

## Utilización de una técnica serológica rápida para el diagnóstico de la leptospirosis canina

**García RL:** Universidad Agraria de La Habana. **Machado H.:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, **Abeledo Ma Antonia:** Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. **Feraud Dania:** Universidad Agraria de La Habana.

Contacto: [hector.machado@cigb.edu.cu](mailto:hector.machado@cigb.edu.cu)

---

### Resumen

La leptospirosis es una antropozoonosis de la distribución mundial causada por las bacterias *Leptospira interrogans*, las cuales son eliminadas exterior a través de la orina de los animales infectados, la infección ocurre por el contacto con el agua contaminada, siendo los roedores algunos de los vectores principales que afectan a los seres humanos y las especies económicas diversas y a los animales afectivos, entre estos la especie canina. Es objetivo de este trabajo es reportar el empleo de una técnica rápida para el diagnóstico serológico, con el propósito de discernir la presencia del patógeno del agente para aplicar una terapia inmediata dada la semejanza de sus síntomas clínicos con otras enfermedades; 77 muestras de suero sanguíneo de caninos fueron utilizadas debido a su sintomatología clínica a leptospirosis y remitida por las clínicas veterinarias al CENEDI para su diagnóstico confirmativo por la técnica de MAT como técnica de la referencia. Los mismos sueros eran analizados por el Aubiodot, la cual emplea el antígeno del L. patoc y la cepa biflexa. Como resultado se obtuvo una coincidencia entre las técnicas evaluadas en 68 de las 77 muestras analizadas, con una sensibilidad de 85.7%, una especificidad de 89.7%, un valor Predictivo global de 88.7%; el coeficiente Kappa contribuyó un acuerdo favorable de 0.75 y la técnica MAT, identificó la circulación De los serovares canícola, ballum, icterohaemorrhagiae y pomona. Los indicadores obtenidos refieren la validez de la técnica estudiada y su uso se recomienda como diagnóstico rápido para la toma de decisión, lo cual permitiría realizar una terapia en tiempo y eficaz. Este resultado permite evaluar la capacidad del antígeno patoc de reaccionar con los anticuerpos leptospirales.

## Summary

The leptospirosis is an antropozoonosis of world distribution caused by the bacteria *Leptospira interrogans*, which is eliminated to the exterior through the urine of the infected animals, is acquired by the contact with the polluted water, being the rodents some of the main vectors affecting the humans and diverse economic species and maidservants among these to the canines.

It is objective the use of a quick technique of I diagnose serológico with the purpose of discerning the agent's patógeno presence to apply a given immediate therapy the similarity of their clinical symptoms with other illnesses; 77 samples of sanguine serum were used of canine with leptospirosis suspicion remitted by the Veterinary Clinics to the CENEDI for their diagnosis for the MAT like reference technique. The same serums were analyzed by the technical Aubiodot using antigen of *L. biflexa* stump patoc.

As a result it was obtained of the technique in study a coincidence in 68 of the 77 samples with a Sensibility of 85.7%, a Specificity of 89.7% and a Value Global Predictivo of 88.7%; the Coefficient Kappa contributed a favorable agreement of 0.75 and the technique of MAT identified the circulation of the serovares canícola, ballum, icterohaemorrhagiae and pomona. For the obtained indicators validity exists in the studied technique and its use is recommended as a presumptive diagnosis for an effective therapy, being also proven the capacity of the stump patoc to react with the antibodies leptospirales.

---

## Introducción

La leptospirosis constituye una zoonosis de distribución mundial que afecta a mamíferos salvajes y domésticos. Las ratas son la fuente más común de infección del humano y le sigue en orden los caninos (*Canis familiares*), bovinos, ovinos, caprinos, otros roedores, mamíferos salvajes y felinos. Puentes (2000)

La leptospirosis es una enfermedad producida por una bacteria perteneciente al género *Leptospira*. El agua contaminada con la orina de animales infectados es una fuente de infección para los mamíferos incluyendo al hombre (Acha y Szyfrer, 2001).

