

Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de las técnicas Dot-ELISA y MAT en perros con enfermedad renal en Bogotá*

Catalina Medrano Galarza¹ / César Augusto Díaz Rojas² / Ernesto Andrés Dalmau Barros³

Resumen

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica, causada por especies del género *Leptospira* (orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae*), de gran importancia mundial, debido a su amplia distribución y diversidad de serogrupos y serovares que afectan a varias especies. Una de las especies más afectada por esta bacteria es la canina, en la cual esta bacteria desencadena una infección renal o hepática aguda. La falla renal crónica es una consecuencia común de la infección y los abortos pueden ocurrir en hembras preñadas. En los últimos años, la leptospirosis se ha catalogado como uno de los posibles diagnósticos diferenciales más comunes para perros que presentan signos de enfermedad renal aguda o hepática. En el presente trabajo se estudiaron treinta caninos con enfermedad renal, a los cuales se les realizó una prueba de diagnóstico serológico para leptospirosis: la técnica de aglutinación microscópica (MAT) para seis serovares de *Leptospira interrogans*, y una prueba de diagnóstico en orina por medio de la prueba Dot-Elisa para los serovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* y *grippityphosa*. Se diagnosticaron como positivos a *Leptospira*, como causa de la enfermedad renal, utilizando los resultados de las dos pruebas, diez caninos (33,3%), los cuales presentaron títulos a MAT para los serovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *grippityphosa* principalmente. Nueve de los diez perros fueron positivos a Dot-Elisa con una distribución homogénea en los cuatro serovares que se manejaron. Los veinte perros restantes (66,7%) fueron negativos. La asociación entre la prueba Dot-Elisa y la prueba MAT fue altamente significativa ($P < 0,01$).

Palabras clave: leptospirosis, serovares, Dot-Elisa, aglutinación microscópica.

Diagnostic of Canine Leptospirosis by Dot – ELISA and MAT tests in dogs with renal disease in Bogota

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease that is caused by species of genus *Leptospira* (Order *Spirochaetales*, Family *Leptospiraceae*). This is very important on a global level, due to its widespread distribution and diversity of serogroups and serovars that affect an extensive group of animal species. Canines are one of the most affected species, where this bacterium generates an acute renal or hepatic infection. Chronic kidney disease is a common consequence of the infection and miscarriage can also happen in pregnant females. During the past few years, Leptospirosis has been catalogued as one of the most common differential diagnostics for dogs with acute renal and hepatic disease symptoms. Thirty (30) dogs with renal disease were evaluated during this project, undergoing serological testing for Leptospirosis: the Microscopy Agglutination Test (MAT) for six *Leptospira interrogans* serovars and a diagnostic urine test through Dot-ELISA for serovars *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona* and *grippityphosa*. The results of both tests came out positive for *Leptospira* as the cause of the renal disease in ten (10) dogs (33.3%), which showed titles on MAT mainly in serovars *icterohaemorrhagiae*,

* Trabajo realizado por el Grupo de Investigación Biología del Desarrollo de la Universidad de La Salle, clasificado en Colciencias en la categoría B. Hace parte del trabajo de grado *Diagnóstico de leptospirosis canina por medio de la técnica Dot-ELISA en perros con enfermedad renal en la ciudad de Bogotá*, para optar al título de médico veterinario.

1 Médica veterinaria, Universidad de La Salle. Investigadora profesional asistente, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
✉ catamegava@hotmail.com

2 Médico veterinario. M.Sc., Ph.D.(c). Docente asistente, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle.
✉ cdiaz@lasalle.edu.co.

3 Médico veterinario M.Sc., Docente asistente, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle.
✉ edalmau@lasalle.edu.co.

canicola and *grippityphosa*. Dot-ELISA was positive in 9 of the 10 dogs, with a homogeneous distribution in the 4 serovars. The remaining 20 dogs (66.7%) came out negative. The association between the Dot-ELISA test and the MAT test was highly significant ($P < 0.01$).

Keywords: leptospirosis, serovars, Dot-ELISA, Microscopy Agglutination.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia mundial, ya que las formas de transmisión hacia el hombre son variadas, teniendo en cuenta la cantidad de riesgos existentes, sobre todo en personas que trabajan con animales, considerándose una enfermedad ocupacional; aunque los últimos reportes informan que la población más afectada son personas que tienen contacto con aguas estancadas y lagos, como turistas y deportistas, debido al agua contaminada por secreciones provenientes de animales infectados o portadores de *Leptospiras* (Stornelli et ál. 1999; Langston y Heuter, 2003; Sessions y Greene, 2004a).

En caninos, los serovares más comúnmente implicados en la leptospirosis son *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, pero, en los últimos años, se han venido aislado con más frecuencia los serovares *pomona*, *bratislava* y *grippityphosa* como causantes de la enfermedad, debido a que las vacunas comerciales solo protegen contra los dos primeros (Greene, 2000; Sessions y Grreene, 2004b).

En Colombia, el último brote reportado fue en humanos en las regiones de la costa Atlántica y en el Valle del Cauca. En caninos, los reportes más recientes muestran que en Bogotá, en el 2000, el serovar *grippityphosa* fue el de mayor presentación, incluso sobrepasando a *canicola* e *icterohaemorrhagiae* (Celis y Vargas, 2000). En el 2004 se reportó que

los serovares *hardjo* y *bratislava* han incrementado su presentación (Sandoval, 2004).

