

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POST GRADO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POSTGRADO

**IDENTIFICACIÓN DE SEROGRUPOS PATOGENOS DE
Leptospira spp. EN CANINOS DOMÉSTICOS**

TESIS

PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE MAGISTER EN
CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

AUTOR

JUAN JOSÉ SIUCE MORENO

Lima – Perú

2014

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Leptospirosis	4
2.2. Aspectos históricos	5
2.3. Taxonomía y clasificación	6
2.3.1. Taxonomía	6
2.3.2. Clasificación genética	6
2.3.3. Clasificación serológica	6
2.4. Biología de las leptospiras	7
2.4.1. Características generales	7
2.4.2. Factores de virulencia	8
2.4.3. Cultivo	8
2.5. Patogenia	9
2.6. Manifestaciones clínicas	10
2.6.1. Manifestaciones clínicas en caninos	11
2.7. Diagnóstico	11
2.7.1. Examen directo	11
2.7.2. Aislamiento	12
2.7.3. Amplificación de genes	12

2.7.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	12
2.7.3.2. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAM)	13
2.7.4. Detección Serológica	13
2.7.4.1. Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT)	13
2.7.4.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	14
2.7.5. Detección genética	
2.8. Epidemiología	15
2.9. Inmunidad	16
2.9.1. Respuesta inmune	16
2.9.2. Vacunas	16
3.0. Tratamiento	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Muestras	18
3.2. Lugar de ejecución	20
3.3. Procesamiento y almacenamiento de muestras	20
3.4. Materiales	20
3.5. Evaluación serológica de las muestras	21
3.5.1. Elección de serovares para la Prueba de Microaglutinación	21
3.5.2. Preparación del antígeno para la Prueba de Microaglutinación	21
3.5.3. Evaluación serológica o tamizaje	22
3.5.4. Evaluación serológica cuantitativa o final	24
3.6. Análisis de los resultados	24
3.7. Análisis estadístico	24
IV. RESULTADOS	26
4.1. Seropositividad a leptospirosis	26
4.2. Seropositividad a los serogrupos de <i>Leptospira</i>	27
4.3. Títulos aglutinantes a los serogrupos patógenos	28
4.4. Coaglutinaciones	29

4.5.	Seropositividad según procedencia	30
4.6.	Seropositividad según edad	32
4.7.	Seropositividad según sexo	33
V.	DISCUSIÓN	36
VI.	CONCLUSIONES	42
VII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	43
VIII.	APÉNDICE	53

RESUMEN

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de gran impacto en la salud pública a nivel mundial. Los perros y otros animales, pueden infectarse, sufrir la enfermedad, constituyendo así, un factor importante en la diseminación de la bacteria hacia humanos. La infección es causada por cualquiera de los 25 serovares patógenos, de los 25 serogrupos de *Leptospira* spp. El estudio tuvo como objetivo identificar a los serogrupos de *Leptospira* spp. presentes en caninos domésticos. Para ello, se obtuvieron 305 muestras de suero sanguíneo, de perros con diagnóstico clínico presuntivo de Leptospirosis, mayores de 6 meses de edad, no vacunados o con un tiempo mayor a seis meses desde la última vacunación contra Leptospirosis. Las muestras fueron remitidas por Médicos Veterinarios al Laboratorio de Microbiología – Sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, provenientes de 31 distritos de Lima Metropolitana. Se realizó la Prueba de Microaglutinación (MAT), estableciéndose títulos $\geq 1/100$ de serorreactividad como seropositivos, utilizando cepas de referencia de los 25 serogrupos, incluyendo al nuevo serogrupo Iquitos serovar varillal 10, aislado y reportado en casos humanos en Perú. Se detectaron 177 seropositivos (58.03%), de los cuales 31 (10.16%) fueron coaglutinaciones. Los serogrupos de mayor frecuencia fueron: Iquitos (46/305; 15.08%), Tarassovi (37/305; 12.13%), Canicola (37/305; 12.13%), Australis (14/305; 4.59%), Icterohaemorrhagiae (13/305; 4.26%), Pomona (12/305; 3.93%), Mini (10/305; 3.28%) y Ballum (8/305; 2.62%). No se identificó serorreacciones a los serogrupos Bataviae, Celledoni, Hebdomadis, Louisiana, Panama, Ranarum, Sarmin.

Palabras claves: Perros, leptospirosis, leptospira, MAT, serovar, serogrupo

ABSTRACT

Leptospirosis is an important bacterial zoonosis on worldwide. Dogs and other animals can be infected and suffered the disease, they constituting an important role in the spread of the bacteria to humans. The infection is caused by any of the 250 pathogenic serovars, grouped in 25 serogroups of *Leptospira* spp. The aim of this study was to identify the serogroups of *Leptospira* spp. circulating in domestic dogs. For this, 305 serum samples were obtained from dogs, who had a presumptive clinical diagnosis of Leptospirosis, over 6 months old, unvaccinated or more than six months since the last vaccination against Leptospirosis, The samples were submitted by veterinarians to Microbiology Lab - Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine of Universidad Nacional Mayor de San Marcos, from 31 districts of Lima. The microagglutination test (MAT) was performed, establishing seroreactivity titles $\geq 1/100$ as seropositive using reference strains of the 25 serogroups, including the new serogroup Iquitos, serovar Varillal, Var 10 strain, isolated and reported human outbreaks in Peru. 177 seropositive samples (58.03%) were detected, 31 of them (10.16%) were co-agglutinations. Seropositive reacted against 18 serogroups, the most frequent were: Iquitos (46/305; 15.08%), Tarassovi (37/305; 12.13%), Canicola (37/305; 12.13%), Australis (14/305; 4.59%), Icterohaemorrhagiae (13/305; 4.26%), Pomona (12/305; 3.93%), Mini (10/305; 3.28%) and Ballum (8/305; 2.62%). There were no seroreactors to serogroups: Bataviae, Celledoni, Hebdomadis, Lousiana, Panama, Ranarum, and Sarmin.

Keywords: Dog, leptospirosis, leptospira, MAT, serovar, serogroup.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Microscopía electrónica de <i>Leptospira</i> spp.	8
Figura 2.	Estadios de la enfermedad y respuesta del hospedero.	14
Figura 3.	Escala para la lectura de la Prueba de Microaglutinación	24
Figura 4.	Porcentaje de seropositividad a <i>Leptospira</i> spp. con la prueba de Microaglutinación (MAT).	26
Figura 5.	Seropositividad a <i>Leptospira</i> spp. con la prueba de Microaglutinación (MAT).	27

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Distribución de los caninos por edad.	18
Cuadro 2. Procedencia y sexo de los animales.	19
Cuadro 3. Procedencia de los caninos.	20
Cuadro 4. Escala para la lectura de la prueba de Microaglutinación (MAT).	23
Cuadro 5. Seropositividad a serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT).	28
Cuadro 6. Títulos de anticuerpos contra serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT).	29
Cuadro 7. Coaglutinaciones y títulos de anticuerpos contra serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT).	30
Cuadro 8. Seropositividad contra serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según procedencia	31
Cuadro 9. Seropositividad contra <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según procedencia	31
Cuadro 10. Evaluación de la procedencia como factor de riesgo para la infección por <i>Leptospira</i> spp.	32
Cuadro 11. Seropositividad contra <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según edad.	32
Cuadro 12. Seropositividad contra serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba	32
Cuadro 13. Evaluación de la edad como factor de riesgo para la infección por <i>Leptospira</i> spp..	33
Cuadro 14. Seropositividad contra serogrupos patógenos de <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según sexo	34
Cuadro 15. Seropositividad contra <i>Leptospira</i> spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según sexo	34
Cuadro 16. Evaluación de sexo como factor de riesgo para la infección por <i>Leptospira</i> spp.	35

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una zoonosis de gran impacto en la salud pública a nivel mundial, causando aproximadamente 500,000 casos con un rango de mortalidad de 5-20% (Dupouey *et al.*, 2013), asociada a poblaciones con deficiencias sanitarias, tanto en áreas rurales y urbanas, presentándose principalmente en zonas o regiones tropicales (Adler y De la Pena Moctezuma, 2010; Evangelista y Cobum, 2010; Picardeu, 2013). Además, factores ambientales y naturales, incrementan la presentación de la enfermedad, produciéndose brotes en la estación de verano, o con el incremento de lluvias, fenómeno del niño e inundaciones (Levett, 2001; Pappas *et al.*, 2008). Así, los brotes más frecuentes y las prevalencias más altas de leptospirosis en humanos a nivel nacional, se reportan en la población de nuestra Amazonía (Céspedes *et al.*, 2006).

La enfermedad es causada por la infección con espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, produciendo en humanos una fiebre alta, insuficiencia renal y hepática, y que en casos graves conlleva a la muerte, conocido como el Síndrome de Weil (Adler y De la Pena Moctezuma, 2010); los mamíferos, animales de producción como el bovino, ovino, caprino, porcinos y equinos, padecen principalmente de problemas reproductivos, disminuyendo potencialmente la productividad (Ko *et al.*, 2009); los animales domésticos,

como el perro, muestran alta sensibilidad a la enfermedad causándoles severas lesiones en riñones e hígado, en caninos se ha evidenciado 4 formas de presentación o síndromes: icterica, hemorrágica, urémica (enfermedad de Stuttgart) y reproductivas (Bolin, 1996); mientras que, en gatos sólo se ha reportado la enfermedad en infecciones experimentales y algunos casos leves (Hartmann *et al.*, 2013). El humano y los animales, se infectan a través de las mucosas y superficies lesionadas o heridas, y en menor medida por vía oral, al exponerse directamente con orina de animales infectados o con fuentes de agua contaminada como acequias, riachuelos, lagunas y ríos. Los roedores son los principales diseminadores de la enfermedad, debido a que, generalmente se infectan pero no padecen la enfermedad (Lau *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2013). Sin embargo, los perros y otros animales, al infectarse y padecer la enfermedad, en algunos casos, pueden permanecer como portadores y eliminar continuamente la bacteria a través de la orina (Martins *et al.*, 2012).

Existen diferentes tipos de diagnóstico de la leptospirosis, siendo el aislamiento inicialmente, el método más empleado. Sin embargo, su baja sensibilidad cercano al 30% y el intervalo de tiempo de 2 meses para descartar la enfermedad (Oliveira, 1999), ha conllevado a la utilización de otras técnicas de diagnóstico mucho más rápidas, por ello, protocolos basados en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), son muy rápidas y eficientes actualmente para definir la enfermedad, sin embargo, no es muy adecuado para hacer un análisis epidemiológico (OIE, 2014), debido a que, *Leptospira* posee más de 250 serovariedades patógenas, que por su similitud antigénica están agrupados en 25 serogrupos, y los protocolos actuales de PCR, no pueden definir el serovar/serogrupo infectante, a pesar que sí distinguen entre especies patógenas y saprófitas (Stoddard *et al.*, 2009; Picardeau, 2013). Así, la prueba de Microaglutinación (MAT), es la herramienta diagnóstica, de referencia internacional, con mejor capacidad de distinguir y cuantificar anticuerpos contra determinado serogrupo (patógeno y saprófito). MAT, emplea como antígeno leptospirosas vivas, correspondiente a serovares de referencia, y en el mejor de los casos serovares autóctonos o más frecuentes. A pesar de ello, MAT, requiere de un análisis de los títulos de anticuerpos, signos clínicos del paciente, y análisis bioquímicos, para definir una posible exposición, infección reciente o enfermedad (Picardeau, 2013; OIE, 2014).