La leptospirosis canina es una zoonosis ampliamente distribuida en el mundo y con alta frecuencia en climas húmedos y cálidos y en países de la franja tropical y subtropical (Levett, 2001), siendo reconocida además como una enfermedad reemergente (Vinetz, 2001).

Estudios epizootiológicos llevados a cabo en varios municipios y provincias del país han encontrado altos porcentajes de seropositividad en diferentes especies incluyendo los caninos siendo los serovares más frecuente *ballum*, *icterohemorragiae* y *canícola*. (Del Monte y Pérez, 2000; Costa y Sagarra, 2000).

(Puentes 2004) reportaron en diferentes especies títulos de anticuerpos para las *L. pomona*, *australis*, *icterohemorragiae* y *canícola*.

Debido a las manifestaciones clínicas de la leptospirosis varían en tipo y gravedad, tanto en el hombre como en animales, es casi imposible la confirmación de la infección por medio de la clínica solamente, Bal et al (2002).

En nuestro país para la determinación de la leptospirosis canina, esta normada la recepción de muestras de sangre de animales con los síntomas y signos en la Red de Laboratorios Provinciales y en el CENEDI, donde se emplea la técnica de referencia MAT para la identificación y título de anticuerpos en el suero sanguíneo, Norma Ramal. (1994) Leptospirosis 673 MINAGRI.

Se han realizado estudios para el diagnóstico serológico mediante procedimientos inmunoenzimáticos como el ELISA en sus diversas variantes que incluyen antígenos recombinante y se han evaluado comparándolos con la técnica de referencia que es el MAT. (Vanascoet; et al, 2001).

Smith; et al (2001) evaluaron una prueba de aglutinación para la detección de anticuerpos específicos de la *Leptospira* que consistió en una tira de látex con un agente detector estable y seco, el diagnóstico se hizo de manera simple mojando la tira de látex con una gota de suero del paciente y el resultado se obtiene en 30 segundos.

Hatta; et al (2000) desarrollaron en Indonesia una técnica rápida y fácil para la detección de inmunoglobulinas específicas de la *Leptospira* (IgM). Este procedimiento de laboratorio consiste en una tira de madera delgada impregnada con una sustancia que contiene una banda de varios antígenos capaces de detectar anticuerpos específicos de varias enfermedades infecciosas cuyos síntomas se pueden confundir con la leptospirosis. La tira de madera se humedece con el suero del paciente y se produce una reacción cambiando el color de la tira y siendo fácil de leer.

Andreescu; et al (1999) mediante el empleo de antígenos efectivos para la detección de anticuerpos utilizando el MAT, obtuvieron resultados satisfactorios con el uso de una cepa saprófita (*L. biflexa*, cepa *patoc*) inactivada.

Acha; et al. (2003) refiere el empleo por Faine en 1982 de antígeno de la cepa *patoc* de una leptospira saprófita (*L. biflexa*) en la técnica aglutinación en placa como prueba género-específica para el diagnóstico de la leptospirosis en animales preferente en el período agudo de la enfermedad. Siguiendo la tendencia actual del uso de ensayos rápidos, Obregón; et al (2004) utilizó la técnica Lepto Tek Dip Stick utilizando antígeno de *L. biflexa* para el diagnóstico de la leptospirosis humana coincidiendo en el 85% de las muestras con el MAT y el 83% con la Hemoaglutinación. Para el diagnóstico de la misma enfermedad Rodríguez; et al (2007) empleó también técnicas rápidas como el Lepto-Cuba y el Lepto-India comparándola con el MAT y la HA obteniendo resultados favorables. Por todo lo antes expuesto el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la técnica rápida serológica Aubiodot en una población de caninos con sospecha clínica de leptospirosis.

## **Materiales y métodos**

### **a) Población de estudio.**

La población de estudio estuvo constituida por 77 caninos cuyas características se describen a continuación:

- Recibidos en las Clínicas Veterinaria de Ciudad de la Habana, Cuba, con síntomas clínicos sospechoso de leptospirosis.
- Todas las muestras de sangre fueron tomadas de la vena radial de los animales. Se centrifugo la sangre en tubo de ensayo para obtener el suero, el cual fue introducido en viales identificados y se conservó en congelación hasta su procesamiento.
- Los sueros fueron remitidos al CENEDI (Centro Nacional de Epidemiología, Diagnostico e Investigación, Ciudad de la Habana) para su diagnóstico serológico por la técnica de referencia MAT.