En la cotidianidad, la técnica utilizada para el diagnóstico de la leptospirosis es la aglutinación microscópica (MAT), en la cual se detectan anticuerpos contra diferentes serovares de *Leptospira* spp. (Davis et ál., 1972; Ettinger y Feldman, 2002; Carr et ál., 2003; Sandow y Ramírez, 2005). Tiene una sensibilidad y especificidad hasta del 92% y el 95% respectivamente. El punto de corte más recomendado para caninos es 1:50. Los títulos vacunales generalmente van desde 1:100 a 1:400 con una persistencia de 1 a 2 meses, pero se pueden presentar casos con títulos vacunales hasta 1:3.200 con una permanencia hasta de 6 meses (Ross y Rentko, 2000). Al igual que otras pruebas serológicas, para diagnosticar una infección individual, se requiere estudiar dos muestras pareadas de 15-20 días de intervalo entre la primera y la segunda; si se observa que se presentó seroconversión, se considera de valor diagnóstico un cambio en el título de, al menos, cuatro veces el título inicial. Si con la primera muestra presenta títulos mayores o iguales a 1:800 y hay compatibilidad clínica y de laboratorio, se considera positivo a Leptospirosis sin necesidad de realizar muestras seriadas (Davis et ál., 1972; Ross y Rentko, 2000). Otras técnicas utilizadas con alguna regularidad para el diagnóstico de la leptospirosis son la visualización por medio de microscopio de campo oscuro e intento de aislamiento.

La constante búsqueda de técnicas diagnósticas sensibles y específicas para la leptospirosis canina

ha hecho que se trabaje en los últimos años con técnicas de Elisa modificadas, como el Dot-Elisa. Esta prueba se ha desarrollado para diagnosticar diferentes enfermedades como toxoplasmosis, leishmaniasis y la enfermedad de Newcastle, con resultados favorables (Pappas et ál., 1983; Watt et ál., 1988; Roy y Venugopalan, 1999). El Dot-Elisa, como todo ensayo inmunoenzimático, recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario en distintos fluidos biológicos; es una prueba cualitativa, pues indica la ausencia o presencia de un antígeno o anticuerpo determinando, mas no cuantitativa, como la mayoría de los Elisa que utilizan espectrofotometría para leer la reacción colorimétrica (Coligan et ál., 2005; Reina, 2006; Laboratorios Géminis, 2006; Winipedia, 2006). Para el diagnóstico de la leptospirosis, se ha comparado el Dot-Elisa, pero detectando anticuerpos en suero, con la técnica de elección, la prueba MAT, y se han obtenido resultados de 91,2% de sensibilidad y 81,3% de especificidad del Dot-Elisa frente al MAT (Pappas et ál., 1985).

En el presente trabajo se correlacionaron la prueba Dot-Elisa con la prueba de elección en la cotidianidad para el diagnóstico de leptospirosis canina, la técnica de aglutinación microscópica (MAT), a partir de muestras de suero y orina de perros con enfermedad renal, a fin de evaluar la efectividad diagnóstica del Dot-Elisa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en Bogotá. La recolección de las muestras se efectuó en clínicas veterinarias ubicadas en las localidades de Usaquén, Teusaquillo y Suba. El trabajo de laboratorio se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle, sede La Floresta.

Para el trabajo se recolectaron muestras de suero sanguíneo y de orina de treinta caninos, de diferentes razas, sexo y edad, que manifestaron signos de insuficiencia renal aguda o crónica y que fueron confirmados por la medición serológica de niveles de creatinina y BUN como pacientes con disfunción renal.

Muestras

De cada paciente se obtuvieron muestras de suero por venopunción de la vena cefálica o vena yugular, y orina por *cistocentésis* o por sonda. El suero se depositó en tubos viales de 5 ml, los cuales se mantuvieron congelados a -25 °C hasta la realización de la prueba de MAT (Myers, 1985). La orina fue diluida 1:1 en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) 0,01 M, pH 7,6 para su transporte al laboratorio para la prueba de Dot-Elisa.

Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

La prueba se trabajó con los siguientes serovares de *Leptospira interrogans*: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *bratislava*, *hardjo* y *grippityphosa*, mantenidos en medio EMJH^a. El trabajo se basó en la técnica de Myers (1985), modificada así:

- Realizar una dilución madre 1:50 del suero con SSAF 0,01 M, pH 7,6.
- En una caja de microtécnica fondo en u de 96 pozuelos, se agregan 50 ml de la solución madre y 50 ml de antígeno consistente en cultivos puros de leptospira, libres de aglutinación y con crecimiento de media unidad de Mc Farland.
- Incubar por 60 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Leer en microscopio de campo oscuro a 100X. Se da como positiva la presencia de aglutinación en más de 50% de las *leptospiras*.

- Los sueros positivos se llevan a titulación por series dobles desde 1:100 hasta 1:102.400. El título se da como la recíproca de la dilución mayor donde aglutine el 50% de las *Leptospiras*.

Se establecieron dos grupos entre los perros que presentaron títulos a MAT para facilitar el entendimiento de los resultados: el grupo A lo formaron todos los animales que presentaron títulos a MAT a partir de 1:50; en el grupo B se ubicaron todos los perros que presentaron títulos iguales o mayores a 1:1.800.

Prueba Dot-ELISA

Elaboración y obtención de sueros hiperinmunes contra *Leptospira* spp.

Se inocularon cuatro conejos nueva zelandia hembras de 4 meses de edad, y de 1 kg de peso, con cultivos de 7 días de los serovares de *Leptospira interrogans: canicola, icterohaemorrhagiae, pomona y grippityphosa*, en medio líquido EMJH[®], vía intravenosa en la vena auricular externa; un serovar por cada conejo (tabla 1).

Tabla 1. Calendario de inmunizaciones

	Día 1	Día 8	Día 15	Día 22
Inmunización	1 ^{ra}	2 ^{da}	3 ^{ra}	4 ^{ta}
Cantidad (mL) por inocular de cada serovar	0,24	0,6	1,2	2,4

Fuente: elaboración propia.

