

Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta

Frequency of canine leptospirosis in dogs attending veterinary practices determined through microscopic agglutination test and comparison with isolation and immunofluorescence techniques

R F Silva^{a*}, S Riedemann^b

^aInstituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

^bInstituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the frequency of leptospirosis in 400 dogs from rural and urban areas that attended veterinary practices in Valdivia (Chile), using the Microscopic Agglutination Test (MAT). Each serum sample was tested against eight serovars of leptospira (*hardjo*, *pomona*, *canicola*, *ballum*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi*, *grippotyphosa*, *autumnalis*), 14.8% of the dogs showed a positive leptospirosis titer with the majority of them reacting to the serovars *canicola*, *icterohaemorrhagiae* and *ballum*. Most of these sera had titers between 1/400 and > 1/1600. The results presented in this study do not show a significant difference in relation to gender, origin (urban/rural), breed or vaccination status. A relationship was found between the state of dogs living in the wild and the probability of contracting the disease and vaccinated dogs in relation to the infection with the serovar *ballum*, being much more likely for vaccinated dogs to contract an infection with this serovar than it is for unvaccinated dogs. Additionally, the study compared the MAT, isolation and indirect immunofluorescence (IFI) techniques using renal tissue of 50 urban dogs. For the IFI study, hyperimmune serum was obtained from rats inoculated with the serovars *canicola* and *icterohaemorrhagiae*. Isolation from renal tissue was unsuccessful, although 14% showed a positive response to MAT and 10% were positively identified with IFI. The hyperimmune serum used in the IFI technique was not serovar specific. The Microscopic Agglutination Test showed a higher sensibility and specificity compared to the isolation and indirect immunofluorescence techniques.

Palabras clave: leptospirosis, comparación, técnicas diagnósticas, caninos.

Key words: leptospirosis, comparison, techniques, diagnostic, canines.

INTRODUCCION

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis más difundidas y un serio problema de salud pública en el mundo entero (Haake y col 2000, Guerreiro y col 2001, Effler y col 2002), causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, que afecta a una gran cantidad de hospedadores mamíferos, entre ellos, humanos, equinos, caninos, cerdos, bovinos y animales silvestres (Flannery y col 2001, Nally y col 2001). El agente provoca desde infecciones inaparentes, hasta casos fatales (Lottersberger y col 2002, Russ y col 2003).

Según Faine y col (1999), Acha y Szyfres (2001), y Levett (2001), en muchos países tropicales el perro es un significativo reservorio de infección para el humano, y puede ser una importante fuente de inicio de un brote epidémico; además puede constituirse en una de las prin-

cipales fuentes de leptospirosis no ocupacional en países templados. Los signos clínicos en la leptospirosis canina dependen de la edad e inmunidad del hospedador, de factores medioambientales y de la virulencia del serovar infectante (Groves y col 2000), afecta a perros de cualquier edad, pero la incidencia es mayor en machos (Tilley 1998). En términos generales, el reconocimiento clínico de la leptospirosis canina no es factible de realizar, dado que las leptospiras pueden afectar diferentes sistemas orgánicos, resultando en una extensa variedad de presentaciones clínicas (Effler y col 2002), la mayor parte de las cuales son crónicas y subclínicas (Grauer 1998) y sin sintomatología patognomónica. La confirmación por parte del laboratorio se obtiene cuando se identifica o aísla el patógeno en muestras clínicas y/o se demuestra la presencia de títulos de anticuerpos indicadores de infección activa contra uno o más serovares de leptospiras (Smits y col 1999). La prueba de aglutinación microscópica, conocida por sus siglas MAT (Microscopic Agglutination Test), es la técnica de referencia internacional para la detección de anticuerpos específicos anti-leptospiras respecto a la cual se comparan las demás

Aceptado: 14.11.2006.

* Departamento de Salud Animal, Apartado Aéreo 275, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia; raul.silva@ucaldas.edu.co

técnicas desarrolladas, evaluándose y comparándose su sensibilidad y especificidad diagnóstica (Lottersberger y col 2002, Saengjaruk y col 2002).