En nuestro país se han desarrollado evaluaciones de la leptospirosis en humanos y diferentes especies animales, encontrándose positivos en todas las especies estudiadas (Céspedes *et al.*, 2006). La leptospirosis canina, es un hallazgo, o al menos un diagnóstico presuntivo frecuente en las diversas clínicas veterinarias de Lima. Siendo un adecuado diagnóstico, importante para una pronta recuperación y control de esta zoonosis. Por ello, tanto para el diagnóstico y producción de vacunas, es de gran importancia determinar y conocer los serovares/serogrupos circulantes de *Leptospira* spp. en cada especie de acuerdo a cada región geográfica. Además, la evaluación de la leptospirosis canina puede estimar el riesgo de la enfermedad a los humanos en determinadas áreas específicas, teniendo gran impacto en la salud pública (Martins *et al.*, 2012). Por ello, el propósito del presente trabajo fue determinar los serogrupos de *Leptospira* spp. presentes en perros con diagnóstico presuntivo de leptospirosis, remitidos al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leptospirosis

La leptospirosis, es una zoonosis de gran impacto en la salud pública produciendo gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en zonas tropicales (Bharti *et al.*, 2003; Guerra, 2013). La enfermedad, causada por la infección con espiroquetas patógenas del género *Leptospira*, produce problemas reproductivos en animales de producción como el bovino, ovino, caprino, porcinos y equinos (Adler y De la Pena Moctezuma, 2010; Picardeau, 2013). La presentación de la enfermedad en humanos y caninos son muy similares, produciendo desde una infección subclínica hasta severos signos de disfunción multiorgánica (Mayer-School *et al.*, 2013). El humano y animales se infectan a través de las mucosas y superficies lesionadas o heridas, y en menor medida por vía oral, al exponerse directamente con orina de animales infectados o con fuentes de agua contaminada como acequias, riachuelos, lagunas y ríos. Los roedores son los principales diseminadores o fuentes de contaminación, debido a que, generalmente se infectan pero no padecen la enfermedad (De Faria *et al.*, 2008). El perro puede actuar como un portador asintomático o reservorio para la infección humana, teniendo un papel importante desde el punto de

vista epidemiológico, considerando que es la mascota de preferencia tanto en áreas rurales como urbanas (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

La educación, edad, ingresos, la densidad poblacional y el tipo de vivienda de un dueño del animal doméstico de un barrio en el que residen los perros son algunos de los factores que pueden tener un impacto en el estado de salud debido a las similitudes en las condiciones de vida compartidos por las mascotas y sus dueños. Otros factores que pueden influir en la incidencia de leptospirosis canina en entornos urbanos incluyen la proximidad a terrenos públicos o abiertos que ofrecen oportunidades de recreación, vivir dentro de las zonas recientemente urbanizadas, la agricultura y la ganadería relacionada actividades en la región (Ward *et al.*, 2004; Ghneim *et al.*, 2007). Otros actores de gran importancia son el clima tropical, el incremento de lluvias e inundaciones (Hartskeerl, 2005).

2.2. Aspectos Históricos

El año 1886, en Heidelberg, Adolfo Weil reportó el síndrome de leptospirosis icterica con fallo renal, casos similares se habían reportado en trabajadores de alcantarillado (Musso y La Scola, 2013). En la antigua china, se describe como una enfermedad ocupacional de los cultivadores de arroz; en Japón, se la denomina como fiebre de Otoño o “Akiyami”. Sitmsom al realizar la evaluación histológica de un riñón, mediante una tinción con plata, de un paciente fallecido durante una epidemia de fiebre amarilla, observa la presencia de un conglomerado de espiroquetas con extremos encorvados, semejantes a un signo de interrogación, denominándolas “Spiroquetas interrogans” (Levett, 2001). Wolbach y Binger, en 1914, realizaron la primera descripción de leptospiras saprófitas (Cerqueira y Picardeu, 2009). Finalmente, se realizó la confirmación de la leptospirosis como enfermedad con la detección de leptospiras patógenas y anticuerpos en sangre de mineros con el Síndrome infeccioso (Naranjo, 2010).

2.3. Taxonomía y Clasificación

2.3.1. Taxonomía

Las especies de *Leptospira* se ubican en la división *Procariones*, Clase *Schizomicetes*, orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y en el género *Leptospira*. El género *Leptospira* spp. no ha tenido una clasificación definitiva. Al inicio, se realizó una clasificación fenotípica, en el cual se dividió en 2 especies: *L. interrogans* y *L. biflexa*, patógena y saprófitas respectivamente, debido a la inhibición del crecimiento de las cepas patógenas en medios con 8-azaguanina (Johnson y Rogers, 1964). Actualmente, se utiliza la clasificación genética, dividiéndolas en especies patógenas, intermedias y saprófitas. Sin embargo, la clasificación más difundida y de utilidad diagnóstica, es la clasificación serológica con más de 250 serovares patógenos (Chappel *et al.*, 2004; Cerqueira y Picardeau, 2009; Murray, 2013).

2.3.2. Clasificación genética

La clasificación fenotípica ha sido reemplazada por la clasificación genética, el método de hibridación ADN-ADN es ampliamente usado como estándar para la determinación de especies en los procariones (Patel, 2001). Primeros estudios genómicos demostraron que *L. interrogans* sensu lato, estaba constituido por al menos 6 especies diferentes. Así basándose en el método de hibridación ADN-ADN, actualmente el género se ha dividido en 20 especies genómicas o genomoespecies (Ver Apéndice A1.1), de las cuales 09 especies son patógenas, 05 especies intermedias y 06 especies saprófitas (Chappel *et al.*, 2004; Cerqueira y Picardeau, 2009; Musso y La Scola, 2013; Picardeau, 2013).

2.3.3. Clasificación serológica

La prueba de Absorción de Aglutinación Cruzada ha sido utilizada durante décadas y ha permitido la clasificación en más de 250 serovares patógenos, definiéndose al serovar como la unidad taxonómica de *Leptospira*. Estableciéndose que dos cepas se consideran diferentes, si por lo menos el 10% de títulos heterólogos sigue siendo

regularmente asociado con uno de los dos antiseros después de la absorción cruzada con cantidades adecuadas de antígenos heterólogos (Kmety y Dikken, 1993). Así, serovares con similitud antigénica, conforman un serogrupo. En la actualidad se han establecido 25 serogrupos patógenos. Sin embargo, no existe correlación entre la clasificación genética con la serológica. Así, serovares de un serogrupo, pueden pertenecer a distintas especies de *Leptospira*. No obstante, la clasificación serológica es la más importante debido a la utilidad en el diagnóstico y desde el punto de vista epidemiológico (Cerqueira y Picardeau, 2009; Picardeau, 2013).

2.4. Biología de las leptospiras

Las leptospiras son bacterias Gram negativas, que inicialmente fueron observadas en aguas estancadas, descritas como bacterias de mayor tamaño en cuanto a longitud, pero más delgadas que las enterobacterias o mayoría de bacterias, tienen una forma de espiroquetas. Su aislamiento no se realiza en medio convencionales como los agares, prefiriendo los medios líquidos enriquecidos (Picardeu, 2013).

2.4.1. Características generales

Las leptospiras son aerobios obligados, en forma de espiroqueta con doble membrana celular típica, similar a la gramnegativa, en el cual la membrana citoplasmática está estrechamente relacionada a la pared de peptidoglicano y se superpone una membrana externa (Cullen *et al.*, 2004), en cuya membrana los lipopolisacáridos (LPS), es el principal componente antigénico (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas y poseen una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C. Posee un tamaño de 0.1 µm de diámetro y 6-20 µm de longitud (Figura 1). Poseen extremos en forma de gancho, característica distinguible de otras espiroquetas, y posee dos endoflagelos o flagelos periplásmicos que les confiere gran movilidad. (Miraglia *et al.*, 2013; Picardeu, 2013). Su genoma está compuesto por dos cromosomas circulares, una de mayor tamaño con aproximadamente 4 Mb, y una menor de 300 Kb, conteniendo de 35–41 mol% de G+C (Ko *et al.*, 2009; Adler *et al.*, 2011).

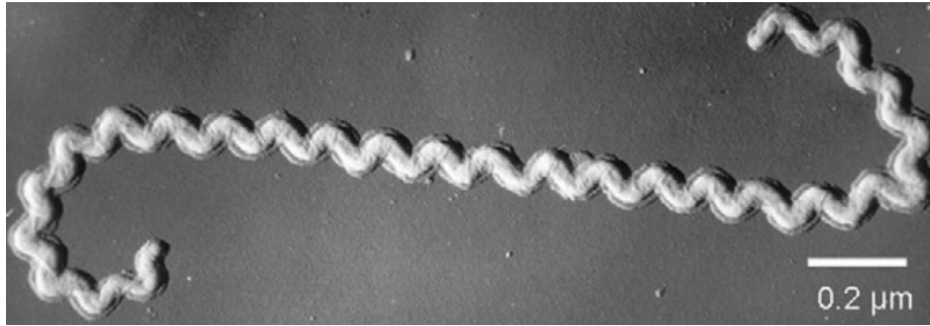


Figura 1. Microscopía electrónica de *Leptospira* spp. (Fuente: Picardeau, 2013)

2.4.2. Factores de Virulencia

Se tiene un mejor entendimiento sobre la base molecular de la patogénesis de la leptospirosis, a través del estudio de la diversidad de proteínas que expresan las leptospiras desde su unión a ligandos o receptores en el hospedero, hasta la producción de enzimas y moduladores inmunológicos (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010).

El inicial secuenciamiento del genoma de tres especies representativas, *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii* y *Leptospira blifexa*, patógena, patógena intermedia y saprófita, respectivamente permitió entender mejor el metabolismo, y principalmente sus factores de virulencia, etc. (Ko *et al.*, 2009; Adler *et al.*, 2011; Murray, 2013). Así se ha determinado que la virulencia de esta bacteria se debe a la gran movilidad y habilidad de invadir tejidos por medio de sus proteínas de adhesión, como las proteínas de membrana externa (OMPs), y lipoproteínas, LipL32, LipL41 y LipL21, estas últimas juegan un rol importante en la interacción bacteria-hospedero, además de participar en la translocación de proteínas y la inducción de la respuesta inflamatoria. Además, una proteína similar a OMP, Loa22, es citotóxica *in vitro* para células renales de la rata, además de alterar la respuesta inmunes (Zhang *et al.*, 2010). Así, acompañada por la producción de toxinas y enzimas, como son las hemolisinas SphH, proteínas formadoras de poros que poseen actividad esfingomielinasa y fosfolipasa, y la enzima catalasa (KatE), esta última producida por solo cepas patógenas, que le confiere resistencia frente al estallido respiratorio (Gongalves de Albuquerque *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013).

Se ha evidenciado que ciertas mutaciones, pueden potenciar la virulencia y resistencia de las leptospiras. Así, algunas mutaciones han alterado e incrementado la motilidad, adquisición de nutrientes, supervivencia en los macrófagos y resistencia a la temperatura y estrés oxidativo, por diferentes mecanismos aún no definidos (Ristow *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2010; Lourdault *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Al igual que otras bacterias, la expresión de proteínas en *Leptospira* está supeditada al estímulo externo. Así, el incremento de la temperatura incrementa la expresión de una proteína de la membrana periférica (Nally *et al.*, 2001); las adhesinas, lig A y lig B, se incrementan con el aumento de la osmolaridad celular (Matsunaga *et al.*, 2007); y bajos niveles de hierro, pueden reducir la expresión de las proteínas de membrana externa (Cullen *et al.*, 2002).

2.4.3. Cultivo

Las leptospiras son aerobias estrictas, los medios de cultivo adecuados necesitan de amonio como fuente de nitrógeno y ácidos grasos de cadenas largas como única fuente de carbono, así obtienen energía de la β -oxidación de los ácidos grasos. El medio de cultivo más comúnmente utilizado es el medio líquido Ellinghausen-McCullough / medio Johnson-Harris (EMJH), que contiene ácido oleico, albúmina de suero bovino, y polisorbato (Gongalves de Albuquerque *et al.*, 2012). Los cultivos son incubados en aerobiosis con una temperatura de 28-30 °C, se puede observar el crecimiento en 7-15 días aproximadamente, a partir de aislados en el medio EMJH, mientras que en el primer aislamiento se necesitan de 8 a 12 semanas. (Levett, 2001). Sin embargo, no es un método eficiente para el diagnóstico debido a su baja sensibilidad entre otros factores intrínsecos de la biología de las leptospiras (Oliveira, 1999).

2.5. Patogenia

Las leptospiras, pueden ingresar al hospedero, humanos y animales, a través de las mucosas, heridas o piel lesionada, luego de lograr acceder al torrente sanguíneo, colonizan principalmente el riñón e hígado, debido a la gran cantidad de lípidos (ácidos

grasos) que poseen estos órganos. Sin embargo, en humanos y caninos, pueden colonizar otros órganos como el pulmón (Adler *et al.*, 2011; Janwithayanan *et al.*, 2013).

