW, Miller MA, Davis DA, Brown SA, Bolin CA, Jarecki Black J, Greene CE, Miller-Liebl D. *Leptospira interrogans* serovar grippothyphosa infection in dogs. J Am Vet Med Assoc. 1996; 209: 1265-1267.

Brod CS, Guimarães Aleixo JA, Dorneles Jouglard SD, Hartleben Fernandes CP, Rodrigues Teixeira JL, Dellagostin OA. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2005; 38(4):294-300.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55(4):611-22.

Cardona MS, Arboleda NM, Moreno AN, Agudelo-Flórez P. Brote de leptospirosis en militares de la Fuerza Naval, Turbo, Antioquia, 2010. CES Medicina. 2010; 24 (2): 111-112.

Cerqueira GM, McBride AJA, Picardeau M, Ribeiro SG, Moreira AN, Morel V, Reis MG, Ko AI, Dellagostin OA. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. *J Med Microbiol.* 2009; 58, 1173–1181.

Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 2009; 9: 760-768.

Cerqueira GM, McBride AJA, Queiroz A, Pinto LS, Silva EF, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI, Dellagostin OA. Monitoring *Leptospira* Strain Collections: The Need for Quality Control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010; 82(1). 83–87.

Chad J. Wild, Justin J. Greenlee, Carole A. Bolin, Jeanne K. Barnett, David A. Haake, Norman F. Cheville. An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14:20–24.

Charles G.B. Caraguel, Henrik Stryhn, Nellie Gagne', Ian R. Dohoo, K. Larry Hammell. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagn Invest* 2011;23:2–15.

Chiani Y, Jacob P, Varni V, Landolt N, Schmeling MF, Pujato N, Caimi K, Vanasco B. Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2016;37:245-51.

Chiriboga J, Barragan V, Arroyo G, Sosa A, Birdsell DN, España K, Mora A, Espín E, Mejía ME, Morales M, Pinargote C, Gonzalez M, Hartskeerl R, Keim P, Bretas G, Eisenberg JN, Trueba G. High Prevalence of Intermediate *Leptospira* spp. DNA in Febrile Humans from Urban and Rural Ecuador. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(12):2141-7.

Costa, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2004; 22(5): 299-305.

Croda J, Neto AN, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, Duarte MIS. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:593–599.

Cullen P, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko A, Haake D, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect. Immun.* 2005; 73(8): 4853-4863.

Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; 28; 291–318.

Delgado F, Brihuega B, Venzano A, Funes D, Blanco F, Auteri C, Romero G, Capellino C, Sarmiento L. Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de tejido fijado en formaldehído. *Rev Cubana Med. Trop.* 2007; 59(1):14-8.

Dey S, Mohana CM, Kumar TMA, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine Leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2004; 5;103(1-2):99-106.

Draghi MG, Brihuega B, Benítez D, Sala JM, Biotti GM, Pereyra M, Homse A, Guariniello L. Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2011; 43(1):42-4.

Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organization (WHO) offset publication N° 67. World Health Organization, Geneva, 1982.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd edition. Melbourne. MedSci., Australia, 1999.

Fink JM, Moore GE, Landau R, Vemulapalli R. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine. *J Vet Diagn Invest.* 2015;27(2):159-66.

Fontaine GA. Canine Leptospirosis - Do we have a problem?. Vet. Microbiol. 2006; 117 19–24.

Fraga TR, Barbosa A, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune evasion from the Complement System. Scand J Immunol. 2011;73(5):408-419.

Fraune CK, Schweighauser A, Francey T. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. J Am Vet Med Assoc. 2013;15;242(10):1373-80.

Galloway RL, Levett PN. Application and Validation of PFGE for Serovar Identification of *Leptospira* Clinical Isolates. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(9): e824.

Garcia Montel L, Jorge S, Mesquita Luiz JP, Sinnott F; Kömmling Seixas F, Guimarães Aleixo JA, Samartino LE, Rochedo Conceição F, Pinho Hartleben C. Diagnosis of canine leptospirosis using an immunomagnetic separation-PCR method. Braz J Microbiol. 2012; 43(2):602-5.

García RL, Machado H, Abeledo MA, Feraud D. Utilización de una técnica serológica rápida para el diagnóstico de la leptospirosis canina. REDVET. 2009; 10 (7).

Geisen V, Stengel C, Brem S, Muller W, Greene C, Hartmann K. Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). J Small Anim Pract. 2007;48(6):324-328.