El sacrificio se realizó al alcanzar títulos de 1:12.800 por sangría en blanco bajo un protocolo de anestesia general (Harcourt, 2002) aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de La Salle. El suero se almacenó en alícuotas de 1,5 ml y congelados a -20 °C.

Estandarización de la prueba Dot-Elisa en orina

A fin de encontrar las diluciones óptimas de los sueros hiperinmunes y de la proteína G marcada con peroxidasa para la prueba, se realizó la estandarización según el protocolo descrito por Díaz (1995), trabajando los sueros hiperinmunes a una dilución de 1:3.200 y la peroxidasa a 1:4.000.

Técnica

El protocolo de Dot-Elisa fue descrito por Díaz (1995), así:

- Centrifugar a 3.500 RPM la muestra de 4 ml de orina diluida en SSAF 0,01M, pH 7,6 por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Recortar cuatro tiras de papel de nitrocelulosa 0,45 mm (SIGMA[®]) de dimensiones de 1 x 5 círculos marcados con una caja de microtécnica.
- En el círculo 1 se colocaron 2 ml de suero hiperinmune contra el serovar correspondiente (control positivo para la peroxidasa), en el círculo 2, 2 ml de SSAF (control negativo), en los círculos 3 y 4 se colocaron 2 ml del precipitado de la orina centrifugada y en el círculo 5, 2 ml del antígeno respectivo (control positivo para los sueros hiperinmunes).
- Dejar secar completamente por 15 minutos.
- Sumergir las tiras en la solución bloqueadora a base de leche descremada al 1% con 300 ml de H₂O₂ y 4 ml de metanol, durante 90 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Lavar por 3-4 veces con SSAF 0,01M, pH 7,6 durante 5 minutos.
- Depositar cada tira en 6 ml de una dilución 1:3.200 del suero hiperinmune respectivo.
- Incubar por una hora a 37 °C en cámara húmeda.
- Lavar por 3-4 veces con SSAF 0,01M, pH 7,6 por 5 minutos.

- Sumergir las tiras en 8 ml de la solución de peroxidasa de rábano 1:4.000 en SSAF 0,01M, pH 7,6 protegida de la luz.
- Incubar a 37 °C por una hora en cámara húmeda.
- Lavar por 3-4 veces con SSAF 0,01M, pH 7,6 durante 5 minutos.
- Sumergir las tiras en la solución reveladora por 5-10 minutos con luz tenue.
- Composición de la solución reveladora.
- 10 ml de Solución Amortiguadora de Citrato Fosfato pH 5,0 (Burlison et ál., 1992).
- 10 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
- 3,78 mg de DAB^a (di-amino-benzidina). Laboratorios Sigma^a.
- Parar la reacción con agua corriente.
- Se considera resultado positivo cuando aparece una mancha de color café rojizo en los círculos 3 y 4 correspondientes a la muestra de orina.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se basó en estadística descriptiva, distribución de frecuencias, correlación lineal simple de Pearson y tablas de contingencia de chi-cuadrado (c²) (Martínez, 1999).

Tablas de contingencia de chi-cuadrado

Se realizó una distribución de frecuencias a las variables sexo, MAT en general, MAT por serovares respecto a los títulos que se presentaron para cada uno, Dot-Elisa en general y Dot-Elisa por serovares. Para la realización de las tablas de asociación entre las pruebas Dot-Elisa y MAT, se agruparon los resultados de la prueba de MAT en dos grupos: grupo A: animales positivos a títulos $\geq 1:50$ y grupo B: animales positivos a títulos $\geq 1:800$. La asociación estadística se consideró para valores de $P < 0,05$.

Estadística descriptiva

La estadística descriptiva, basada en la media aritmética, la media geométrica y la desviación estándar,

se realizó para las variables peso, edad, niveles séricos de creatinina, niveles séricos de BUN y MAT por serovares.

Correlación lineal simple

La correlación se hizo entre las variables MAT y los niveles de creatinina, entre MAT y los niveles de BUN y entre niveles de creatinina y de BUN. El análisis estadístico se realizó con el programa Statistix^a, bajo los procedimientos de modelos lineales generales y análisis de asociación.

RESULTADOS

Se muestrearon veinte caninos machos y diez caninos hembras con un peso de $14,97 \pm 12,29$ kg, y una edad de $7,8 \pm 4,3$ años. Los niveles de creatinina fueron $3,7 \pm 3,51$ y BUN de $79,17 \pm 94,25$.

Prueba aglutinación microscópica MAT

De treinta perros con enfermedad renal, diecisiete (56,7%) presentaron títulos (a partir de 1:50) para algún serovar de *Leptospira interrogans*; los restantes no los presentaron, y corresponden al grupo A. Dentro del grupo de los que presentaron títulos, trece perros presentaron títulos para el serovar *icterohaemorrhagiae*, doce para el serovar *grippotyphosa*, one para el serovar *canicola*, cuatro para el serovar *pomona*, dos para el serovar *hardjo* y uno para el serovar *bratislava*.

De los diecisiete perros que presentaron títulos a MAT, solo seis perros (20%) tuvieron títulos mayores o iguales a 1:800 (grupo B) para algún serovar, los once restantes presentaron títulos menores (36,7%), por lo que solo el 20% de los perros muestreados fueron positivos por MAT a leptospirosis con una sola muestra. De estos seis perros positivos, se encontró que los títulos mayores o iguales a 1:800 se repartieron entre los serovares *canicola*,

pomona y *grippotyphosa*, con mayor presentación para el serovar *canicola*, seguido de *grippotyphosa* y, por último, *pomona*. A los seis serovares utiliza-

dos en MAT se les realizó estadística descriptiva y distribución de frecuencias para cada título, utilizando la media geométrica (tabla 2).