La gran movilidad que poseen las espiroquetas y por medio de sus proteínas de adhesión, como las proteínas de membrana externa (OMPs) y lipoproteínas, LipL32, LipL41 y LipL21, le permiten invadir tejidos, donde proliferan y producen sus toxinas y enzimas, hemolisinas SphH, esfingomielinasa y fosfolipasa, y la enzima catalasa (KatE), que conjuntamente con la respuesta inmune, desencadenan la lesión tisular produciendo, en infecciones severas, fallo renal y hepático, que en muchos casos conlleva a la muerte (Adler *et al.*, 2011; Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2012; Confer y Ayalew, 2013).

2.6. Manifestaciones Clínicas

La presentación clínica varía de acuerdo a la especie afectada y al serovar infectante. En bovinos, ovino, caprinos y porcinos, la enfermedad no produce signos clínicos evidentes, sin embargo, cursa con una infección crónica y puede producir abortos acompañados de fiebre leve, debilitamiento y anorexia. De manera similar, cursa la infección en equinos, pero frecuentemente causa uveítis recurrente llamada “ceguera lunar” (Verma *et al.*, 2013).

2.6.1. Manifestaciones clínicas en caninos

Los humanos y los perros suelen ser muy susceptibles a la infección por cualquier serovar de *Leptospira* spp., aunque se ha reportado cierta adaptación de los perros al serovar canicola. La infección, generalmente produce fiebre alta, ictericia, debilitamiento y puede conducir a la muerte por insuficiencia renal y hepática. Así, en perros se ha definido cuatro síndromes: ictérica, hemorrágica, urémica o enfermedad de Stuttgart y reproductivos (Bolin, 1996).

Algunos hallazgos clínicos no específicos en sangre son los siguientes: Leucocitosis con desviación a la izquierda, trombocitopenia, elevación de los niveles de urea, creatinina, aminotransferasas, bilirrubina; en análisis de orina: Proteinuria, piuria, hematuria microscópica, cilindros granulares y hialinos (Oliveira *et al.*, 2012; Musso y La Scola, 2013; Renaud *et al.*, 2013).

La forma aguda de la leptospirosis canina, es caracterizada por fallo renal agudo y crónico, y alteración hematológica. Se ha atribuido al serogrupo Icterohaemorrhagiae y Canicola, como responsables de esta forma aguda de leptospirosis. Sin embargo, se evidenció que también puede ser causado por otros serovares de otros serogrupos como Australis, Pomona y Grippotyphosa (Adamus *et al.*, 1997; Andre-Fontaine *et al.*, 2003).

La forma sub-aguda o crónica, puede ser causada por cepa menos virulenta, empero, con el tiempo y acompañado de una inadecuada terapia antibiótica, puede llevar a una sub aguda hepatitis o fallo renal, así síndromes de polidipsia y poliuria no asociada a un agente etiológico, podría estar asociada a leptospirosis crónica (Muller *et al.*, 1999; Triger, 2004).

2.7. Diagnóstico

Para realizar un adecuado diagnóstico se necesita conocer la naturaleza de infección de la bacteria y respuesta inmune del hospedero (Figura 2).

2.7.1. Examen Directo

Si bien las leptospiras son relativamente más largas que la mayoría de bacterias patógenas (6 a 20 μm), son muy delgadas (0.15 μm), y no se tiñen bien con la coloración Gram, necesitándose un microscopio de campo oscuro. El límite menor detectable es de $10^4/\text{ml}$ en sangre durante la primera semana de infección, el pico más alto es de $10^8/\text{ml}$, siendo teóricamente una herramienta útil en el diagnóstico en su fase inicial. Sin embargo, restos celular y otros artefactos pueden conllevar a falsos negativos (Picardeau, 2013).

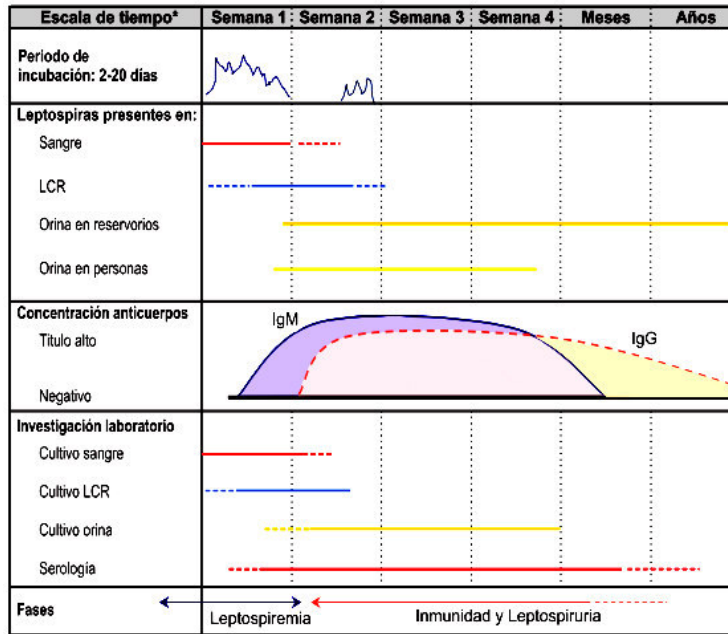


Figura 2. Estadios de la enfermedad y respuesta del hospedero (Fuente: Céspedes *et al.*, 2006)

2.7.2. Aislamiento

El diagnóstico adecuado sería el aislamiento y determinar el serovar/serogrupo infectante, dependiendo del momento de la infección o enfermedad se pueden tomar las muestras adecuadas. Así, la sangre, sería la muestra ideal en la fase inicial o leptospirémica; la orina, luego de una semana aproximadamente, después del inicio de los signos clínicos, fase de leptospiruria. Sin embargo, el aislamiento presenta una baja sensibilidad, aproximadamente de un 30% y requiere de por lo menos dos meses para un resultado final (Mérien *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 2006)

2.7.3. Amplificación de genes

2.7.3.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se ha demostrado que el PCR en tiempo real, es un método alternativo al del aislamiento, tinción de plata o la inmunofluorescencia, ofreciendo mejores resultados por su mayor sensibilidad (Chagas-Junior *et al.*, 2012). Así, se han desarrollado diferentes protocolos en base a la

detección genética de leptospiras, tanto en orina y sangre, desde protocolos de PCR convencional hasta en PCR tiempo Real, ya sea usando la tecnología “SYBR Green” o el de las sondas “TaqMan”. Sin embargo, pocos tienen validez clínica. Siendo los límites de detección de 10 a 100 leptospiras/ml, esta herramienta molecular permite discriminar adecuadamente Leptospiras patógenas de saprófitas, realizándose el análisis de los productos y de la temperatura de disociación se podría detectar hasta la especie, no siendo posible en la actualidad bajo esta técnica, la detección de serogrupos o serovares. Además, la detección genética en sangre se limita solo a la primera semana de infección, y en el caso de la orina, en la fase de leptospiruria (Stoddard *et al.*, 2009; Picardeau, 2013).

2.7.3.2. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP)

Esta prueba a diferencia del PCR, solo requiere una temperatura constante (60 – 65 °C), y la detección es visual por un cambio de color de los reactivos. Los protocolos que detectan *lipLAI* y *rrs*, son los de mayor uso para la detección de especies patógenas, su relativo costo menor y rapidez, es un método de diagnóstico siendo utilizado en diferentes países (Picardeau, 2013).

2.7.4. Detección Serológica

2.7.4.1. Prueba de Aglutinación microscópica (MAT)

Denominada también La prueba de Martin y Pettit, fue desarrollada por el Instituto Pasteur, hace más de un siglo, actualmente es la prueba estándar para el diagnóstico de leptospirosis Humana y Animal. Es una prueba cuantitativa, que tiene la capacidad de detectar los títulos de anticuerpos contra los diferentes serovares de *Leptospira* spp. La prueba requiere de serovares de referencia de *Leptospira* spp., que se utilizan a partir de cultivos de 5-14 días en medio EMJH o medios líquidos, con una cantidad promedio de $1-2 \times 10^8$ /mL., los cuales son enfrentados con suero

o plasma sanguíneo a diferentes títulos (1/100, 1/200, 1/400, etc), se incuban a 28 °C durante 2 horas, alternativamente se puede incubar a 37 °C grados durante 1 hora. Posterior a ello, se evalúan iniciándose desde los títulos menores, para la detección de aglutinaciones, utilizando un microscopio de campo oscuro. Si existe una aglutinación mayor a 50% del campo se considera Aglutinación positiva al respectivo título y se prosigue hasta la detección del mayor título (Cerqueira y Picardeau, 2009; Picardeau, 2013).

MAT, basándose en la producción de anticuerpos específicos contra leptospiras, a partir de 8-10 días después de presentarse los signos clínicos (Mérien *et al.*, 1995), es una herramienta diagnóstica muy buena pero dependiente de los hallazgos clínicos y hallazgos complementarios característicos de la enfermedad. Así, títulos iguales o mayores de 1/400 a determinado serovar, acompañado de signos clínicos, confirman el diagnóstico. Sin embargo, dependiendo de evolución y adaptación de los serovares y hospederos en determinada ubicación geográfica, títulos relativamente bajos como 1/100, son resultados confirmatorios; por otro lado, lugares endémicos a cierto serovar, se consideran títulos relativamente altos ($\geq 1/800$) para confirmar la enfermedad. Es importante, realizar un análisis completo de los resultados y el historial del paciente, las vacunas pueden ser detectables por la prueba, produciéndose títulos máximos de 1/200, considerándose falsos positivos. El entendimiento de la cinética de producción de anticuerpos es importante. Así, títulos relativamente bajos, pueden indicar una infección reciente o inicial, como también pueden ser títulos a exposición anterior o crónica (Picardeau, 2013).

2.7.4.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se han desarrollado diversos Kits de diagnóstico utilizando la técnica de ELISA, principalmente enfocado en la detección de anticuerpos IgM, siendo relativamente adecuados para el diagnóstico inicial, debido a que

MAT detecta anticuerpos IgG, a partir del séptimo día post-infección. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de la prueba no es la óptima, debido a la gran cantidad de serovares y la diversidad de acuerdo a la región geográfica. Anticuerpos antileptospira de tipo IgM, pueden ser detectables 5 días antes de los síntomas y permanecer hasta 5 meses. A pesar de ser una herramienta mundialmente utilizada, esta prueba requiere una posterior confirmación con MAT (Picardeau, 2013).

2.8. Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial, presentándose más de 500,000 mil casos de leptospirosis severa en humano, con un porcentaje de mortalidad mayor a 23% (Cao *et al.*, 2010). Siendo más frecuente, en regiones tropicales, que favorecidas por las intensas lluvias, combinada con la densa población que vive en pobreza y la ausencia de servicios sanitarios, tanto en áreas rurales como urbanas, hacen que la enfermedad se mantenga y distribuya (Balassiano *et al.*, 2012). Los caninos juegan un papel importante para la transmisión de la leptospirosis al humano, siendo uno los principales factores de los 3 patrones establecidos para la leptospirosis humana (Vinetz *et al.*, 1996; Richardson y Gauthier, 2003).

Los animales infectados son los reservorios de las leptospiras, principalmente los roedores, que generalmente están infectados sin sufrir la enfermedad, pudiendo permanecer en los riñones meses, años e inclusive toda su vida (Levett, 2001), diseminando la bacteria en los diferentes lugares de crianza o centros de producción animal, inclusive, parques en áreas urbanas, fuente principal para la infección de caninos y demás especies. Además, los desastres naturales, principalmente inundaciones, producen brotes o incrementan la incidencia de la enfermedad (Lau *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012).

En el Perú, se ha reportado muchos brotes y casos confirmados en humanos. Los departamentos de mayor incidencia son Loreto, Madre de Dios, Lima y Cusco. Se han realizados diversos estudios que corroboran la infección y enfermedad en diferentes

especies animales de producción, silvestres y mascotas, de los cuales se han identificado y aislado diferentes serovares patógenos (Céspedes *et al.*, 2006; Matthias *et al.*, 2008).