Gentilini F, Zanoni RG, Zambon E, Turba ME. A comparison of two real-time polymerase chain reaction assays using hybridization probes targeting either 16S ribosomal RNA or a subsurface lipoprotein gene for detecting leptospires in canine urine. J Vet Diagn Invest. 2015; 27(6) 696–703.

Ghneim GS, Viers JH, Chomel BB, Kass PH, Descollonges DA, Johnson ML. Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Vet Res.* 2007;38(1):37-50.

Goldstein, RE., Lin, RC., Langston, CE., Scrivani, PV., Erb, HN., Barr, SC. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med.* 2006; 20:489–494.

González A, Borrero R, Ruiz J, Batista N, Fernández Y, Valdés Y, González M. Medio EMJH modificado para el cultivo de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev Arg Microbiol.* 2006; 38(2), 61-68.

Gualtieri CAS, Carlín C; Peralta L; Peirone C; Gattarello V; Marc L, Molteni H, Arestegui MB, François S. Evaluación clínica, bioquímica y hematológica de caninos seropositivos a distintos serovares de *Leptospira interrogans*. *InVet.* 2012, 14(2): 131-139.

Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology* 139:1691-1700, 1993.

Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat* / [edited by] Craig E. Greene. Fourth edition. 2012.

Greenlee JJ, Bolin CA, Alt DP, Cheville NF, Andreasen CB. Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am J Vet Res.* 2004;65(8):1100-7.

Greenlee JJ, Alt DP, Bolin CA, Zuerner RL, Andreasen CB. Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. *Am J Vet Res.* 2005;66(10):1816-22.

Grune Loffler S, Passaro D, Samartino L, Soncini A, Romero G, Brihuega B. Genotypes of *Leptospira* spp. strains isolated from dogs in Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(3):201-4.

Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol.* 2004; 186 (9):2818-2828.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett P., Bolin CA. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infect Immun.* 2000;68(4):2276-2285.

Harkin a KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2003; 222: 1230–1233.

Harkin b KR, Roshto YM, Sullivan JT. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.*2003; 222:1224–1229.

Harkin KR, Gartrell CL. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1996;32(6):495-501.

Hartwig DD, Oliveira TL, Seixas FK, Forster KM, Rizzi C, Hartleben CP, McBride AJA, Dellagostin OA. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* 2010; 9:98.

Hauk P, Carvalho E, Ho PL. Expression and purification of the non-tagged LipL32 of pathogenic *Leptospira*. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(4):297-302.

Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical Considerationes in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5):1863-8.

Jorge S, Schuch RA, de Oliveira NR, da Cunha CEP, Gomes CK, Oliveira TL, Rizzi C, Qadan AF, Pacce VD, Coelho Recuero AL, Soares Brod C, Dellagostin OA. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel Med Infect Dis.* 2017;18:46-52.

Kaneco J, Harvey W, Bruss, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* California, USA. 5th Ed. Academic Press 1997, p. 895.

Kikuti M, Langoni H, Nobrega DN, Corrêa APFL, Ullmann LS. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2012; 18 (1): 124-127.

Klopfleisch R, Kohn B, Plog S, Weingart C, Nöckler K, Mayer-Scholl A, Gruber AD. *Case Report* An Emerging Pulmonary Haemorrhagic Syndrome in Dogs: Similar to the Human Leptospiral Pulmonary Haemorrhagic Syndrome?. *Veterinary Medicine International.* 2010. 1-7

Kohn B, Steinicke K, Arndt G, Gruber AD, Guerra B, Jansen A, Kaserhotz B, Klopfleisch R, Lotz F, Luge E, Nöckler K. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *J Vet Intern Med.* 2010; 24:1277– 1282.

Koizumi, N. & Watanabe, H. Leptospirosis vaccines: Past, Present and Future, *J Postgrad Med.* 2005; 51: 210-4.

Koizumi N, Muto M, Yamamoto S, Baba Y, Kudo M, Tamae Y, Shimomura K, Takatori I, Iwakiri A, Ishikawa K, Soma H, Watanabe H. Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki Prefecture. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61(6):465-8.

Koizumi N, Muto MM, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Funatsumaru S, Ohnishi M. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J Med Microbiol.* 2013;62(4):630-636.

Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopfleisch R, Gruber AD, Nöckler K, Kohn B. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 2017;58(10):582-588.