Tabla 2. Estadística descriptiva de los títulos a MAT por serovares, utilizando la media geométrica

Serovares	N°	\bar{X}	S	Mínimo	Máximo
<i>Sv. canicola</i>	30	8,75	23,48	0	51246,3
<i>Sv. icterohaemorrhagiae</i>	30	6,59	9,27	0	200,9
<i>Sv. grippotyphosa</i>	30	10,52	24,51	0	102436,6
<i>Sv. pomona</i>	30	1,94	6,30	0	3200,9
<i>Sv. hardjo</i>	30	1,29	2,71	0	50,9
<i>Sv. bratislava</i>	30	1,14	2,04	0	50,9

Fuente: elaboración propia.

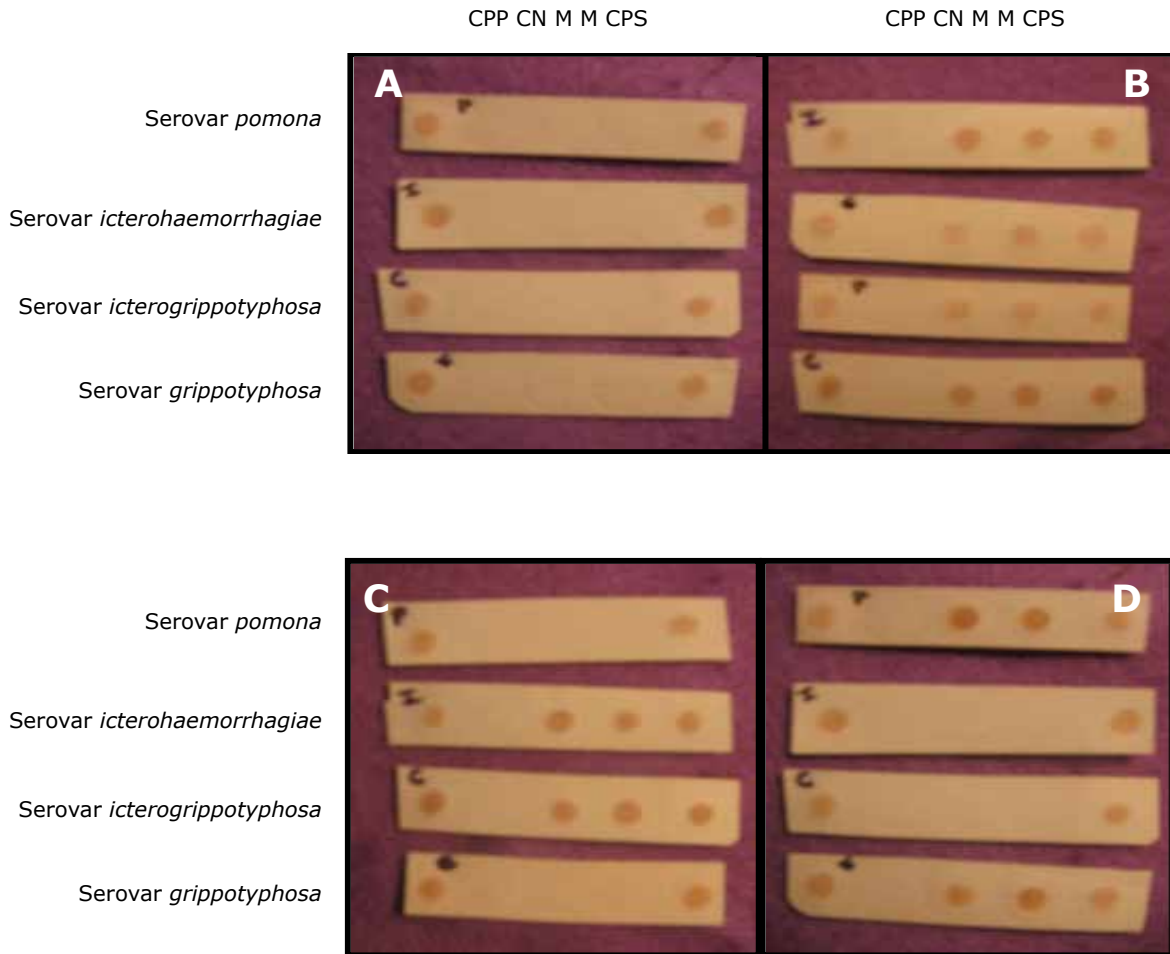
Observando la tabla 2, se puede ver que la presentación de títulos para todos los serovares realmente fue baja, pero algunos llegaron a presentar títulos máximos altos como los serovares *canicola*, *grippotyphosa* y *pomona*. Para el serovar *canicola*, once perros (36,7%) presentaron títulos, de los cuales tres mostraron títulos 1:50; para los títulos 1:200 y 1:1.600, cuatro perros distribuidos equitativamente presentaron estos títulos. Para los títulos 1:100, 1:400, 1:800 y 1:51.200, un perro respectivamente para cada título; los restantes fueron negativos a este serovar. Para el serovar *icterohaemorrhagiae*, trece perros (43,3%) presentaron títulos, la mayoría (ocho perros) para el título 1:50, tres perros presentaron títulos de 1:200 y dos perros para 1:100. Los restantes diecisiete animales no presentaron títulos para este serovar. Del total de perros muestreados, doce (40%) presentaron títulos para el serovar *grippotyphosa*; de los doce, tres presentaron títulos 1:50, cuatro para 1:200, dos perros tuvieron títulos para 1:400, y para los títulos 1:800, 1:1.600 y 1:102.400, un perro respectivamente presentó

estos títulos. Los serovares restantes no presentaron tanta reactividad como los otros tres anteriormente mencionados. Para el serovar *pomona*, solo cuatro perros presentaron títulos, tres para 1:50 y uno para 1:3.200. Para el serovar *hardjo*, dos perros presentaron títulos en 1:50, los demás no presentaron títulos para este serovar. Y para el serovar *bratislava* solo un perro mostró títulos en 1:50.