2.9. Inmunidad

2.9.1. Respuesta Inmune

A pesar que, las leptospiras patógenas tienen la capacidad de evadir la fagocitosis y el sistema del complemento, la respuesta inmune inicial se realiza a través de la inmunidad innata, que es capaz de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como son los lipopolisacáridos (LPS) de las leptospiras, por medio de receptores tipo Toll (TLR), TLR2 y TLR4, que activan al factores nucleares, como NF- κ B, que induce la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8) al factor de necrosis tumoral (TNF). Finalmente logran montar una respuesta específica contra el serovar infectante, mediante la producción de anticuerpos IgM e IgG, además de la producción de interferón gama (IFN γ) y respuesta asociada a células T4 (CD4+) y T γ δ (Yang, 2007; Goncalves-de-Albuquerque *et al.*, 2012; Del Carlo Bernardi, 2012).

2.9.2. Vacunas

Se ha evidenciado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que anticuerpos específicos, contra determinado serovar, aglutinar y opsonizar a las leptospiras, de esta forma son fácilmente fagocitadas, y lisadas conjuntamente con el sistema del complemento (Adler y Faine, 1983; Jost *et al.*, 1986; Masuzawa *et al.*, 1996).

Los primeros esfuerzos para inmunizar al humano y animales se realizaron en 1920, utilizando células bacterianas enteras muertas, procesadas por diferentes métodos como el calor, formol, fenol, irradiación, etc. (Faine *et al.*, 1999). En la actualidad, existen diversas vacunas contra la Leptospirosis, las más difundidas, tanto en el humano como en las diferentes especies animales, son las vacunas inactivadas que son emulsiones conteniendo de 2 a 5 serovares. Cada serovar puede producir anticuerpos aglutinantes contra los diferentes serovares de un serogrupo. Por otro lado, se vienen realizando diversos trabajos, utilizando tecnologías genéticas recientes, con el objetivo de producir

inmunidad contra todos los serovares o especies patógenas, así existen algunas vacunas recombinantes en proceso de evaluación (Koizumi y Watanabe, 2005; Dellagostin *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2013).

Si bien, las vacunas no son eficientes y frecuentemente no empleadas en las algunas localidades, debido a que se han reportado muchos serogrupos circulantes en las infecciones y las vacunas no logran inmunizar contra todas los serovares. Es importante tener en cuenta, que las vacunas, actualmente, previenen la leptospirosis aguda, evitando los signos clínicos como fiebre y la ictericia. Sin embargo, podría no evitar la infección, si el animal es enfrentado a altas dosis, evidenciándose como una infección crónica, poblando así la leptospira el tejido renal, incrementando su diseminación (Andre-Fontaine *et al.*, 2003; Klaasen *et al.*, 2003).

Las vacunas producidas en Estados Unidos inicialmente eran bivalentes, ante la necesidad de ofrecer una mayor protección, actualmente la más comercializada es la vacuna tetravalente, que contiene a los serovares Canicola-Icterohaemorrhagiae, Gryppothyphosa y Pomona, (Ellis, 2010). Mientras que en Europa, predominantemente, Gryppothyphosa, Australis y los clásicos Canicola-Icterohaemorrhagiae (Nobivac® L4 – MSD Animal Health) (Klaasen *et al.*, 2013)

2.10. Tratamiento

Tanto en humanos y animales, los antibióticos son de gran utilidad en el tratamiento de la enfermedad. Se ha usado ampicilina, amoxicilina, eritromicina y azitromicina para el tratamiento de la Leptospirosis leve. Penicilina G y la doxiciclina se recomiendan para los casos severos. Es importante realizar el tratamiento completo y con las dosis adecuada, de acuerdo a la especie, debido a que, si bien, el paciente puede mostrar una recuperación completa, las leptospiras pueden permanecer en riñones, ser portadores y diseminadores de la enfermedad (Levett, 2001; Sarkar *et al.*, 2012; Miraglia *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre o suero de perros (*Canis lupus familiares*) con diagnóstico presuntivo de leptospirosis remitidos por Médicos Veterinarios de varias clínicas veterinarias de Lima Metropolitana, al Laboratorio de Microbiología Veterinaria - Sección Bacteriología. Entre los signos clínicos e historia clínica describieron: Fiebre, vómitos, hemorragias, oliguria, anuria, lumbalgia, dolor renal a la palpación, mialgias, diarrea, ictericia, convulsiones, poliuria, incremento de transaminasas, uremia, etc.) El criterio de selección o inclusión de muestras fueron: Animales mayores a los 6 meses de edad (ver Cuadro1), sin vacunación contra leptospirosis o al menos 6 meses transcurrido desde la última vacunación previa.

Cuadro1. Distribución de los muestras de caninos según edad.

Edad (años)	N° Perros
0.5 a 3	87
4 a 7	91
8 a 11	78
12 >	49
Total	305

Seleccionándose un total de 305 muestras remitidas durante los años 2012-2014 (107, correspondientes al 2012; 176, 2013; y 22, 2014), procedentes de 31 distritos de Lima Metropolitana (Cuadro 2), ubicados en cuatro zonas geográficas: Lima Centro, Lima Este, Lima Norte y Lima Sur. (Cuadro 3).

Cuadro 2. Procedencia y sexo de los caninos. Se obtuvieron muestras provenientes de 31 distritos de Lima Metropolitana.

DISTRITO	Caninos		Total
	Machos	Hembras	
Ate	29	17	46
Surco	18	16	34
San Borja	23	8	31
La Molina	19	4	23
Cercado de Lima	7	7	14
La Victoria	8	6	14
Santa Anita	6	8	14
El agustino	6	3	9
San Juan de Miraflores	6	3	9
San Luis	2	7	9
Miraflores	5	3	8
San Juan de Lurigancho	5	2	7
Surquillo	4	3	7
Rímac	4	2	6
San Martín de Porres	3	3	6
Chorrillos	2	3	5
Lurigancho - Chosica	4	1	5
Comas	3	2	5
Lince	5	0	5
San Isidro	4	1	5
Villa El Salvador	4	1	5
Villa maría del triunfo	5	0	5
Breña	3	1	4
Carabaylo	1	3	4
Independencia	2	2	4
Jésus María	4	0	4
Lurín	2	2	4
Pachacámac	4	0	4
Pueblo libre	3	1	4
San Miguel	1	3	4

Los olivos	1	0	1
Total	193	112	305

Cuadro 3. Procedencia de los muestras de caninos según zonas de Lima Metropolitana.

Procedencia	N° Perros
Lima Centro	164
Lima Este	89
Lima Sur	32
Lima Norte	20
Total	305

3.2. Lugar de Ejecución

La selección de muestras, pruebas diagnósticas y análisis de resultados se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología – Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. Procesamiento y almacenamiento de muestras

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm., durante 5 minutos para obtener el suero sanguíneo. Luego fueron almacenadas en microviales a -20 °C, hasta su procesamiento.

3.4. Materiales

- Microviales de plástico de 1.5 ml
- Pipetas Pasteur plástico
- Pipetas Pasteur vidrio
- Tubos vacotainer de 5 ml con anticoagulante
- Tubos de 5 y 10 ml
- Centrífuga
- Frascos de vidrio de 500 y 1000 ml

- Espectrofotómetro
- Láminas portaobjetos
- Pipeteadores de 10, 300 y 1000 ul
- Tips o puntas de de 10, 300 y 1000 ul.
- Dispensador de diferentes volúmenes (25-300 ml)
- Microscopio de campo oscuro
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml
- Gradillas
- Canaletas de 10 ml
- Microplacas de 96 pocillos para inmunoensayos.

3.5.Evaluación serológica de las muestras

Se realizó la detección de anticuerpos contra leptospirosis utilizando la prueba estándar de Microaglutinación o Aglutinación Microscópica (MAT) como los describe Faine (1982) con los requerimientos y recomendaciones actuales (OIE, 2014). Esta prueba necesita de antígenos vivos, los cuales son preparados o cultivados previamente a la evaluación serológica. MAT, está comprendida en dos fases: una inicial o de tamizaje, y la segunda, final o cuantitativa (INS, 2002).

3.5.1. Elección de serovares para la Prueba de Microaglutinación.

Se seleccionaron serovares de referencia internacional, de cada serogrupo patógeno de los 25 establecidos: Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hebdomadis, Hurtsbridge, Icterohaemorrhagiae, Iquitos, Javanica, Louisiana, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Shermani y Tarassovi (Apéndice A1.2). Estos serovares fueron obtenidos de la Unidad de Espiroquetas del Instituto Pasteur – Francia. El criterio de selección fue tomado del manual de Leptospirosis (OMS, 2008), incluyéndose en el presente estudio el nuevo serogrupo Iquitos, serovar Varillal cepa Var10 (Matthias *et al.*, 2008), que desde su aislamiento en nuestra Amazonía, ha incrementado la

sensibilidad y frecuencia de positivos en los brotes en humanos de la población de Loreto y Madre de Dios (Céspedes *et al.*, 2006).

3.5.2. Preparación del antígeno para la Prueba de Microaglutinación

Los serovares fueron almacenados en un medio de mantenimiento, un medio semisólido denominado Medio Fletcher (Anexo A.1), evaluándose el crecimiento en relación al tamaño del halo de crecimiento denominado “anillo o disco Dinger”, posterior a ello, se cultivo 0.5 ml del medio Fletcher en tubos con 5 ml. de medio de cultivo líquido específico para leptospiras, Medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Anexo A.2), en tubos de 5 ml, a 28 °C durante 4-8 días.

Se evaluó el crecimiento de leptospiras de cada serovar, hasta obtener una cantidad de $1-2 \times 10^8$ leptospiras/ml equivalente a una transmitancia de 60-70% utilizando un filtro de 400 nm (Espectofotómetro Marca: Unico, Modelo UV/VIS S2100). Posterior a ello se evaluó la viabilidad celular (movilidad) y la ausencia de contaminación utilizando un microscopio de campo oscuro (OMS, 2008; OIE, 2014).

Los tubos con un adecuado crecimiento, posterior a la evaluación se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su utilización en la prueba de Microaglutinación, los serovares disponibles se utilizaron el mismo día de comprobarse su crecimiento óptimo.

3.5.3. Evaluación serológica inicial o de tamizaje

El procedimiento inicial permite identificar si la muestra posee anticuerpos contra algún serogrupo patógeno de *Leptospira* spp., a continuación se detalla el procedimiento (INS, 2002):

- a. Agregar 5 μ l de la muestra o suero problema en 245 μ l de solución salina fisiológica (CINa 0.85%), homogenizar la solución para obtener una dilución de la muestra de 1:50.

- b. Dispensar por duplicado 50 µl de solución anterior en pocillos de microplacas para inmunoensayos en forma vertical o en una columna para cada serovar a evaluar.
- c. Agregar 50 µl de solución salina fisiológica (ClNa 0.85%) a un pocillo para el control del antígeno o “pocillo control”.
- d. A cada columna corresponde a un antígeno. Descargar 50 µl de antígeno en los correspondientes pocillos pareados, incluyendo el “pocillo control”. Repetir para cada uno de los antígenos probados. La dilución final del suero es entonces 1/100.
- e. Cubrir la placa de microtitulación e incubarla a temperatura de 28 °C en la oscuridad por 2 horas.
- f. Dispensar 2.5 µl de cada uno de los pocillos a un portaobjetos, columna por columna. La lectura con el microscopio de campo oscuro de cada pocillo se determina en relación a la aglutinación del antígeno control correspondiente.

Los sueros con al menos una aglutinación del 50% de las leptospiras (comparadas con el antígeno control) es considerado seropositivo o serorreactivo (OMS, 2008; OIE, 2014), las muestras que mostraban un porcentaje de aglutinación de 25-50% fueron calificadas como sospechosas, pasando por una reevaluación, hasta definirlo como negativo o positivo. Para ello, se utilizó el siguiente esquema o escala (Cuadro 4) (INS, 2002). Finalmente, muestra con 2 cruces a más son consideradas positivas (Figura 3).

Cuadro 4. Escala para la lectura de la prueba de Microaglutinación. Muestras con 2 cruces a más son consideradas positivas.