Koval A, López S, Lagioia G, Bertino R, Romera M, Scialfa E. Brote de leptospirosis en bovinos y humanos en un tambo de Lincoln, Provincia de Buenos Aires. *Vet. Arg.* 2017. Vol. XXXIV N° 355.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögren B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.

Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1): 159-174.

La Scola B, Bui LT, Baranton G, Khamis A, Raoult D. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 263, 142–147.

Lee HS, Guptill L, Johnson AJ, Moore GE. Signalment Changes in Canine Leptospirosis between 1970 and 2009. *J Vet Intern Med* 2014;28:294–299.

Levett P. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(2): 296-326.

Levett P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis?. *Clin. and App. Immunology Rew.* 2004; 4: 435-448.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 2005; 54(1): 45-49.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56(3):671–673

Lilenbaum a W, Monteiro RV, Ristow ., Fraguas S, Cordoso VS, Fedullo L. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. Res Vet Sci. 2002 Dec;73(3):319-21.

Lilenbaum b W, Ristow P, Fráguas SA, da Silva ED. Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis. Rev Latinoam Microbiol 2002; 44 (3-4): 124-128

Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37 (2): 131-4.

Martin PL, Molina MC, Stanchi NO, Corrada Y, Cuelli A, Cobos M, Ozaeta MB, De Palma V, Arauz MS. Prevalencia de leptospirosis en caninos de La Plata. Argentina.. 2014. Libro. Resumen. XX Reunión científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico.

Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples .J Clin Microbiol. 1992;30 (9):2219-2224.

Mérien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett. 2005 1;249(1):139-47.

Miller RI, Ross SP, Sullivan ND, Perkins NR. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. Aust Vet J. 2007;85(1-2):13-9.

Miotto BA, da Hora AS, Taniwaki SA, Brandão PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipI32 gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. Braz J Microbiol. 2017, pii: S1517-8382(17)30328-3.

Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Vet Pathol.* 2009; 46: 792-799.

Mori M, Bourhy P, Le Guyader M, Van Esbroeck M, Djelouadji Z, Septfons A, Kodjo A, Picardeau M. Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. *Euro Surveill.* 2017; 22(43):pii=16-00792.

Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degraeve WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jerônimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol.* 2004;186(7):2164-72.

Nelson R, Couto G. Medicina interna de pequeños animales. 3ra Edición, Vol 2, Ed.. Inter- Médica. Buenos Aires, República Argentina. 2005.

Normativa de Notificación de Enfermedades de Denuncia Obligatoria en Veterinaria en Pequeños Animales. Ministerio de Salud, Argentina. 2016.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organization for Animal Health. 2008.

Paixão Mdos S, Alves-Martin MF, Tenório Mda S, Starke-Buzetti WA, Alves ML, da Silva DT, Ferreira AG, Floró e Silva M, Sousa LO, Lucheis SB. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. *Prev Vet Med.* 2014.1;115(1-2):69-73.

Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of lig-based conventional

and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes*. 2005;19(2):111-7.

Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(1):1-8.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43(1):1-9.

Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Perolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol*. 2000; 151(5):333-41.

Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Girons IS, Werts C, Raetz CR. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25420-9.

Ramírez CVH, Camacho SMG, Verdugo IE, Ramírez IO, Llamas JRR. Prevalence and Risk Factors Associated with Serovars of *Leptospira* in Dogs, Related Human Seropositive. *J Dairy Vet Anim Res*. 2017; 6(2): 00174.

Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier JM, Rahalison L, Cornet M. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS One*. 2010;24;5(11):e14111.

Razuk Filho M, Schmitt Cavalheiro C, de Miranda Pedroso JV. Hemorragia pulmonar resultante de leptospirose. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2016;18(2):117-20.

Recavarren M, Quintana S, Rivero M, Ballesteros B, Scialfa E. *Leptospira* Diagnosis in Serum and Urine of Dogs by Real Time PCR. *J Vet Sci Med Diagn* 2015,4:2.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003;24;422(6934):888-93.

Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. Canine leptospirosis: a retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med*. 1992; 6:235–244.

Reyes G, Borrero R, Moya A, Padrón MA, Acosta M, Cabrera R, García, L. Detección de proteínas de adhesión a fibronectina y colágeno presentes en *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *VacciMonitor* 2007; 16 (3): 1-6.

Rodriguez V & Irlene E. El concepto serovar en *Leptospira*. *REDVET*.2011; 12 (7): 1-4.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller S, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 29:1305–1309.

Rossetti CA, Liem M, Samartino LE, Hartskeerl RA. Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. *Vet Microbiol*. 2005; 107: 241-248.