La técnica de anticuerpos fluorescentes se ha adaptado para identificar serovares de leptospiras en tejidos y líquidos corporales, y puede emplearse como método tamiz para identificar a los animales que eliminan los microorganismos en la orina cuando un cultivo es imposible o exige demasiado tiempo (Greene y Shorts 1993). También es de gran utilidad para diagnosticar la infección en material patológico, que no es adecuado para realizar un cultivo o cuando se requiere un diagnóstico rápido; el éxito de esta técnica depende del número de organismos presentes, por lo tanto, es menos útil para el diagnóstico del estado de portador crónico, donde el número de organismos puede ser bajo o encontrarse muy localizado en una zona en particular dentro del órgano afectado (OIE, 2000).

El aislamiento del organismo infectante es la mejor manera de establecer el diagnóstico definitivo, pero es difícil de lograr, especialmente con algunos serovares (ej.: *hardjo*) (Lottersberger y col 2002).

Los objetivos planteados para la realización del presente estudio fueron: determinar la frecuencia de presentación de leptospirosis mediante el test serológico de aglutinación microscópica (MAT), en la población de perros asistentes a atención clínica veterinaria en Valdivia-Chile; determinar los títulos de anticuerpos frente a diferentes serovares de leptospira en los perros positivos al test de aglutinación microscópica (MAT); determinar la distribución de los individuos serológicamente positivos en relación a zona de procedencia (rural-urbano), perro con o sin propietario, sexo, edad, raza y estado de vacunación; determinar la frecuencia de presentación de leptospirosis en un grupo de perros, mediante la aplicación de los test de aglutinación microscópica (MAT), aislamiento en tejido renal e inmunofluorescencia indirecta en tejido renal (IFI).

MATERIAL Y METODOS

A raíz de que la prevalencia de leptospirosis en perros de Valdivia era desconocida, se estimó el tamaño muestral para una prevalencia estimada del 50%, con un nivel de confianza del 95%, mediante la aplicación de la siguiente fórmula (Thrusfield 1995):

$$n = 1,96^2 P_{exp} (1 - P_{exp}) / d^2$$

donde: n = tamaño muestral requerido, P_{exp} = prevalencia esperada, d = precisión deseada absoluta; de esta forma: $n = 384$. Para efectos de este trabajo se aproximó el tamaño muestral a 400 perros.

Para determinar la frecuencia de presentación de leptospirosis y los títulos de anticuerpos frente a diferentes serovares, en perros de Valdivia, Chile, se recolectaron muestras de sangre venosa de perros atendidos en

clínicas de la ciudad, provenientes tanto de la zona rural como urbana, mayores de seis meses, sin distingo de raza, sexo, ni estado de vacunación, y con diagnóstico clínico (leptospirosis u otro) o sin él. La distribución por edades se expresó en meses, agrupando los animales en 5 categorías de edad, 6-12 m, 13-24 m, 25-59 m, 60-119 m, ≥ 120 m. Las razas se agruparon en 5 categorías, incluidos los mestizos; la distribución se hizo siguiendo los patrones dictados por el American Kennel Club (AKC) para la ubicación de las razas en los diferentes grupos; mestizos, deporte, trabajo, pastores, compañía.

De cada animal se obtuvieron aproximadamente 5 ml de sangre, colectada en tubos estériles sin anticoagulante, se separó el suero, que posteriormente fue analizado mediante MAT, para lo cual se utilizaron como antígeno los siguientes serovares y cepas: *hardjo* (Hardjo bovis A), *pomona* (Pomona), *canicola* (Hond Utrecht IV), *ballum* (Castellonis), *icterohaemorrhagiae* (RGA), *tarassovi* (Perepelicin), *grippotyphosa* (Moskva), *autumnalis* (Akiyami A). Se realizó una primera fase, de descarte de negativos (screening), y una segunda fase que consistió en titular todos los sueros positivos al screening, a títulos de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600. Entre algunos de los sueros positivos se presentaron al mismo tiempo reacciones frente a diferentes serovares, considerándose como el causante de la reacción (seropositividad) al de mayor título, y como coaglutinaciones a los que presentaron títulos iguales frente a distintos serovares.