Microaglutinación		
Cruces (aglutinación)	observación	Estado
+	25% Aglutinación con 75% de células libres.	Negativo
++	50% Aglutinación con 50% de células libres.	Positivo
+++	75% Aglutinación con 25% de células libres.	Positivo
++++	100% Aglutinación ó lisadas con 0-25% de células libres.	Positivo

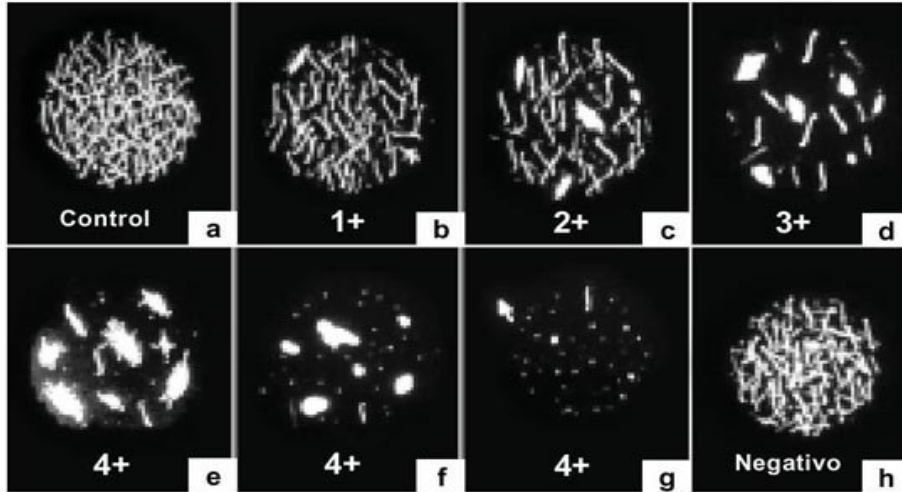


Figura 3. Escala visual de aglutinación a Leptospirosis con la prueba de Microaglutinación (MAT). Muestras con 2 cruces a más son consideradas positivas.

3.5.4. Evaluación serológica cuantitativa o final

Permite una evaluación de la cantidad de anticuerpos aglutinantes o títulos máximos contra determinado serovar (INS, 2002). A continuación se detalla el procedimiento:

- a. Agregar 5 μ l de la muestra o suero problema en 245 de solución salina fisiológica (CINa 0.85%), homogenizar la solución para obtener una dilución de la muestra de 1:50.
- b. Dispensar 100 μ l de solución anterior en el primer pocillo de microplacas para inmunoensayos en forma vertical o en una columna (Solución A).
- c. Agregar 50 μ l de solución salina fisiológica (CINa 0.85%) a cada pocillo en forma vertical incluyendo un pocillo para el control del antígeno o “pocillo control”.
- d. Dispensar 50 μ l de solución A, hacia el siguiente pocillo en forma vertical y homogenizar, sucesivamente, hasta obtener títulos de 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800.

- e. A cada columna corresponde a un antígeno. Descargar 50 μ l de antígeno en los correspondientes pocillos, incluyendo el “pocillo control”. La dilución final del suero es entonces 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600, respectivamente.
- f. Cubrir la placa de microtitulación e incubarla a temperatura de 28 °C en la oscuridad por 2 horas.
- g. Dispensar 2.5 μ l de cada uno de los pocillos a un portaobjetos, columna por columna. La lectura con el microscopio de campo oscuro de cada pocillo se determina en relación a la aglutinación del antígeno control correspondiente.
- h. Los sueros con al menos una aglutinación del 50% de las leptospiras (comparadas con el antígeno control) es considerado seropositivo o serorreactivo al respectivo título o dilución (OIE, 2014). Realizándose la lectura, hasta el título mayor de serorreactividad (INS, 2002).

3.6. Análisis de los resultados

Las muestras rectoras a un título igual o mayor de 1/100 a determinado serovar, de su respectivo serogrupo de *Leptospira* spp., se consideraron como positivas (Faine *et al.*, 1999; Picardeau, 2013). Las muestras rectoras a dos serogrupos con títulos iguales se consideraron como coaglutinaciones (OIE, 2014).

3.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados en forma porcentual. Además, se estableció la relación entre los niveles de positividad con las variables procedencia, edad, y sexo mediante la prueba de regresión logística utilizando el paquete estadístico STATA 11.

IV. RESULTADOS

4.1. Seropositividad a *Leptospira* spp.

Al evaluar las 305 muestras de suero sanguíneo de caninos con diagnóstico clínico de leptospirosis, utilizándose la prueba de Microaglutinación con serovares de referencia de los 25 serogrupos patógenos (Cuadro A1.1), se obtuvo porcentaje de seropositividad de 177/305 (58.03%) (Figura 4).

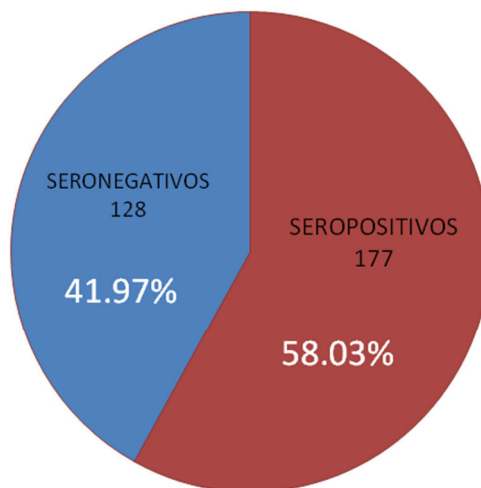


Figura 4. Porcentaje de seropositividad a *Leptospira* spp. con la prueba de Microaglutinación (MAT). Se observa que hubo un mayor porcentaje de perros seropositivos a serogrupos patógenos de *Leptospira* spp (177/305; 58.03%).

4.2. Seropositividad a los serogrupos de *Leptospira* spp.

Se observó seropositividad a 18 serogrupos patógenos (Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hurstbridge, Icterohaemorrhagiae, Iquitos, Javanica, Manhao, Mini, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani y Tarassovi) (Figura 5). Sin embargo, no hubo respuesta contra 7 serogrupos patógenos (Bataviae, Celledoni, Hebdomadis, Lousiana, Panama, Sarmin y Ranarum), de los 25 serogrupos patógenos utilizados en la Prueba de MAT.

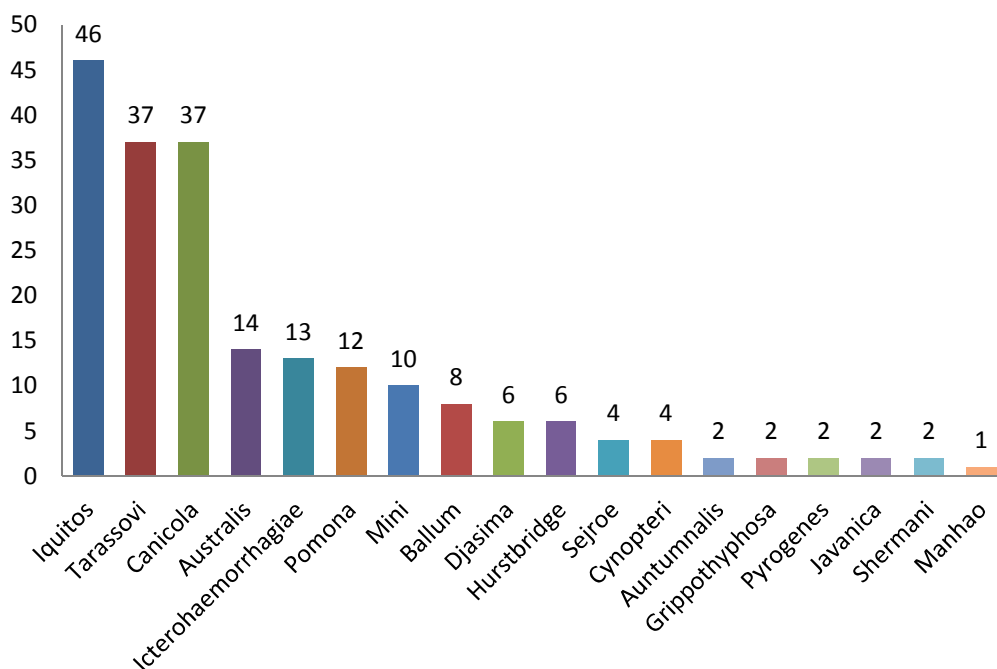


Figura 5. Seropositividad a *Leptospira* spp. con la prueba de Microaglutinación (MAT). Las barras muestran a los serogrupo patógeno de *Leptospira* spp presentes y de mayor frecuencia en perros.

Los serogrupos presentes y su frecuencia respectiva fueron: Iquitos (46/305; 15.08%), Tarassovi (37/305; 12.13%), Canicola (37/305; 12.13%), Australis (14/305; 4.59%), Icterohaemorrhagiae (13/305; 4.26%), Pomona (12/305; 3.93%), Mini (10/305; 3.28%), Ballum (8/305; 2.62%), Djasiman (6/305; 1.97%), Hurtsbridge (6/305; 1.97%), Sejroe (4/305; 1.31%), Cynopteri (4/305; 1.31%), Autumnalis (2/305; 0.66%), Grippytyphosa (2/305; 0.66%), Pyrogenes (2/305; 0.66%), Javanica (2/305; 0.66%), Shermani (2/305; 0.66%) y Manhao (1/305; 0.33%). (Cuadro 5.).

Cuadro 5. Seropositividad a serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. en caninos (n=305) mediante la Prueba de Microaglutinación.

Serogrupo	Positivos	(%)
Australis	14	4.59
Autumnalis	2	0.66
Ballum	8	2.62
Canicola	37	12.13
Cynopteri	4	1.31
Djasima	6	1.97
Grippothyphosa	2	0.66
Hurstbridge	6	1.97
Icterohaemorrhagiae	13	4.26
Iquitos	46	15.08
Javanica	2	0.66
Manhao	1	0.33
Mini	10	3.28
Pomona	12	3.93
Pyrogenes	2	0.66
Sejroe	4	1.31
Shermani	2	0.66
Tarassovi	37	12.13
Bataviae	0	0.00
Celledoni	0	0.00
Hebdomadis	0	0.00
Lousiana	0	0.00
Panama	0	0.00
Sarmin	0	0.00
Ranarum	0	0.00

4.3. Títulos aglutinantes a los serogrupos patógenos

Se cuantificaron los títulos máximos de aglutinación de las muestras positivas a los diferentes serogrupos patógenos de *Leptospira* spp., siendo los títulos relativamente bajos los de mayor hallazgo, mientras que un reducido número de muestras alcanzan títulos altos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Títulos de anticuerpos contra serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. en caninos (n=305) mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT).

Serogrupo	Títulos					Total
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	
Australis	0	8	1	0	0	9
Autumnalis	0	0	1	0	1	2
Ballum	0	3	2	1	0	6
Canicola	2	4	9	3	1	19
Cynopteri	0	1	0	1	0	2
Djasiman	1	2	0	2	0	5
Grippotyphosa	0	1	0	1	0	2
Hurtsbridge	0	2	2	1	0	5
Icterohaemorrhagiae	3	1	2	0	0	6
Iquitos	20	5	6	5	0	36
Javanica	0	1	0	0	0	1
Mini	0	3	1	2	0	6
Pomona	2	1	4	0	0	7
Pyrogenes	0	2	0	0	0	2
Manhao	0	0	0	1	0	1
Sejroe	1	2	1	0	0	4
Shermani	0	0	1	0	0	1
Tarassovi	2	8	18	2	2	32
Coaglutinaciones ^a	10	11	7	3	0	31

^aPositivo a dos serogrupos con el mismo título de aglutinación.

4.4. Coaglutinaciones

Se hallaron 177 seropositivos en total, 31 de ellos (10.16%; 31/305) fueron coaglutinaciones a serogrupos patógenos de *Leptospira* spp, observando que los serogrupos Canicola, Iquitos e Icterohaemorrhagiae fueron los más frecuentes con títulos entre 1/100 hasta 1/800. (Cuadro 7)

Cuadro 7. Coaglutinaciones y títulos de anticuerpos contra serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT).