Prueba Dot-Elisa

De treinta perros con enfermedad renal, nueve (30%) fueron positivos a Dot-Elisa en orina para alguno de los serovares manejados, y los restantes fueron negativos. Durante la realización de la prueba Dot-Elisa no se presentaron inconvenientes, y los pozuelos marcaron bien (figura 1). Dentro del grupo de los positivos, seis perros fueron positivos al serovar *canicola* (20%). Para el serovar *grippotyphosa*, cuatro perros (13,3%) fueron positivos. Para el serovar *icterohaemorrhagiae*, cinco perros (16,7%) fueron positivos. Siete perros (23,3%) fueron positivos al serovar *pomona*.

Figura 1. Combinaciones del Dot-Elisa



A: Dot-Elisa negativo a todos los serovares. B: Dot-Elisa positivo a todos los serovares. C: Dot-Elisa positivo a *icterohaemorrhagiae* y *canicola*. D: Dot-Elisa positivo a *pomona* y *grippyphosa*. CP: control positivo de la peroxidasa. CN: control negativo. M: muestra. CPS: control positivo de los sueros hiperinmunes.

Fuente: elaboración propia.

Asociación entre la prueba Dot-Elisa y la prueba MAT

Asociación de las pruebas en general

De los diecisiete perros (grupo A) que presentaron títulos a MAT, nueve fueron positivos a Dot-Elisa. De los veintinueve perros negativos a Dot-Elisa, ocho presentaron títulos a MAT. En consecuencia, se

puede confirmar que trece perros no tenían como etiología de la enfermedad renal la leptospirosis, pues fueron negativos a ambas pruebas; nueve perros padecían leptospirosis, pues salieron positivos al Dot-Elisa, y tuvieron títulos en MAT; por lo que veintidós perros fueron correctamente diagnosticados. Los restantes ocho casos quedan sin diagnóstico establecido, pues solo tuvieron títulos en MAT que no fueron confirmados por Dot-Elisa (tabla 3).

Con el grupo B del MAT, seis perros presentaron títulos $\geq 1:800$ en MAT, pero solo cinco fueron positivos a Dot-Elisa, lo que indica que un perro no estaba en fase de leptospiruria. De los nueve perros positivos a Dot-Elisa, cuatro no tenían títulos $\geq 1:800$. Fueron correctamente diagnosticados veinticinco perros, por ambas pruebas (tabla 4).

Tabla 3. Asociación entre Dot-Elisa positivos y títulos a MAT (grupo A)

		MAT con títulos		
		0 (-)	1 (+)	
Dot-Elisa positivos	0 (-)	13	8	21
	1 (+)	0	9	9
		17	13	30

Chi-cuadrado: 9,03; valor P : 0,0017; grados de libertad: 1.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 4. Asociación entre Dot-Elisa positivos y MAT con títulos mayores o iguales a 1:800 (grupo B)

		MAT con títulos $\geq 1:800$		
		0 (-)	1 (+)	
Dot-Elisa positivos	0 (-)	20	1	21
	1 (+)	4	5	9
		24	6	30

Chi-cuadrado: 10,16; valor P : 0,0014; grados de libertad: 1.

Fuente: elaboración propia.

Las asociaciones estadísticas entre la prueba Dot-Elisa y la prueba MAT (grupos A y B) fueron altamente significativas ($P < 0,01$).

Asociación de las pruebas por serovares

Para el serovar *grippotyphosa*, la asociación entre ambas pruebas fue altamente significativa ($P = 0,0085^{**}$), donde veintidós perros fueron correctamente diagnosticados, dieciocho negativos a las dos pruebas y cuatro positivos en ambas; los ocho restantes presentaron títulos a MAT para este serovar, pero no fueron positivos en Dot-Elisa. Para el serovar

pomona, la asociación fue altamente significativa ($0,0087^{**}$), donde veinticinco perros fueron correctamente diagnosticados, veintidós negativos y tres positivos; de los cinco restantes, cuatro fueron positivos al Dot-Elisa para el serovar *pomona*, pero no presentaron títulos a MAT para este serovar y para el restante, fue viceversa. Para los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, la asociación entre las dos pruebas no fue significativa.

DISCUSIÓN

Prueba de aglutinación microscópica MAT

La reactividad de perros con enfermedad renal a presentar anticuerpos contra *Leptospira spp.* en Bogotá es alta, independientemente de si son anticuerpos vacunales o por infección, pues más de la mitad del grupo muestreado presentó títulos, mostrando que la leptospirosis es una entidad muy importante para tener en cuenta como diagnóstico diferencial de causas potenciales de disfunción renal (Couto y Nelson, 2000; Ettinger y Feldman, 2002; Mc Donough, 2005). Se puede ver que el serovar que más se presentó, sin importar los títulos, fue *icterohaemorrhagiae*, solo o acompañado de otros serovares. Autores como Ross y Rentko (2000) y Sessions y Greene (2004a) reportan que cuando se presentan casos con títulos a varios serovares, se toma el serovar con el título más alto como el causante del cuadro y los demás serovares con títulos más bajos se presentan debido a reacción cruzada; según esto, el serovar que presentó títulos más altos fue el serovar *canicola*, seguido de *icterohaemorrhagiae*, luego le sigue *grippotyphosa*, luego la combinación de *canicola* y *grippotyphosa*, seguido por el serovar *pomona* y la combinación de *canicola*, *grippotyphosa* y *pomona*. Los serovares *hardjo* y *bratislava* solo se presentaron con títulos bajos y en combinación con otros serovares, por lo que se atribuye

a reacción cruzada (Ross y Rentko, 2000; Sessions y Greene, 2004a). La correlación directa más importante que se presentó entre los serovares en MAT fue entre *canicola* y *grippotyphosa*, lo cual indica que es la combinación más presente en el estudio; después de esta sigue la correlación directa entre el serovar *icterohaemorrhagiae* y el serovar *pomona*, aunque no fue tan significativa como la primera.