Para comparar MAT con las técnicas inmunofluorescencia indirecta (IFI) y aislamiento, se recolectaron muestras de sangre venosa de 50 perros a los cuales se les iba a realizar eutanasia; durante la necropsia se obtuvo un riñón entero incluida su envoltura adiposa, se colocó en una bolsa estéril de polietileno, e inmediatamente se llevó a la cámara de flujo laminar donde se le retiró el tejido adiposo y se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 0,01% durante 20 minutos. Se sacó de la solución e inmediatamente se envolvió con una gasa doble estéril y se procedió a cortar con un cuchillo estéril bien afilado, a lo largo de su eje mayor; luego, con una tapa rosca metálica perforada estéril, se raspó toda la superficie interna (médula y corteza). Del raspado que se acumuló en la tapa se tomaron 0,5 ml con una pipeta estéril y se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-4} . A continuación se sembraron 0,5 ml a partir de 10^{-2} . Se incubaron a 30 °C y se examinaron al microscopio de campo oscuro una vez por semana hasta un límite de 18 semanas.

Se realizó IFI, utilizando suero hiperinmune obtenido en ratas serológicamente negativas. Las ratas se inocularon en dos grupos de tres animales cada uno, con los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, respectivamente. Para ello se utilizaron leptospiras cultivadas en medio semisólido, que se mataron por calor, observándose una muestra al microscopio de campo oscuro para comprobar su muerte. Las ratas se inocularon vía

endovenosa la semana 1: 0,1 ml, semana 2: 0,2 ml, semana 3: 0,4 ml, semana 4: 0,8 ml. Previo a la sangría del animal, se tomó una muestra de sangre y se tituló el suero. Se sangró en blanco mediante punción en la arteria aorta abdominal, el suero obtenido se tituló nuevamente y se congeló a -20°C hasta su uso.

Del raspado renal descrito para el aislamiento, se obtuvo material para realizar frotis, estos se fijaron con acetona durante 10 minutos, se envolvieron en papel aluminio y se congelaron a -70°C hasta su procesamiento.

Los sueros hiperinmunes obtenidos en las ratas alcanzaron títulos de 1/400 para el serovar *canicola* y 1/800 para el serovar *icterohaemorrhagiae*. Previo al procesamiento de las muestras se estandarizó la técnica, para lo cual se hicieron diluciones del suero hiperinmune entre 1:2 y 1:128; y de la IgG anti-rata entre 1:10 y 1:640; finalmente se establecieron las diluciones a utilizar en un frotis de cultivo líquido y otro de semisólido, obteniéndose como diluciones óptimas para el serovar *canicola* 1:2 y 1:10, y para el serovar *icterohaemorrhagiae* 1:4 y 1:20, respectivamente.

A los 3 frotis de tejido renal, para cada serovar se les adicionaron 100 ml de suero hiperinmune, se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos, se lavaron 3 veces por 5 minutos cada uno con PBS 7,2; luego se adicionaron 100 ml de IgG anti-rata conjugada con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA®), se procesó en iguales condiciones que para la primera incubación, incluidos los lavados con PBS 7,2; posteriormente se sumergieron en azul de Evans durante un minuto, se lavaron en PBS 7,2, y se montaron con 1 gota de glicerina al

90% en PBS 7,2. Se observaron al microscopio de fluorescencia junto a un control.

Análisis estadístico. Para realizar el análisis estadístico, se utilizaron los programas Epi Info 2002 – Revisión 2 (2003) y Win Episcope 2.0. Los resultados de la frecuencia de presentación de leptospirosis se expresaron como proporciones, que fueron determinadas por intervalos de confianza, para lo cual se usó aproximación normal. Para determinar la aparición o no de leptospirosis bajo la influencia de variables como sexo, procedencia, estado de vacunación, canino con propietario o vago, edad y raza, se realizó un análisis de regresión logística simple, que, acompañado de la medición de la odds ratio o probabilidad de prevalencia, constituye una medición básica en estudios transversales y es un estimador de riesgo. Para calcular la concordancia observada entre las pruebas de aglutinación microscópica, aislamiento e inmunofluorescencia indirecta, se llevó a cabo el test de Kappa, igualmente expresado en términos de sensibilidad y especificidad como la capacidad del test para detectar los individuos enfermos y sanos, respectivamente. Para las pruebas descritas se aplicó un nivel de significación del 95.