Rubel D, Seijo A, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky-Colli C. *Leptospira interrogans* en una población del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. *Rev. Panam. Salud Pública/Pan Am. J. public Health* 1997; 2 (2)102-105.

Santanna R, Vieira AS, Grapiglia J, Lilenbaum W. High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern. *Epidemiol Infect*. 2017;145(9):1852-1854.

Sathiyamoorthy A, Selvaraju G, Palanivel KM, Srinivasan AP. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine leptospirosis. *Vet World*. 2017;10(5):530-535.

Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract*. 2015;56(3):159-79.

Seghesso Zabala, A., Anthony Omezzolli, LM., Poli Lovagnini, G., y Francois Barbagelata, S. (2013) Seropositividad a *Leptospira interrogans* en perros de la ciudad de Rosario, Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65, (2), 185-190.

Sepúlveda Montes A, Dimas JS, Preciado Rodriguez FJ. La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco. *Rev. Cubana Med. Trop*. 2002; 54(1):21-3.

Silva RF, Riedemannb S. Seroprevalencia de leptospirosis canina en caninos atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch. Med. Vet*. 2007; 39, (3): 269-274.

Slack A, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol*. 2006; 6:95.

Slack AT, Kalambaheti T, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, Chaicumpa W, Bunyaraksyotin G, Craig S, Harrower BJ, Smythe LD. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *Int J System Evol Microbiol*. 2008; 58:2305–2308

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira spp*. *BMC Infect Dis*. 2002; 2: 13.

Stanchi N. Microbiología Veterinaria. Editorial Ed. Inter-Médica. Argentina. 2007.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64: 247–255.

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA. Goldstein RE. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Prevention. *J. Vet. Intern. Med*. 2011; 25:1-13.

Tarabla HD. Sensibilidad y especificidad. En: Epidemiología diagnóstica Tarabla DH. Ediciones UNL, Secretaría de Extensión, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 2000.

Tealdo MS, Romero GN, Autrey CD, Samartino L. Serología positiva a *Leptospira interrogans*, serovar *cynopteri* en caninos de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. In *Vet*. 2007; 9 (1): 59-65.

Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonlip S, Smythe LD, Limpaboon R, Hoffmaster A, Day N, Peacock S. Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and lipL32 Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *PLoS ONE*. 2011; 6(1): e16236.

Townsend WM, Stiles J, Krohne SG. Leptospirosis and panuveitis in a dog. *Vet Ophthalmol*. 2006; 9, 3, 169–173.

Vanasco NB, Lottersberger J, Schmeling MF, Gardner IA, Tarabla HD. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. *Rev Panam Salud Pública*. 2007; 21(6):388–95.

Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costac F, Koc AI, Tarabla HD. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999–2005). *Acta Trop*. 2008, 107 255–258.

Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD, Enría D. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. *Pan Am J Public Health.* 2000;7:35–40.

Verma A, Stevenson B. Leptospiral uveitis - there is more to it than meets the eye! *Zoonoses Public Health.* 2012;59;Suppl 2:132-41.

Vihol PD, Patel JH, Patel JM, Dabas VS, Kalyani IH, Chaudhari CF and Patel AC. Identification of Pathogenic *Leptospira* spp. Carrier Goats Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 2017; 6(12): 2174-2183.

Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods.* 2012;91(1):184-90.

Wang, Z., Jin, L., Węgrzyn, A. Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact.* 2007; 6:39.

Ward MP. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev Vet Med.* 2002;56(3):203-13.

Weiss DJ, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th edition. 2010.

Wójcik-Fatla A, Zajac V, Cisak E, Sroka J, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Leptospirosis as a tick-borne disease? Detection of *Leptospira* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2012, 19, 4: 656-659.

Xu C, Loftis A, Ahluwalia SK, Gao D, Verma A, Wang C, Kaltenboeck B. Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the *lig* genes. *PLoS One.* 2014, 9 (2):e89507.

Yang C, Wu M, Pan M, Hsieh W, Vandewalle A, Huang C. The *Leptospira* Outer Membrane Protein LipL32 Induces Tubulointerstitial Nephritis-Mediated Gene Expression in Mouse Proximal Tubule Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 2037–2045.

Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM, Djadid ND. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. Infect Genet Evol. 2010;10(2):273-7.

Zunino EM. & Pizarro RP. Leptospirosis. Puesta al día. Rev Chil Infect 2007; 24 (3): 220-226.