Autores como Brown et ál. (1996); Adin y Cowgill (2000); Sessions y Greene (2004a) reportan que los serovares comúnmente implicados en la leptospirosis canina son *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, pero otros serovares como *grippotyphosa* y *pomona* han venido incrementando su presentación, posiblemente, debido a la falta de estos serovares en las vacunas comerciales. Esto es similar a lo encontrado en el presente estudio, pues el serovar más implicado fue el *canicola*, seguido por los serovares *icterohaemorrhagiae* y *grippotyphosa*. No se reportan otros estudios de leptospirosis en perros con problemas renales, pero hay estudios como el realizado por Venkataraman et ál. (1992), en la India, que muestra que los serovares más evidenciados en perros en ese país son, en orden de mayor importancia, *icterohaemorrhagiae*, *canicola* y *pomona*. Otros estudios en países estacionales como Estados Unidos y Australia reportan que en época de lluvias y humedad el serovar que más se presenta, sobrepasando a *icterohaemorrhagiae* y *canicola* es el serovar *grippotyphosa* (Ward et ál., 2004a; Ward et ál., 2004b). Adin et ál., entre 1990 y 1998, realizaron un estudio con el que se demostró que en el estado de California en Estados Unidos, ha aumentado la presentación de serovares como *pomona*, *hardjo* y *bratislava*.

En Colombia, Celis y Vargas, en el 2000 reportan el *grippotyphosa* como el serovar con mayor presentación en perros de la ciudad de Bogotá, seguido por *icterohaemorrhagiae* y *canicola*. Sandoval en

el 2004, en Bogotá, muestra que la presencia de los serovares *hardjo* y *bratislava* se ha vuelto más común que en tiempos pasados.

Al analizar los resultados de este estudio y de los anteriormente mencionados, se puede ver que la presentación de serovares, como *grippotyphosa* y *pomona*, que hace unos años no era común, hoy en día ha aumentado, superando los dos serovares que antiguamente eran más comunes en perros, *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. Se atribuye como causante de esta situación la vacunación para el control de la leptospirosis en perros, ya que se utiliza una vacuna bivalente que solo controla los serovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, por lo que los perros quedan desprotegidos contra los otros serovares que pueden causarle la enfermedad.

Prueba Dot-Elisa

La prevalencia de perros con enfermedad renal causada por leptospirosis (en fase de leptospiuria) en Bogotá es significativa, pues el 30% del grupo muestreado resultó positivo a la enfermedad. La distribución de la presentación de los serovares en la prueba Dot-Elisa fue homogénea, en la cual siete perros fueron positivos a *pomona*, seis a *canicola*, cinco a *icterohaemorrhagiae* y cuatro a *grippotyphosa*.

Asociación entre la prueba Dot-Elisa y la prueba MAT

La asociación presentada entre la prueba Dot-Elisa en orina y la prueba MAT en suero con el grupo A y B, fue altamente significativa ($P < 0,01$). Esto muestra la importancia del Dot-Elisa como prueba diagnóstica de leptospirosis, en relación con la prueba utilizada en la cotidianidad que es la prueba MAT, ya que por esta, de los treinta perros muestreados, diecisiete presentaron títulos, pero solo a seis se les dio el diagnóstico de lep-

tospirosis por presentar títulos mayores o iguales a 1:800, y once perros falsos positivos, lo que haría necesario realizarles una segunda o tercera muestra, para confirmar o descartar el diagnóstico, pero al utilizar Dot-Elisa simultáneamente, se confirmó el diagnóstico de cuatro perros falsos positivos con la prueba MAT, evitando dar un resultado erróneo.

Lo anterior resalta la necesidad de encontrar técnicas más sensibles y específicas que la prueba MAT, debido a las desventajas que presenta como la toma de muestras seriadas, con intervalos de 15 a 20 días (McDonough, 2005), la presencia de anticuerpos vacunales residuales o de reactividad cruzada. Una de estas pruebas es el Dot-Elisa en orina, que no detecta anticuerpos como la prueba MAT, sino que detecta estructuras antigénicas de leptospiras no necesariamente viables, por lo que no presenta los problemas que presenta el MAT en cuanto a los niveles de anticuerpos presentes en la sangre, los cuales dependen de la etapa de la enfermedad en que se encuentre el animal. En casos agudos, los anticuerpos van a estar elevados, pero ya en casos crónicos los anticuerpos tienden a disminuir a niveles basales (Díaz, 1995); y como la mayoría de los casos clínicos en los que se sospecha leptospirosis son casos crónicos (Greene, 2000) en los cuales la leptospirosis está presente, una prueba que detecte antígenos en orina es ideal para confirmar o descartar el diagnóstico que se ha obtenido con la prueba MAT.