RESULTADOS Y DISCUSION

De 400 sueros caninos, 59 resultaron positivos a títulos 1:100 y superiores (seroprevalencia 14,8%); un 72,88% del total de éstos reaccionó a títulos entre 1/400 y $>1/1.600$, correspondiendo la gran mayoría (97,67%) a los serovares *ballum*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae* (cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de los sueros positivos a leptospirosis en el test de aglutinación microscópica (MAT) detallando los serovares reaccionantes y título alcanzado.

Distribution of leptospirosis positive sera according to microscopic agglutination test (MAT) considering reactive serovars and final title reached:
canicola (F), *icterohaemorrhagiae* (I), *ballum* (G), *hardjo* (C), *autumnalis* (X), *pomona* (E).

Título	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1.600	>1/1.600	Total	%
F	2	3	4	5	4	3	21	35,6
I	0	3	2	3	1	2	11	18,5
G	2	1	1	1	1	0	6	10,2
C	2	0	0	0	0	0	2	3,4
X	0	0	1	0	0	0	1	1,7
E	1	0	0	0	0	0	1	1,7
Coaglutinaciones								
F/G	0	1	4	1	2	2	10	15,3
F/I	1	0	1	1	1	0	4	8,5
G/I	0	0	2	0	0	0	2	3,4
F/G/I	0	0	0	0	0	1	1	1,7
Total	8	8	15	11	9	8	59	100,0
	13,6	13,6	25,4	18,5	15,3	13,6		

La seroprevalencia de 14,8%, obtenida en el presente trabajo, es relativamente baja en contraste con el único trabajo realizado en esta zona por Barrientos (1966), quien recolectó 135 muestras de sangre de perros rurales de la provincia de Valdivia y obtuvo un 52,54% de seropositividad. Pero, es relativamente similar a un estudio reciente realizado en la ciudad de Chillán, por Rivera-Ramírez y col (2002), quienes obtuvieron un 10% de seropositividad en 50 caninos muestreados.

Igualmente la seroprevalencia, obtenida en el presente trabajo, es relativamente baja comparada con otros trabajos realizados en Chile sobre leptospirosis canina, como los llevados a cabo en la ciudad de Chillán, donde García (1987) y Sothers (1997) obtuvieron un 38,33% y un 31,05% de serorreaccionantes en un total de 60 y 190 muestras, respectivamente; el mismo García (1987) cita a Fuensalida en 1958, quien detectó una prevalencia del 41,10% en la ciudad de Santiago, y a Zamora (1971), quien reportó un 37% de seroprevalencia en la comuna de Los Angeles, Bío Bío. Estas diferencias podrían deberse, de acuerdo a Acha y Cifres (2001) y Andicoberry y col (2001), a que frecuentemente las infecciones y la prevalencia de la enfermedad se producen por un número limitado de serovares endémicos de un país o una región y está íntimamente ligada a factores ecológicos y medioambientales. Además, estas variaciones en la seroprevalencia podrían deberse al número de animales muestreados, al tipo de muestreo realizado y a las características de estos animales, sin olvidar que hace un par de décadas no era tan frecuente la vacunación contra leptospirosis canina como lo es actualmente.

La obtención de un 72,88% de los perros reaccionantes con títulos entre 1/400->1/1.600 podría corresponder a lo planteado por Zamora y Riedemann (1986), en un trabajo realizado en bovinos pero que podría extrapolarse a caninos, según los cuales la obtención de títulos superiores a 1/400 se considerarían indicativos de infección. Por otro lado, Rentko y Ross (1994) afirman que un título único contra un serovar contra el cual no ha sido vacunado se considera como positivo, lo cual sería aplicable para los animales reaccionantes a los serovares *autumnalis*, *ballum*, *hardjo* y *pomona*.