Serogrupo	Títulos					Total
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	
Canicola-Australis	1	1	0	0	0	2
Canicola-Ballum	0	1	0	0	0	1
Canicola-Cynopteri	0	0	1	0	0	1
Canicola-Hurstbridge	0	0	1	0	0	1
Canicola-Icterohaemorrhagiae	0	1	0	1	0	2
Canicola-Iquitos	1	3	0	0	0	4
Canicola-Mini	3	0	0	0	0	3
Canicola-Pomona	1	2	0	0	0	3
Canicola-Tarasovi	0	1	0	0	0	1
Icterohaemorrhagiae-Australis	0	1	1	0	0	2
Icterohaemorrhagiae-Iquitos	2	0	0	0	0	2
Icterohaemorrhagiae-Tarassovi	0	0	1	0	0	1
Iquitos-Australis	0	1	0	0	0	1
Iquitos-Pomona	0	1	0	0	0	1
Iquitos-Shermani	0	0	1	0	0	1
Iquitos-Tarassovi	0	0	1	0	0	1
Javanica-Tarassovi	1	0	0	0	0	1
Mini-Djasiman	0	0	0	1	0	1
Pomona-Cynopteri	0	0	1	0	0	1
Tarassovi-Ballum	0	0	0	1	0	1
TOTAL	9	12	7	3	0	31

4.5. Seropositividad según Procedencia

Se hallaron 177 (58.03%) perros seropositivos a leptospiros patógenas, estos caninos provienen de cuatro zonas pertenecientes a Lima Metropolitana (Lima Centro, Lima Este, Lima Norte y Lima Sur), y la presentación de los serogrupos se muestran en los siguientes cuadros 8 y 9.

Cuadro 8. Seropositividad contra serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según procedencia.

Serogrupo	Procedencia				Total
	Norte	Centro	Sur	Este	
Australis	0	4	2	3	9
Autumnalis	0	2	0	0	2
Ballum	0	3	2	1	6
Canicola	1	10	1	7	19
Cynopteri	0	2	0	0	2
Djasiman	0	3	0	2	5
Grippotyphosa	0	2	0	0	2
Hurtsbridge	1	1	1	2	5
Icterohaemorrhagiae	0	3	1	2	6
Iquitos	0	22	3	11	36
Javanica	0	1	0	0	1
Mini	0	4	0	2	6
Pomona	1	4	0	2	7
Pyrogenes	0	0	1	1	2
Manhao	0	0	1	0	1
Sejroe	1	1	0	2	4
Shermani	0	1	0	0	1
Tarassovi	1	13	5	13	32
Coaglutinaciones ^a	2	16	4	9	31
Total	57	92	21	57	177

^aPositivo a dos serogrupos con el mismo título de aglutinación.

Cuadro 9. Seropositividad contra *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según procedencia.

Resultado	Microaglutinación				Total
	Procedencia				
	Norte	Centro	Sur	Este	
Negativo	13	72	11	32	128
Positivo	7	92	21	57	177
Total	20	164	32	89	305

La evaluación de la procedencia como factor de riesgo para la infección por *Leptospira* spp, se presenta en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Evaluación de la procedencia como factor de riesgo para la infección por *Leptospira* spp.

Variable	Odds Ratio (OD)
Lima centro	1
Lima Norte	0.42
Lima Sur	1.49
Lima Este	1.39

4.6. Seropositividad según Edad

Se hallaron 177 (58.03%) perros seropositivos a leptospirosis patógenas, estos caninos provienen de cuatro grupos etáreos (0.5-3; 4-7; 8-11; >12 años), y la presentación de los serogrupos en relación a la edad se muestran en los cuadros 11 y 12.

Cuadro 11. Seropositividad a *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según edad.

Resultado	Microaglutinación				Total
	Edad				
	0-3	4-7	8-11	>12	
Negativo	41	38	26	23	128
Positivo	46	53	52	26	177
Total	87	91	78	49	305

Cuadro 12. Seropositividad a serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según edad.

Serogrupo	Microaglutinación				Total
	Edad				
	0-3	4-7	8-11	>12	
Australis	2	1	6	0	9
Autumnalis	0	2	0	0	2

Ballum	1	2	2	1	6
Canicola	3	4	7	5	19
Cynopteri	0	1	1	0	2
Djasiman	1	2	2	0	5
Grippotyphosa	0	1	0	1	2
Hurtsbridge	2	0	2	1	5
Icterohaemorrhagiae	0	2	3	1	6
Iquitos	11	16	5	4	36
Javanica	0	1	0	0	1
Mini	2	1	2	1	6
Pomona	2	1	4	0	7
Pyrogenes	1	0	1	0	2
Manhao	1	0	0	0	1
Sejroe	2	1	0	1	4
Shermani	0	1	0	0	1
Tarassovi	12	7	8	5	32
Coaglutinaciones ^a	6	10	9	6	31
Total	46	53	52	26	177

^aPositivo a dos serogrupos con el mismo título de aglutinación.

La evaluación de la edad como factor de riesgo para la infección por *Leptospira* spp, se presenta en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Evaluación de la edad como factor de riesgo para la infección por *Leptospira* spp.

	Variable	Odds Ratio (OD)
Edad	6 meses-3 años	1
	(4-7) años	1.24
	(8-11) años	1.78
	> 12 años	1

4.7. Seropositividad según Sexo

Se hallaron 177 (58.03%) perros seropositivos a leptospiras patógenas, la presentación de la positividad y los serogrupos en relación al sexo de los perros se muestran en los siguientes cuadros 14 y 15.

Cuadro 14. Seropositividad contra serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según sexo.

Serogrupo	Microaglutinación		
	Sexo		Total
	Macho	Hembra	
Australis	7	2	9
Autumnalis	1	1	2
Ballum	5	1	6
Canicola	14	5	19
Cynopteri	1	1	2
Djasiman	3	2	5
Grippotyphosa	1	1	2
Hurtsbridge	4	1	5
Icterohaemorrhagiae	4	2	6
Iquitos	22	14	36
Javanica	1	0	1
Mini	4	2	6
Pomona	3	4	7
Pyrogenes	1	1	2
Manhao	1	0	1
Sejroe	4	0	4
Shermani	0	1	1
Tarassovi	19	13	32
Coaglutinaciones ^a	19	12	31
Total	114	63	177

^a Positivo a dos serogrupos con el mismo título de aglutinación.

Cuadro 15. Seropositividad contra *Leptospira* spp. mediante la Prueba de Microaglutinación (MAT) según sexo.

Resultado	Microaglutinación	
	Sexo	
	Macho	Hembra
Negativo	75	53
Positivo	114	63
Total	189	116

La evaluación de la variable sexo como factor de riesgo para la infección por *Leptospira* spp, se presenta en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Evaluación de sexo como factor de riesgo para la infección por *Leptospira* spp.

	Variable	Odds Ratio (OD)
Sexo	Macho	1
	Hembra	0.78

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha evaluado la serorreactividad o seropositividad a los serogrupos patógenos de *Leptospira* spp de muestras sanguíneas provenientes de perros con signos clínicos presuntivos de leptospirosis por medio de la Prueba de Microaglutinación (MAT), para ello, se han utilizado cepas de referencia de los serovares representativos de cada serogrupo patógeno de *Leptospira* spp., de los 25 establecidos actualmente (Picardeau, 2013; OIE, 2014).

MAT es la herramienta diagnóstica estándar y la prueba de referencia para el diagnóstico de leptospirosis humana y animal. Además, es la mejor prueba disponible, por encima de otras pruebas serológicas como el ELISA, e incluso pruebas moleculares como la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para el análisis y evaluación epidemiológica, debido a que, en la actualidad MAT, es la única herramienta capaz de distinguir y cuantificar anticuerpos producidos contra cada uno los serogrupos saprófitos y patógenos de *Leptospira* spp. (OIE, 2014).

Existen dos estudios realizados en la ciudad de Lima, el último, realizado por Céspedes *et al.*, (2001), en el cual hallaron una prevalencia de 27.8% en perros de Chancay, Lima; otra evaluación, el primer estudio de leptospirosis en perros realizado en Lima, en el cual hallaron un 46.4% (Herrer *et al.*, 1958) de canes positivos. Sin embargo, el presente trabajo no puede ser comparable con los mencionados estudios previos a nivel nacional,

debido a que el diseño de la obtención de muestras, tuvo como objetivo obtener muestras positivas, no realizándose un muestreo aleatorio cuya finalidad sería obtener una prevalencia. Así, en el presente trabajo se determinó 177/305 (58.03%) perros positivos a *Leptospira* spp., seropositividad alta en relación a estudios realizados en otras localidades con objetivos compartidos, mostrando resultados similares: En un trabajo realizado por Céspedes *et al.*, (2003), en la provincia de Manu, Madre de Dios, se obtuvo 27 caninos de dueños con diagnóstico presuntivo de leptospirosis, obteniendo un 18/27 (67%) seropositivos; en Chile, se obtuvo una frecuencia de 14,8% de seropositivos, de una población de 400 perros atendidos en una clínica de Valdivia (Silva y Riedemann, 2007). si bien, la frecuencia hallada en Chile es relativamente baja en relación al presente estudio, debe considerarse que en aquel trabajo se evaluaron 8 serogrupos patógenos de los 25 establecidos, disminuyendo la sensibilidad de la prueba; en Alemania, con 13 serogrupos en evaluación a partir de 329 muestras de perros sospechosos de Leptospirosis atendidos en una clínica de Berlín, obtuvieron un 18% de positivos (Mayer-Scholl *et al.*, 2013); y en Japón, de un grupo de 283 perros con signos compatibles de Leptospirosis, determinaron 29.33% positivos (Koizumi *et al.*, 2013).

Los perros son susceptibles a la infección por la alta exposición, inclusive en áreas urbanas, siendo el agua de regadíos y desagües la principal fuente de leptospiras debido a la eliminación continua de la bacteria por los roedores y otros animales a través de la orina (Raghavan *et al.*, 2011), siendo la principal fuente de infección en perros en ciudades como Lima (Reis *et al.*, 2008). Además, la ciudad de Lima cuenta con deficiencias en el sistema de alcantarillado y correcta eliminación de desechos o basura, principal factor asociado con leptospirosis humana en Perú y otros países (Oliveira *et al.*, 2012), siendo un posible factor que incremente la incidencia de leptospirosis en caninos mostrado en el presente estudio (Krogaard *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2002).

Se observó seropositividad a 18 serogrupos patógenos (Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hurstbridge, Icterohaemorrhagiae, Iquitos, Javanica, Manhao, Mini, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani y Tarassovi) (Figura 4). Sin embargo, no hubo respuesta contra 7 serogrupos patógenos (Bataviae, Celledoni, Hebdomadis, Lousiana, Panama, Sarmin y Ranarum), de los 25 serogrupos patógenos

utilizados en MAT. Algunos serogrupos identificados en el presente estudio, ya fueron reportados en estudios previos en Lima, un estudio en Chancay el año 2001, Céspedes y colaboradores hallaron como serogrupos más frecuentes: Canicola seguido de Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes. Así mismo, se encontró anticuerpos contra otros serogrupos en menor proporción como Hebdomadis, Ballum, Australis, Autumnalis, Djasiman, y otros serogrupos en menor proporción.

La presencia de los serogrupos en perros infectados que muestra el presente estudio, podría explicarse porque los caninos pueden infectarse por varios serogrupos, debido a que los portadores y diseminadores principales, como los roedores, pueden ser reservorios de diferentes serogrupos, principalmente del serogrupo Icterohaemorrhagiae. No obstante, éstas últimas se pueden infectar por leptospiros provenientes de otros animales y viceversa, además, el desplazamiento de zonas rurales a zonas urbanas, trae consigo la exposición de serogrupos de leptospira menos frecuentes o que aún no estuvieron presentes en un lugar (Andre Fontaine y Baranton, 2004).

El siguiente patrón de serogrupos presentes en perro en la ciudad de Lima, se explicaría por la metodología utilizada en el presente trabajo, en el sentido que es el primer estudio en nuestro país, que evalúa a los 25 serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. descritos actualmente. Además, el creciente contacto con especies silvestres, el desplazamiento y comercialización de mascotas, tanto en áreas rurales, sub-urbanas y urbanas ha resultado en cambios en la prevalencia de serogrupos de *Leptospira* spp., e inclusive en la emergencia de nuevos serogrupos, como se han documentado en Estados Unidos, Japón y países de Europa (Stokes *et al.*, 2007; Ellis, 2010; Gautam *et al.*, 2010; Koizumi *et al.*, 2013).