CONCLUSIONES

De una población de treinta caninos con enfermedad renal en Bogotá, el 33,3% (diez perros) fueron positivos a leptospirosis como etiología del daño renal en la unión de los resultados de las pruebas Dot-Elisa y MAT. El 66,7% restante fue negativo, lo cual indica que de cada diez perros con enfer-

medad renal, tres tienen leptospirosis. La asociación existente entre la prueba Dot-Elisa y la prueba MAT fue altamente significativa ($P < 0,01$), lo que señala que cualquier paciente canino que presente un resultado positivo a Dot-Elisa va a presentar, con muy alta probabilidad, títulos a MAT y viceversa.

La asociación entre la prueba Dot-Elisa y el MAT, para los serovares *grippotyphosa* y *pomona*, respectivamente, fue altamente significativa, concluyendo que un canino que presente un resultado positivo para alguno de estos serovares en Dot-Elisa, presentará títulos en MAT para el mismo serovar y viceversa. Aunque la asociación entre ambas pruebas para los serovares *canicola* y *icterohaemorrhagiae* no fue significativa. La ausencia de asociación entre las dos pruebas para estos serovares se puede deber posiblemente a la vacunación previa y al estado de hospedero principal que tienen los caninos frente a estos dos serovares.

La reactividad a presentar títulos a *Leptospira interrogans* spp. en perros con enfermedad renal en Bogotá es considerablemente alta, independientemente de si se deben a infección o a vacunales, porque de treinta perros muestreados, el 56,7% (diecisiete perros) presentaron títulos para algún serovar, mientras que solamente el 43,3% no los presentó. La reactividad serológica en MAT mayor o igual a 1:800 con signos clínicos y datos de laboratorio compatibles con la enfermedad, indica positividad a leptospirosis (Ross y Rentko, 2000; Sessions y Greene, 2004a y 2004b), por lo que este estudio encontró que de los treinta perros muestreados, solo a seis (20%) se les diagnosticó con certeza, por medio de la prueba MAT, leptospirosis como etiología de la falla renal, pues presentaron títulos mayores o iguales a 1:800; estos títulos se repartieron entre el serovar *canicola*, el *grippotyphosa* y el *pomona*. El serovar que más presentó títulos altos (mayores o iguales

a 1:800) y, por tanto, al que se atribuyó como el serovar causante de la mayoría de cuadros, fue el *canicola*, seguido en orden descendente por el *icterohaemorrhagiae*, luego por el *grippotyphosa*, después por la combinación de los serovares *canicola* y *grippotyphosa*, seguidos del serovar *pomona* y, por último, de la combinación de los serovares *canicola*, *grippotyphosa* y *pomona*.

La correlación directa más importante que se presentó entre los serovares en MAT fue entre *canicola* y *grippotyphosa*, lo que indica que es la combinación que más se presentó en el estudio. Después de esta, sigue la correlación directa entre el serovar *icterohaemorrhagiae* y el *pomona*, aunque no fue tan significativa como la primera. Los serovares *grippotyphosa* y *pomona* han venido incrementando su presentación como causantes de leptospirosis canina, incluso llegando a sobrepasar a los serovares comúnmente implicados, *icterohaemorrhagiae* y *canicola*, debido a la falta de vacunación contra estos primeros.

Durante el desarrollo del presente trabajo se confirmaron las desventajas que presentan las técnicas usualmente utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis, principalmente del MAT, pero se vio como la prueba Dot-Elisa toma importancia frente a la primera como prueba diagnóstica.

RECOMENDACIONES

La información que provee este trabajo muestra la utilidad de una prueba diferente a las comúnmente utilizadas para el diagnóstico de leptospirosis canina, la prueba Dot-ELISA en orina, una prueba que ayuda a dar un diagnóstico más rápido y más confiable en perros con enfermedad renal, para que el médico veterinario establezca un tratamiento adecuado y a tiempo, por lo que se reco-

mienda el uso de esta prueba junto con la prueba MAT para el diagnóstico de leptospirosis. Además, sea cual sea la prueba que se utilice para el diagnóstico, no se debe usar como única prueba, se debe complementar con otra para poder confirmar el diagnóstico.

Igualmente, este trabajo es importante como soporte para realizar nuevos estudios en leptospirosis, utilizando la prueba Dot-Elisa, no solo en caninos, sino también en otras especies; asimismo, se puede aplicar para otras enfermedades que también necesitan pruebas diagnósticas más sensibles y específicas.

Con los resultados obtenidos, se recalca el cambio ascendente que ha sufrido la presentación de otros serovares (*grippotyphosa* y *pomona*) en relación con los que se atribuían como causantes de la leptospirosis, serovar *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, lo cual demuestra que esta enfermedad es muy difícil de controlar así exista una vacuna, que se podría decir, ha servido para controlar la leptospirosis causada por los dos serovares que la componen, pero que no actúa frente a los demás serovares. Falta protección contra estos, lo que hace pensar en la posibilidad de desarrollar una vacuna que proteja contra más serovares.

Se recomienda hacer algún estudio sobre la vacuna existente y ver cómo es la presentación de los títulos vacunales durante los primeros meses posvacunación, para poder saber cuál es el comportamiento de estos, y poder diferenciar con mayor facilidad un título vacunal de uno infeccioso, y así poder dar un diagnóstico más confiable. Igualmente, el grupo ha venido avanzando en proyectos de investigación con anticuerpos monoclonales contra diferentes serovares de *Leptospira spp.*, a fin de mejorar las técnicas diagnósticas al aumentar su especificidad y sensibilidad.