En el presente estudio, si bien todavía los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* son los de mayor incidencia, la aparición del serovar *ballum* se perfila como un serovar de gran importancia en la población canina muestreada, lo cual concordaría con las observaciones hechas por Groves y col (2000) y Cai y col (2002), quienes indican una tendencia cambiante en la epidemiología de la enfermedad en los Estados Unidos, donde los serovares *grippityphosa* y *pomona* han reemplazado a *icterohaemorrhagiae* y *canicola* como los serovares prevalentes responsables de leptospirosis canina. De acuerdo a Levitan (2001) esta disminución de los casos asociados con *canicola* e *icterohaemorrhagiae* probablemente se deba a los muchos años de usar vacunas que contienen dichos serovares.

Al realizar el análisis de regresión logística simple, el único resultado cercano a un valor estadísticamente significativo ($P < 0,05$) corresponde a la variable de perros vagos, que presenta un valor de 0,0694 y un odds ratio de 1,6750 (cuadro 2). Posteriormente se procedió a realizar un análisis de regresión logística simple para los serovares *canicola*, *ballum* e *icterohaemorrhagiae*, que reveló una mayor predisposición de los perros vagos a la infección por serovar *canicola* ($P = 0,0011$), y una probabilidad de infectarse con este serovar 3,5 veces mayor que los perros con propietario. Al igual que estos perros vagos tienen una mayor probabilidad de adquirir la infección por *Leptospira* serovar *ballum* ($P = 0,0243$), presentando una probabilidad de infectarse con este serovar 3,4 veces mayor que los perros con propietario, de la misma forma, es importante destacar los valores obtenidos para los perros vacunados $P = 0,0745$ (valor cercano a $P = 0,05$) y un odds ratio de 7,4667 que sugerirían una mayor probabilidad de contraer la infección por el serovar *ballum* en los perros vacunados relativo a los perros no vacunados.

El análisis de regresión logística simple sugiere relación entre el estado de perro vago y la probabilidad de contraer la enfermedad, lo cual es esperado, pues de estos animales no se tiene ningún antecedente respecto al estado de vacunación, régimen de alimentación y condiciones de vida. De la misma forma, llaman la atención los valores obtenidos para los perros vacunados con respecto a la infección por el serovar *ballum* que sugerirían una mayor probabilidad de contraer la infección por este serovar que los no vacunados. De acuerdo a Brown y col (1996), una posible explicación es que la vacunación de uso corriente en caninos es serovar específica, y sólo protege contra la presentación de enfermedad clínica causada por los serovares incluidos en la vacuna.

En el estudio comparativo de las tres técnicas, de los 50 caninos, se presentaron 7 serorreaccionantes al MAT, lo que representa 14% de seropositividad, distribuidos de la siguiente forma, serovares: *canicola* (6%), *icterohaemorrhagiae* (4%), *ballum* (2%), coaglutinación *ballum/canicola* (2%). Cuatro de estos sueros presentaron títulos por encima de 1/400. No se obtuvo éxito en

Cuadro 2. Análisis de regresión logística simple, incluyendo los serovares *canicola* y *ballum*.

Simple logistic regression analysis, including *canicola* and *ballum* serovars.

	Variable	Odds Ratio	Valor P
<i>canicola</i>	Vago	1,6750	0,0694
	Vago	3,5455	0,0011
<i>ballum</i>	Vago	3,3473	0,0243
<i>ballum</i>	Vacunación	7,4667	0,0745

Nivel de confianza del 95%.

ninguno de los cultivos realizados, después de 21 semanas de incubación, presentándose contaminación en 5 cultivos (10%), que llegaron en promedio hasta la semana 12 y que no correspondían a ninguno de los animales serorreaccionantes al MAT; pero sí a uno de los animales que reaccionó a la IFI, frente al serovar *canicola*. En la IFI, de los frotis observados para cada una de las 50 muestras de tejido renal, se obtuvieron 5 (10%) animales positivos; 2 frente al serovar *canicola*, 2 frente a los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* y 1 frente al serovar *icterohaemorrhagiae*. Al comparar los hallazgos de MAT con los otros dos métodos utilizados se obtuvieron los resultados consignados en el cuadro 3.