Los serogrupos presentes y su frecuencia respectiva fueron: Iquitos (46/305; 15.08%), Tarassovi (37/305; 12.13%), Canicola (37/305; 12.13%), Australis (14/305; 4.59%), Icterohaemorrhagiae (13/305; 4.26%), Pomona (12/305; 3.93%), Mini (10/305; 3.28%), Ballum (8/305; 2.62%), Djasiman (6/305; 1.97%), Hurtsbridge (6/305; 1.97%), Sejroe (4/305; 1.31%), Cynopteri (4/305; 1.31%), Autumnalis (2/305; 0.66%), Grippotyphosa (2/305; 0.66%), Pyrogenes (2/305; 0.66%), Javanica (2/305; 0.66%), Shermani (2/305; 0.66%) y Manhao (1/305; 0.33%). Si bien, se describe al perro como

hospedero de mantenimiento al serovar *Canicola*, se ha descrito que la mayoría de infecciones de perros en Estados Unidos en los últimos 20 años es producida por los serovares *Pomona*, *Bratislava*, *Grippotyphosa* y otros (Ward *et al.*, 2004; Greene, 2006; Ghneim *et al.*, 2007); En Valdivia, Chile, los serogrupos más frecuentes son *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Ballum* (Silva y Riedemann, 2007). Asimismo, en Japon y Europa han emergido o predominan serogrupos que en estudios previos tenían una mínima presencia e importancia epidemiológica (Gautam *et al.*, 2010; Koizumi *et al.*, 2013). Además, un estudio en Samoa Americana, sugiere que existe una variación y emergencia de nuevos serogrupos en un intervalo de tiempo aproximadamente 10 años, considerando que se siguen aislando e incluyendo nuevos serovares (serogrupos) en recientes estudios epidemiológicos (Lau *et al.*, 2012). Esto podría explicar las frecuencias del presente estudios y la presencia de serogrupos antes no reportados en estudios previos en perros como en otras especies, en Lima, e inclusive a nivel nacional.

La mayor seropositividad en el presente estudio corresponde al serogrupo Iquitos, serovar *Varillal*, este serogrupo corresponde una especie nueva, denominada *Leptospira liscerasiae*, aislada en nuestra amazonía de pacientes humanos de 4 zonas geográficas distantes de Iquitos, posterior a ello una evaluación en pacientes febriles reportaron su presencia en un 47% del grupo en estudio (Matthias *et al.*, 2008), el empleo del nuevo serogrupo en el diagnóstico, incrementó notablemente la detección de la enfermedad en nuestra Amazonía y en otras localidades, hallando 228 casos confirmados por este serogrupo (Céspedes *et al.*, 2006). En el 2006, en el distrito de Puente Piedra - Lima, el serovar *Varillal* fue evaluado en un estudio en humanos, reportándose un caso con un título 1/200 (Platts-Mills *et al.*, 2011), cuya población evaluada no tenía una relativa alta exposición a los factores de riesgo convencionalmente establecidos para contraer la leptospirosis. Esto podría indicar que el serovar *Varillal* ya habría estado circulando en la ciudad Lima. Considerando, que los roedores y en menor medida otros animales, son los principales diseminadores. Una evaluación en paralelo, del anterior estudio, tanto serológico como aislamiento en roedores pudo haber ofrecido resultados similares al realizado en Iquitos, aislándose y detectándose el serovar *Varillal* en roedores (Matthias *et al.*, 2008). Por ello, Lima al tener, los factores de riesgo, tanto ambiental como biológicos, socio-económicos, y considerando el desplazamiento de mascotas, animales de producción

y animales silvestres a distintas zonas geográficas, podrían explicar la presencia y su relativa alta frecuencia en la población canina de Lima.

Se cuantificaron los títulos máximos de aglutinación de las muestras positivas a los diferentes serogrupos patógenos de *Leptospira* spp., siendo los títulos relativamente bajos en la mayoría de sueros positivos (1/100 y 1/200), que explicarían una posible infección reciente y los niveles de anticuerpos se están incrementando, o pertenecen a una infección previa (Picardeau, 2013); mientras que, un reducido número de muestras alcanzan títulos relativamente altos (1/400 a 1/1600), estos últimos títulos, son similares a los obtenidos en Chile (Silva y Riedemann, 2007).

Se hallaron 31/305 (10.16%) coaglutinaciones a los serogrupos patógenos de *Leptospira* spp, los serogrupos Canicola, Iquitos e Icterohaemorrhagiae conjuntamente con otro serogrupo, fueron los más frecuentes con títulos variados, con títulos que varían desde 1/100 hasta 1/800. Esto podría deberse a que algunos perros, hayan pasado por una infección subaguda o crónica a determinado serovar, y luego infectarse por más de un serovar de distinto serogrupo, teniendo niveles de anticuerpos variables; y en menor medida, corresponder a reacciones cruzadas (Ferreira Neto *et al.*, 1997; Andre-Fontaine, 2006). Así lo demuestran diferentes trabajos anteriores, en el cual se hallaron 18% de aglutinaciones al serogrupo Iquitos con otro serogrupo patógeno (Matthias *et al.*, 2008); En Chile, se obtuvo 4.25% de coaglutinaciones (Silva y Riedemann, 2007); mientras que en Colombia se determinó un 2.0% de coaglutinaciones (Silva-Molano *et al.*, 2008).

El Perú posee una geografía muy variada y microclimas diversos, la costa posee las condiciones climáticas óptimas para el mantenimiento en el ambiente de diferentes microorganismos, parásitos y bacterias, entre ellas, las leptospiras (Céspedes *et al.*, 2006). Lima metropolitana, en las distintas zonas geográficas ya sea en la zona norte, sur, este y cercado, a pesar de ser un área urbana, posee deficiencias en la eliminación de basura y/o desperdicios, existen riachuelos o desagües no protegidos, factores que permiten la sobrepoblación de los roedores, principales diseminadores de las leptospiras (Adler y de la Peña Moctezuma, 2010). Además, el mantenimiento de los parques de diferentes distritos Limeños se realizan con aguas servidas contaminadas con diversos microorganismos (Chavez *et al.*, 2002). En relación a Lima Centro, la zona Norte es un factor de protección

(OR:0.42), mientras que en la Zona Sur y Este, el riesgo estimado es de (OR: 1.49 y 1.39, respectivamente). Estos resultados podrían deberse a los distintos sistemas de saneamiento, control ambiental y biológico de cada distrito o zona de Lima. Sin embargo, esto puede ser muy variable inclusive dentro de un mismo distrito, debido a los distintos, niveles socio-económicos de la población en los barrios o la población Limeña.

En el presente trabajo se determinó que las edades entre (4-7) y (8-11) años, son factores de riesgo (OR: 1,24 y 1.78, respectivamente), en relación a los animales menores de 4 años, para la infección con leptospiras; mientras que, la edad mayor a 12 años, no tendría ninguna asociación. En cuanto al sexo, las hembras tendrían un relativo factor de protección (OR: 0.78). Estos resultados concuerdan con un estudio previo en la ciudad de Lima por Huerta *et al.*,(2013), el cual determina el sexo, tamaños y la edad como factores de riesgo para la presentación de Leptospirosis en caninos. Esto se explicaría por la mayor exposición de los perros adultos que podrían infectarse por el mayor contacto en la calle en relación a perros jóvenes, que por lo general los dueños protegen con mayor cuidado a los cachorros o de menor edad; y de la misma forma, a las hembras para evitar la preñez. Siendo perros machos adultos los que frecuentemente se encuentran en la calle o fuera de su hogar, teniendo mayor oportunidad de infectarse.

VI. CONCLUSIONES

- Las infecciones de *Leptospira* spp., en perros de la ciudad de Lima Metropolitana atendidos en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos son causadas por 18 serogrupos patógenos: Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hurstbridge, Icterohaemorrhagiae, Iquitos, Javanica, Manhao, Mini, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani y Tarassovi.
- Los serogrupos patógenos de *Leptospira* spp. con mayor frecuencia fueron: Iquitos, Tarassovi, Canicola, Australis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Mini y Ballum.
- El sexo, la edad y la procedencia del perro son factores de riesgo en la presentación de leptospirosis en perros con diagnóstico presuntivo de leptospirosis atendidos en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Adamus, C., Buggin-Daubie, M., Izembart, A., Sonrier Pierre, C., Guigand, L., Masson, M.T., Andre-Fontaine, G., Wyers, M., 1997. Chronic hepatitis associated with field strain *Leptospira* infection in a vaccinated colony of laboratory Beagle dogs. *Comp. Pathol.* 117, 311–328
2. Adler B., De la Peña Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140(3-4):287–96.
3. Adler, B., Faine S. 1983. Species and genus-specific antigens in leptospira, revealed by monoclonal antibodies and enzyme immunoassay. *Zbl. Bakt. Hyg.* 255: 317-322.
4. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. 2011. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Vet Microbiol* 153: 73–81
5. André-Fontaine, G. 2006. Canine leptospirosis-Do we have a problem? *Veterinary Microbiology.* 117 (1), pp. 19-24.
6. Andre-Fontaine, G., Baranton, G., 2004. Leptospiroses animales, la leptospirose humaine en métropole. *Bull. Épidémiologique.* 12, 1–31.
7. Andre-Fontaine, G., Branger, C., Gray, A.W., Klaasen, E., 2003. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins used to prevent canine leptospirosis. *Vet. Rec.* 153, 165–169.

8. Balassiano IT, Vital-Brazil JM, Pereira MM. 2012. Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: a new tool for early diagnosis and epidemiologic surveillance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74(1):11–5.
9. Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3, 757–771.
10. Bolin, C., 1996. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)* 11, 166–171.
11. Cao X-J, Dai J, Xu H. 2010. High-coverage proteome analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. *Cell Res* 20(2):197–210.
12. Cerqueira G, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol*; 9(5):760–8.
13. Céspedes M, Chun M, Cano E, Huaranca I, Atoche H, Ortiz H, Valentín M, Balda L, Huamán T. 2007. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en personas asintomáticos y en perros de Chancay, Lima, 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 24(4): 343-349.
14. Cespedes M, Balda L, Gonzalez D, Tapia R. 2006. Situación de la leptospirosis en el Perú: 1994-2004. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 23(1): 52-62.
15. Céspedes M, Ormaeche M, Condori P, Balda L, Glenny M. 2003. Prevalencia de leptospirosis y factores de riesgo en personas con antecedentes de fiebre en la provincia de Manu, Madre de dios, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 20 (4):180-185.
16. Chagas-Junior, A.D., da Silva, C.L.R., Soares, L.M., Santos, C.S., Silva, C.D.C.M., Athanzio, D.A., dos Reis, M.G., Cruz McBride, F.v.W., McBride, A.J.A., 2012. Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprints versus real-time PCR. *PLoS ONE* 7, e32712
17. Chappel RJ, Goris M, Palmer MF, Hartskeerl RA. 2004. Impact of Proficiency Testing on Results of the Microscopic Agglutination Test for Diagnosis of Leptospirosis. *Journ Clin Bacterio* 42(12):5484–5488.
18. Chávez A., Casas E., Serrano M., Cajas J. Velarde J., La Rosa V., López J. 2002. Riesgo de contraer enfermedades parasitarias en los parques públicos de Lima y Callao. *Rev. investig. vet. Perú* v.13 n.2

19. Confer AW, Ayalew S. 2013. The OmpA family of proteins : Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol* 163(3-4):207–222.
20. Cullen, P.A., Cordwell, S.J., Bulach, D.M., Haake, D.A., Adler, B., 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infection and Immunity* 70, 2270–2311.
21. Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B. 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 291–318.
22. De Faria, M. T., Calderwood, M. S., Athanzio, D. A., McBride, A. J., Hartskeerl, R. A., Pereira, M. M., Ko, A. I. & Reis, M. G. 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 108, 1–5.
23. Del Carlo Bernardi F, Ctenas B, da Silva LFF. 2012. Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Hum Pathol* 43(10):1601–10.
24. Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Félix SR, Silva ÉF, McBride AJA. 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vacc Nov*: 1215–1224.
25. Dupouey, J., Faucher, B., Edouard, S., Richet, H., Kodjo, A., Drancourt, M., Davoust, B., 2013. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? *Comp. Immunol. Microbiol. Infet. Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.12.002>.
26. Ellis, W. A. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec* 167, 602–605.
27. Evangelista KV, Coburn J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5(9):1413–1425.
28. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. *Leptospira and leptospirosis*, 2nd ed. MedSci, Melbourne.
29. Faine, S., 1982. *Guidelines for the Control of Leptospirosis*. Offset Publication Number 67. World Health Organization of the UN, Geneva.
30. Ferreira Neto JS, Vasconcellos SA, Ito FH, Moretti AS, Camargo CA, Sakamoto SM, Marangon S, Turilli C, Martini M. 1997. *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae seropositivity and the reproductive performance of sows. *Prev Vet Med.* 1997 Jul;31(1-2):87-9.