REFERENCIAS

- Adin, C.A. y Cowgill, L.D. (2000). Treatment and Outcome of Dogs with Leptospirosis: 36 Cases (1990-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216 (3), 371-376.
- Brown, C., Roberts, W., Miller, M., Davis, D., Brown, S., Bolin, C., Jarecki-Black, J., Greene, C. y Miller-Liebl, D. (1996). *Leptospira Interrogans* Serovar Grippotyphosa Infection in Dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209 (7), 1265-1268.
- Burleson, F.G., Chambers, T.M. y Wiedbrauk, D.L. (1992). *Virology. A Laboratory Manual*. USA: Academic Press.
- Carr, A., Nielssen, A. y Heseltine, J. (2003). Managing Leptospirosis in Dogs. *Veterinary Medicine*, 98 (7), 586-592.
- Celis, C.T. y Vargas, P. (2000). Prevalencia serológica de *Leptospira* en caninos de la Clínica de Pequeños Animales de la Universidad Nacional de Colombia. Tesis de pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.
- Coligan, J.E, Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W. (2005). *Short Protocols in Immunology. A Compendium of Methods from Current Protocols in Immunology*. USA: Wiley & Sons.
- Couto, G.C. y Nelson, R.W. (2000). *Medicina interna de animales pequeños*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Davis, J.W, Karstad, L.H. y Trainer, D.O. (1972). *Enfermedades infecciosas de los mamíferos salvajes* (Segunda parte. Enfermedades bacterianas, rickettsias y micóticas). Zaragoza: Acribia.
- Díaz, C.A. (1995). Desarrollo y evaluación de procedimientos serológicos e inmunohistoquímicos en el diagnóstico de la leptospirosis bovina. Tesis de maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.
- Ettinger, S.J. y Feldman, E.C. (2002). *Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato* (5ª ed.). Buenos Aires: Inter-Médica.
- Fowler, M.E. y Cubas, Z.S. (2001). *Biology, Medicine and Surgery of Outh American Wild Animals*. Iowa: Iowa State University Press/Ames.
- Greene, C.E. (2000). *Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Sección III. Infecciones bacterianas*. México: Interamericana Mc Graw Hill.
- Harcourt, F. (2002). *Textbook of Rabbit Medicine*. Oxford, Great Britan: Butter Worth Heinemann.
- Laboratorios Géminis (2006). La técnica de Elisa. Recuperado de: <http://pandora.labgeminis.com:8909/publicidad/la_tecnica_elisa.htm>.
- Langston, C.E. y Heuter, K.J. (2003). Leptospirosis. A Re-Emerging Zoonotic Disease. *The Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice*, 33 (4), 791-805.
- Martínez, C. Estadística y muestreo (9ª ed.). Bogotá: Ecoe.
- Mc Donough, L. (2005). Leptospirosis en caninos-estado actual. IVIS. Recuperado de: <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/mc-donough_es/chapter_frm.asp?LA=2>.
- Myers, D.M. (1985). Manual of Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Pan American Zoonoses Center/Pan American Health Organization/Pan American Sanitary Bureau Regional Office of the World Health Organization *Tec. Not.*, 30, 5-36.
- Pappas, M.G., Ballou, R., Gray, M.R., Takafuji, E.T., Miller, R.N. y Hockmeyer, W.T. (1985). Rapid Serodiagnosis of Leptospirosis using the IgM - specific Dot-ELISA: Comparison with the Microscopic Agglutination Test. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 34 (2), 346-354.
- Pappas, M.G., Hajkowski, R. y Hockmeyer, W.T. Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA): A Micro Technique for the Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Journal of Immunological Methods*, 64, 205-214.
- Reina, M. (2006). Elisa. Universitat de Barcelona. Recuperado de: <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>>.

- Ross, L.A. y Rentko, V. (2000). *Leptospirosis. Kisk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice*. USA: W. B. Saunders.
- Roy, P. y Venugopalan, A.T. Dot-Enzyme linked immunosorbent assay for demonstration of newcastle disease virus infection. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 22 (1), 27-31.
- Sandoval, C.E. (2004). Leptospirosis canina: revisión, correlación entre resultados de campo oscuro frente a resultados de hematología, bioquímica sanguínea, urianálisis y MAT en 11 perros con leptospirosis como diagnóstico diferencial más posible. Informe de pasantía. Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.
- Sandow, K. y Ramírez W. (2005). Leptospirosis. Monografías.com. Recuperado de: <www.monografias.com/trabajos17/leptospirosis/leptospirosis.shtml#diagnos>.
- Sessions, J.K. y Greene, C.E. (2004a). Canine Leptospirosis: Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis. *Compendium*, 26 (8), 606-618.
- Sessions, J.K. y Greene, C.E. (2004b). Canine leptospirosis: treatment, prevention, and zoonosis. *Compendium*, 26 (9), 700-705.
- Stornelli, A., Arauz, S., Arias, D., Stanchi, N. y Renner, E. (1999). Leptospirosis canina. Revisión médica. *Selecciones Veterinarias*, 7 (5), 544-547.
- Venkataraman, S. y Nedunchelliyan, S. "Epidemiology of an Outbreak of Leptospirosis in Man and Dog". *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 15 (4). (1992): 243-247.
- Ward, M. P., Guptill, L. F. and Prah, A. (2004a). Serovar-Specific Prevalence and Risk Factors for Leptospirosis among Dogs: 90 Cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 1958-1963.
- Ward, M. P., Guptill, L. F., Prah, A. y Wu, C. C. (2004b). Evaluation of Environmental Risk Factors for Leptospirosis in Dogs: 36 Cases (1997-2002)". *Journal of the American Veterinary Medical Association* 225, 72-77.
- Watt, G., Alquiza, L. M., Padre, L. P., Tuazon, M. L., Laughlin, L. W. (1988). The Rapid Diagnosis of Leptospirosis: A Prospective Comparison of the Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and the Genus-Specific Microscopic Agglutination Test at Different Stages of Illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 157 (4). 840-842.
- Winipedia, Enciclopedia Libre. "Elisa". Winipedia. 2006. <<http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>>.