El método de aislamiento presenta sensibilidad del 0% y especificidad del 100% relativo al MAT, no observándose concordancia entre estos dos métodos diagnósticos utilizados en el presente trabajo. El método de IFI presenta sensibilidad de 57,1% y especificidad de 97,7% relativo al MAT, observándose una concordancia del 62,3%. Los resultados encontrados en el test de Kappa para calcular la concordancia observada entre las pruebas de aglutinación microscópica, aislamiento e inmunofluorescencia indirecta, se expresan en el cuadro 4.

Cuadro 3. Comparación de animales reaccionantes a las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), test de aglutinación microscópica (MAT) y cultivo.

Comparison of animals positive to indirect immunofluorescence (IFI), microscopic agglutination test (MAT) and isolation.

IFI (serovar)	MAT (serovar)	Cultivo
0	<i>canicola</i>	0
<i>canicola</i> / <i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>canicola</i>	0
<i>canicola</i>	<i>ballum</i>	0
<i>canicola</i> / <i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>canicola</i> / <i>ballum</i>	0
<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	0
0	<i>canicola</i>	0
0	<i>icterohaemorrhagiae</i>	0
<i>canicola</i>	0	0
5 (10%)	7 (14%)	0

Cuadro 4. Comparación entre las pruebas de MAT-IFI-Aislamiento a través de la prueba de Kappa.

Comparison between MAT-IFI-Isolation test using the Kappa test.

IFI	MAT			
	Positivo	Negativo		
Aislamiento	Positivo	4	1	5
	Negativo	3	43	45
	Positivo	0	0	0
	Negativo	7	43	50

Nivel de confianza del 95%.

Valor Kappa MAT-IFI 0,623%; MAT-Aislamiento 0%.

El resultado del test de Kappa para el aislamiento no presenta concordancia entre estas dos técnicas, lo cual se debe a que la totalidad de los cultivos fueron negativos. Lottersberger y col (2002), Saengjaruk y col (2002), Rentko y Ross (1994) y Harkin y col (2003) afirman que las leptospiras son extremadamente difíciles de aislar, y es relativamente común que se presente contaminación por hongos u otros saprofitos, lo que hace que su cultivo sea laborioso, costoso, lento y no siempre exitoso (poco sensible). De acuerdo a la OIE (2000), el tiempo requerido para la detección de un cultivo positivo varía con el serovar de leptospira y el número de organismos presentes en la muestra; los cultivos deben examinarse mediante microscopía de campo oscuro cada una o dos semanas, y deben ser incubados por lo menos durante 16 semanas, por lo cual se dieron como negativos a las 21 semanas de incubación.

Los resultados de la IFI relativo al MAT presentan una concordancia moderada del 62,3%. Algunos animales que resultaron positivos al MAT no lo hicieron frente a la IFI y viceversa; según lo planteado por la OIE (2000), esto ocurriría porque el éxito de esta última técnica depende del número de organismos presentes y su localización en una zona en particular dentro del órgano afectado. Quizás el poco resultado con la técnica de IFI podría deberse a que el suero hiperinmune obtenido no es específico. De igual manera, cuando estos animales reaccionaron a ambos métodos diagnósticos, algunos lo hicieron contra diferentes serovares, lo que indicaría que los anticuerpos obtenidos para la realización de la IFI no son serovares específicos, lo que de acuerdo a Rentko y Ross (1994) podría corresponder a que a pesar de que los antígenos de superficie de los distintos serovares son específicos, comparten algunos epítomos con otros serovares, propiedad que podría ser responsable de este tipo de reacciones. Otra posibilidad es que estos animales hubieran estado cursando una infección actual con un serovar y fueran portadores de otro.