31. Fonseca CA, Teixeira MM, Romero EC, Tengan FM, Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. 2006. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect*; 52:15–22.
32. Gautam R, Guptill LF, Wu CC. 2010. Spatial and temporal-spatial clustering of overall and serovar-specific *Leptospira* microscopic agglutination test (MAT) seropositivity among dogs in the United States from 2000 through 2007. *Prev Vet Med*;96:122–131
33. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Burth P, Silva a R, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, Castro-Faria M V. 2012. *Leptospira* and inflammation. *Mediators Inflamm*:317950.
34. Ghneim, G.S., Viers, J.H., Chomel, B.B., Kass, P.H., Descollonges, D.A., Johnson, M.L., 2007. Use of a case–control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Veterinary Research (Les Ulis)* 38, 37–50.
35. Guerra MA. 2013. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals*. Sep; 41(5):295-7.
36. Greene, C.E., 2006. Laboratory diagnosis of canine leptospirosis and babesiosis. In: 24th Annual ACVIM Forum, 31 May–3 June, 2006, Louisville, KY, USA, pp. 490–491.
37. Hartmann K, Egberink H, Pennisi MG, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Möstl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. 2013. *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. Jul;15(7):576-81
38. Hartskeerl, R.A., 2005. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. *Rev. Cubana Med. Trop.* 57, 7–10
39. Herrer S, Liceras J, Meneses O. 1958. Leptospirosis en el Perú I. Identificación de las cepas de leptospirosis presentes en el perro y el gato e incidencia de la infección. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.*, vol.12, n.1-2, pp. 65-86.
40. Huerta C. Chilón V., Díaz D. 2013. Estudio de caso-control para evaluar factores de riesgo en la presentación de Leptospirosis canina en la ciudad de Lima. *Rev. investig. vet. Perú* v.24 n.1

41. INS. 2002. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Lima. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 53 p.
42. Janwitthayanan W, Keelawat S, Payungporn S. 2013. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase *Microbiol Res* 168(5):268–72.
43. Johnson, R.C., Rogers, F.C., 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azaguanine. *J. Bacteriol.* 88, 1618–1623.
44. Jost, B.H., Adler, B., Vinh, T., Faine, S., 1986. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 22, 269–275.
45. Kmety, E., Dikken, H., 1993. Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, Netherlands.
46. Klaasen, H.L.B.M., Molkenboer, M.J.C.H., Vrijenhoek, M.P., Kaashoek, M.J., 2003. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* 95, 121–132.
47. Klaasen, H.L.B.M., Van der Veen, M., Molkenboer, M.J.C.H., Sutton, D. 2013. A novel tetravalent *Leptospira* bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs. *Vet. Rec.*, 172, pp. 181–186.
48. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: 2009. The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.*;7:736–747.
49. Koizumi N, Muto M, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Funatsumaru S, Ohnishi M. 2013. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 630–636
50. Koizumi N, Watanabe H. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med* 51(3):210–214.
51. Krojgaard, L.H., Villumsen, S., Markussen, M.D.K., Jensen, J.S., Leirs, H., Heiberg, A.C., 2009. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol. Infect.* 137, 1586–1592.
52. Lambert, A., Picardeau, M., Haake, D.A., Sermiswan, R.W., Srikrum, A., Adler, B., Murray, G.L., 2012. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect. Immun.* 80, 2019–2025.

53. Liao, S., Sun, A., Ojcius, D.M., Wu, S., Zhao, J., Yan, J., 2009. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol.* 9, 253.
54. Lau C, Smythe L, Weinstein P. 2010. Leptospirosis—an emerging disease in travellers. *Travel Med Infect Dis.*;8:33–39.
55. Lau CL, Skelly C, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. 2012. Emergence of new leptospiral serovars in American Samoa - ascertainment or ecological change? *BMC Infect Dis* 12(1):19.
56. Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 4(2):296.
57. Lima SS, Ching AT, Fávoro RD, Da Silva JB, Oliveira ML, Carvalho E, Abreu PA, Vasconcellos SA, Ho PL. 2013. Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by in vivo and in vitro shotgun phage display. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 8;431(2):342-7.
58. Lourdault, K., Cerqueira, G.M., Wunder Jr., E.A., Picardeau, M., 2011. Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect. Immun.* 79, 3711–3717
59. Martins, G., Penna, B. & Lilenbaum, W. 2012. The dog in the transmission of human leptospirosis under tropical conditions: victim or villain? *Epidemiol Infect* 140, 207–208, author reply 208–209.
60. Masuzawa, T., Nakamura, R., Beppu, Y., Yanagihara, Y., 1996. Immunochemical characteristics and localization on cells of protective antigen (PAg) prepared from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Microbiology and Immunology* 40, 237–241
61. Matsunaga, J., Lo, M., Bulach, D.M., Zuerner, R.L., Adler, B., Haake, D.A., 2007. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. *Infection and Immunity* 75, 2864–2874.
62. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL. 2008. Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a *Rattus* Species Reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2(4): e213.
63. Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nöckler K, Kohn B. 2013. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis;* 13 (3): 200–2.

64. Mérien F, Baranton G, Perolat P. 1995 Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis*; 172:281–5.
65. Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, Hartskeerl R, Moreno LZ, Costa BL, Souza GO, Vasconcellos SA, Moreno AM. 2013. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Nov;77(3):195-9.
66. Muller, A., Gau, C., Chetboul, V., Andre-Fontaine, G., 1999. Un caso de cholangio-hepatite associée à une leptospirose chez un chien. *Rec. Mé.d. Ve.t.* 175, 63–68.
67. Murray, G.L., Srikram, A., Henry, R., Puapairoj, A., Sermswan, R.W., Adler, B., 2009. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes Infect.* 11, 311–314
68. Murray, G.L., Srikram, A., Henry, R., Hartskeerl, R.A., Sermswan, R.W., Adler, B., 2010. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol. Microbiol.* 78, 701–709.
69. Murray G. L. 2013. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet. Microbiol.* 162, 305–314.
70. Musso, D. and La Scola, B., 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46, 245–252
71. Nakamura, I., Hang-Ombe, B.M., Sawa, H., Kobayashi, S., Orba, Y., Ishii, A., Thomas, Y., Isozumi, R., Yoshimatsu, K., Mweene, A.S., Takada, A., Sugimoto, C., Arikawa, J. 2013. Cross-reactivity of secondary antibodies against African rodents and application for sero-surveillance. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 819–825.
72. Nally, J.E., Artiushin, S., Timoney, J.F. 2001. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity* 69 7616–7303.
73. Naranjo, N. 2010. Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la leptospirosis. Tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Veterinarias, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. 163 p.
74. OIE. 2014. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Leptospirosis – Oficina Internacional de Epizootias. p.15

75. Oliveira, S.J., 1999. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? *Hora Vet.* 19, 87–90.
76. Oliveira LM, Said RA, Strenzel GM, Langoni H. 2012. Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. *Prev Vet Med*;106:79–84.
77. OMS. 2008. *Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control*. Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa., VP/OPS/OMS, ed. (Rio de Janeiro, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa), p.127.
78. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* Jul;(12):351-7.
79. Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* 6:313-321.
80. Platts-Mills J, LaRochelle P, Campos K, Vinetz J, Gotuzzo E, Ricaldi J. 2011. Seroprevalencia de Leptospirosis en Puente Piedra, Lima en el año 2006. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(2), 273-276
81. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal Infect* 43(1):1–9.
82. Raghavan, R., Brenner, K., Higgins, J., Van der Merwe, D., Harkin, K.R., 2011. Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis. 94 cases (2002–2009). *Prev. Vet. Med.* 101, 247–249.
83. Renaud C, Andrews S, Djelouadji Z. 2013. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippityphosa, mozdok and pomona in French dogs. *Vet J* 196(1):126–7.
84. Reis, R.B., Ribeiro, G.S., Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S. Melendez, A.X.T.O., Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S., Carvalho, M.S., Reis, M.G., Ko, A.I. 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 2, e228.
85. Richardson, D.J., Gauthier, J.L. 2003. A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3, 187–193.
86. Ristow, P., Bourhy, P., da Cruz McBride, F.W., Figueira, C.P., Huerre, M., Ave, P., Girons, I.S., Ko, A.I., Picardeau, M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 3, e97.

87. Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I., Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G., Ko, A.I. 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610.
88. Sarkar J, Chopra A, Katageri B, Raj H, Goel A. 2012. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Asian Pac J Trop Med* 5(6):500–2.
89. Schneider MC, Tirado MC, Rereddy S. 2012. Natural disasters and communicable diseases in the Americas: contribution of veterinary public health *Vet Ital* 48(2):193–218.
90. Silva-Molano R, Castro F, Montoya J, Loaiza-Echeverri A. 2008. Estudio de seroprevalencia de leptospirosis canina en Manizales – Colombia, mediante aglutinación microscópica (MAT). *vet.zootec.* 2(2): 35-39.
91. Silva R, Riedemann F. 2007. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch. Med. Vet.* 39, N° 3, 2007, pp 269-274
92. Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–255.
93. Stokes, J. E., Kaneene, J. B., Schall, W. D., Kruger, J. M., Miller, R., Kaiser, L. Bolin, C. A. 2007. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 230, 1657–1664.
94. Triger, L., 2004. Leptospirose canine: suivi de plusieurs années de résultats sérologiques. DVM Thesis, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, France.
95. Verma A, Stevenson B, Adler B. 2013. Leptospirosis in horses. *Vet Microbiol* 6185; 6.
96. Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., Kaslow, D.C. 1996. Sporadic urban leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125, 794–798.
97. Ward, M.P., Guptill, L.F., Wu, C.C. 2004. Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997–2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 72–77
98. Wilson S, Stirling C, Thomas A. 2013. Duration of immunity of a multivalent (DHPPi/L4R) canine vaccine against four *Leptospira* serovars. *Vaccine.* 31(31):3126–30.

99. Yang C-W. 2007. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int* 72(8):918–25.
100. Zhang, Y., Bao, L., Zhu, H., Huang, B., Zhang, H., 2010. OmpA - like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 70–79.
101. Zhang, L., Zhang, C., Ojcius, D.M., Sun, D., Zhao, J., Lin, X., Li, L., Yan, J. 2012. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol. Microbiol.* 83, 1006–1023.

VIII. APÉNDICE

CUADRO A.1. Especies del genero *Leptospira* descritas actualmente.

Especies	Serogrupos	Serovar	Cepa
Patógenas			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao	3 L 60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermedias			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	ND	ND	5399
Saprófitas			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo	Sao Paulo

ND: No determinado

CUADRO A.2. Serovares de *Leptospira* spp, utilizados en la prueba de Microaglutinación (MAT).

Nº	Especie	Serogrupo	Serovar	Cepa
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
4	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
5	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
6	<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
7	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
8	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
9	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
10	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
11	<i>L. fainei</i>	Hurtsbridge	Hurtsbridge	BUT6
12	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
13	<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	VAR10
14	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Poi
15	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945
16	<i>L. interrogans</i>	Manhao	Lincang	L14
17	<i>L. santarosai</i>	Mini	Georgia	LT117
18	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
19	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
20	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
21	<i>L. meyeri</i>	Ranarum	Ranarum	ICF
22	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee
23	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
24	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
25	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin

Anexo A.1.

Medio Fletcher: Leptospira Medium Base Fletcher. Difco + 8% de suero de conejo estéril.

Anexo A.2.

Medio EMJH: Leptospira Medium Base EMJH. Difco + 10%
Leptospira Enrichment EMJH. Difco.