La realización del presente trabajo permite concluir que la seroprevalencia de leptospirosis en la población canina muestreada fue de 14,8%; siendo los serovares más frecuentes *canicola*, *icterohaemorrhagiae* y *ballum*, y no encontrándose animales serorreaccionantes frente a los serovares *grippotyphosa* y *tarassovi*. Los valores obtenidos para los perros vacunados con respecto a la infección por el serovar *ballum* sugerirían una mayor probabilidad de contraer la infección por este serovar en los perros vacunados relativo a los no vacunados. El suero hiperinmune obtenido para la realización de la inmunofluorescencia indirecta no sería serovar específico, por lo que se podría intentar a futuro usar anticuerpos monoclonales. La prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) presenta mayor sensibilidad y especificidad que los métodos diagnósticos de Aislamiento e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

RESUMEN

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis más difundidas y un serio problema de salud pública en el mundo entero. El perro actúa como un potencial diseminador de esta enfermedad ya que mantiene una estrecha relación con el hombre, y al mismo tiempo con otros animales tanto domésticos como salvajes. A pesar de su importancia, la leptospirosis canina frecuentemente es subdiagnosticada. En el presente estudio se determinó la frecuencia de leptospirosis en 400 perros, tanto de la zona urbana como rural, atendidos en clínicas de la ciudad de Valdivia (Chile); tal determinación se realizó mediante el test de aglutinación microscópica (MAT). Cada suero se enfrentó a ocho serovares de leptospira, encontrándose un 14,8% de caninos positivos, de los cuales el mayor porcentaje reaccionó a los serovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae* y *ballum*. La mayoría de estos sueros lo hizo a títulos entre 1/400 y > 1/1.600. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no muestran diferencias significativas en relación al sexo, procedencia (rural/urbano), raza, animales vacunados y no vacunados. Sí se presentó relación entre el estado de perro vago y la probabilidad de contraer la enfermedad, y entre los valores obtenidos para los perros vacunados con respecto a la infección por el serovar *ballum*, que sugerirían una mayor probabilidad de contraer la infección por este serovar en los perros vacunados relativo a los perros no vacunados. Se compararon, además, las técnicas MAT, aislamiento e inmunofluorescencia indirecta (IFI), a partir de tejido renal. Para realizar la IFI, se obtuvo suero hiperinmune inoculando ratas con los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. Se encontró un 14% de caninos positivos a MAT, frente a los serovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae* y *ballum*. La mayoría de estos sueros lo hizo a títulos entre 1/400 y > 1/1.600. No se pudo obtener ningún aislamiento a partir de tejido renal, a pesar de que algunos de estos individuos reaccionaron al test de aglutinación microscópica - MAT (14%) y a la inmunofluorescencia indirecta - IFI (10%). El suero hiperinmune obtenido para la realización de esta última técnica no sería serovar específico. El test de aglutinación microscópica presentó mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta.

REFERENCIAS

- Acha P, B Szyfres. 2001. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3ª ed. O.P.S., Washington DC, EE.UU. Pp 175-185.
- Alonso-Andicoberry C, F García, L Ortega. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). *Invest Agr Prod Sanid Anim* 16, 205-225.
- Barrientos, J. 1966. Contribución al estudio de la leptospirosis canina en el área rural de la provincia de Valdivia. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Brown C, A Roberts, M Miller, D Davis, S Brown, C Bolin, J Jarecky-Black, C Green, D Miller-Liebl. 1996. *Leptospira interrogans* serovar *grippityphosa* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 209, 1265-1267.
- Cai H, G Hornby, D Key, M Osuch, G Maxie. 2002. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippityphosa* and *Leptospira sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest* 14, 164-168.
- Effler P, A Bogard, H Domen, A Katz, H Higa, D Sasaki. 2002. Evaluation of eight rapid screening test for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 40, 1464-1469.
- Faine S, B Adler, C Bolin, P Perolat. 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. 2ª ed. MediSci, Melbourne, Australia.
- Flannery B, D Costa, F Carvalho, H Guerreiro, J Matsunaga, E Da Silva, A Pinto Ferreira, L Riley, M Reys, D Haake, A Ko. 2001. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 39, 3303-3310.
- García M. 1987. Determinación de la frecuencia de leptospirosis en perros urbanos de la ciudad de Chillán, Ñuble, por el test de microglutinación. *Memoria de titulación*, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chile.
- Grauer G. 1998. Leptospirosis. En: Morgan R (ed). *Clínica de pequeños animales*. Harcourt-Brace, Madrid, España, Pp 498-500.
- Greene C, E Shotts. 1993. Leptospirosis. En: Greene C (ed). *Enfermedades infecciosas, perros y gatos*. Interamericana-McGraw-Hill. México, Pp 523-533.
- Groves M, K Harrington, J Taboada. 2000. Leptospirosis. In: Ettinger S, E Feldman (ed). *Textbook of veterinary internal medicine, disease of the dog and cat*. 5ª ed. W. B. Saunders, Philadelphia, USA, Pp 397-398.
- Guerreiro H, J Croda, B Flannery, M Mazel, J Matsunaga, M Galvao Reis, D Haake, G Chao, R Zuerner, J Barnett, D Barnett, M Mazel, J Matsunaga, K Harkin, Y Roshto, J Sullivan. 2003. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 222, 1224-1229.
- Levett P. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14, 296-326.
- Levitan D. 2001. ¿Leptospirosis? Órgano de comunicación de Fort Dodge Animal Health Latinoamérica. Boletín N° 19.
- Lotterberger J, R Pauli, N Vanasco. 2002. Desarrollo y validación de un enzoinmunoensayo para el diagnóstico de Leptospirosis bovina. *Arch Med Vet* 34, 89-95.
- Nally J, J Timoney, B Stevenson. 2001. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 69, 400-404.
- OIE, Office International des Epizooties. 2000. *Manual of standards diagnostic test and vaccines 2000*. 4ª ed. O.I.E. Suiza.
- Rentko V, L Ross. 1994. Leptospirosis Canina. En: Kirk R, Bonagura J. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales XI*. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, España, Pp 289-292.
- Rivera-Ramírez P, A Islas, J López, V Merino, G Mora, R Tardon, C Salazar, F Taj-Taj. 2002. *Resúmenes del XII Congreso de Medicina Veterinaria*, Chillán, Chile.
- Russ A, I Jali, A Bahaman, A Tuen, G Ismail. 2003. Seroepidemiological study of leptospirosis among the indigenous communities living in the periphery of Crocker Range Park Sabah, Malaysia. *ARBEC*, 1-5.
- Saengjaruk P, W Chaicumpa, G Watt, G Bunyaraksyotin, V Wuthiekanun, P Tapchaisri, C Sittinont, T Panaphut, K Tomanakan, Y Sakolvaree, M Chongsa-Nguan, Y Mahakunkijcharoen, T Kalambaheti, P Naigowit, M Wambangco, H Kurazono, H Hayashi. 2002. Diagnosis of human Leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *J Clin Microbiol* 40, 480-489.
- Smits H, Y Ananyina, A Chereshsy, L Dancel, R Lai-A-Fat, H Chee, P Levett, T Masuzawa, Y Yanagihara, M Muthusethupathi, E Sanders, D Sasaki, H Domen, C Yersin, T Aye, S Bragg, G Gussenhoven, M Goris, W Terpstra, R Hartskeerl. 1999. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol* 37, 2904-2909.
- Sothers R. 1997. Prevalencia de leptospirosis en perros de la ciudad de Chillán. *Memoria de titulación*, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chile.
- Thrusfield M. 1995. *Veterinary epidemiology*. 2ª ed. Blackwell Science, Oxford, UK, Pp 182-184.
- Tilley L. 1998. *La consulta veterinaria en 5 minutos*. Inter-médica, Buenos Aires, Argentina, Pp 806-807.
- Zamora J, S Riedemann. 1986. Consideraciones para la interpretación de la prueba de aglutinación microscópica en el diagnóstico de leptospirosis bovina. *Arch Med Vet* 18, 145-147.