### **b) Técnica de Aubiodot**

Es un inmunoensayo indirecto en fase sólida empleando inmunosondas de oro coloidal amplificado con reveladores de plata utilizando antígenos de *L. biflexa*, serogrupo *samaranga*, cepa *patoc* para detectar, in vitro, anticuerpos contra *Leptospira* patógena: modificación de la técnica para el control de la vacuna GAVAC (Machado ,1995)

### **Procedimiento:**

- Las muestras de suero se diluyeron en PBS en 1/100
- Las placas de poliestireno donde se sitúa el antígeno de la cepa *patoc* se dejó en reposo durante 15 minutos para ser fijado

- Se añadió a las placas, con micro pipeta, 30 µL de cada una de las muestras de suero diluido 1/100.
- Se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavó con agua corriente.
- Se aplicaron 30 µL del Conjugado Proteína A oro coloidal en los pozuelos con las respectivas muestras y testigo.
- Se esperaron 15 minutos y después se lavó con agua corriente.
- Se preparó una solución reveladora, formada por iones de plata, constituida por una solución A y una solución B; se agregan 300 µL de cada pocito y en el pozuelo testigo.
- Se esperó 20 minutos y se lavó con agua corriente.
- Se comparó con un patrón visual positivo de referencia de una coloración parda; las muestras examinadas si coinciden su reacción con dicha coloración indica la formación del inmunocomplejo y es identificada como positiva.

Todas las determinaciones por esta técnica fueron realizadas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

### **Variables estudiadas.**

Los resultados del estudio se presentan por separado en Tablas de Contingencia de 2 x 2. La evaluación y comparación de los resultados de las técnicas empleadas en el presente estudio se realizaron utilizando la Guía para Evaluar Medios Diagnósticos del Comité Europeo para Estándares de Laboratorio Clínico (ECCLS).

Fueron determinadas las variables sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo, negativo y global, las prevalencias verdadera y aparente con un nivel de confianza del 95% mediante el programa Win Episcopy 2.0.

En los análisis estadísticos se utilizó la Razón de Verosimilitud para evaluar si la prueba diagnóstica es capaz de detectar los casos positivos de los anticuerpos leptospirales, la Prueba J de Youden fue empleada para evaluar la validez de los resultados obtenidos por la técnica diagnóstica utilizada y el Coeficiente Kappa se utilizó para medir la magnitud de la concordancia entre los resultados con la técnica de referencia MAT. (Armitage, 1994)

### **Criterios y Definiciones.**

a) Para la prueba de Microaglutinación microscópica (MAT).

Se define como diagnóstico positivo de *Leptospira* cuando, a la observación en el microscopio en campo oscuro, hay una microaglutinación de más de 50% (+ +) en una dilución de 1/100.

### c) Aubiodot

Si al comparar con un patrón visual positivo de referencia, aparece la coloración parda indica la formación de inmunocomplejo, la muestra es positiva, para una dilución de 1/100. Para todos los sueros se utilizó la dilución de 1/100, según lo establecido por la técnica considerada de referencia (MAT).

El antígeno empleado para la identificación de anticuerpos en los sueros fue logrado a partir de la *Leptospira biflexa* (saprófita y no patógena), serogrupo samaranga, cepa *patoc* obtenida, purificada y certificada en el Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigaciones (CENEDI).

### **Resultados y Discusión**

En la Tabla No. 1 utilizando la técnica de Aubiodot se muestran los resultados de las muestras de suero sanguíneo de los animales sospechosos y en condiciones de crianza no controlada.

Al comparar la técnica con el MAT hay una coincidencia de resultados en 68 muestras de las 77 en total, de ellas 24 como verdaderos positivos y 44 como verdaderos negativos, obteniendo el Aubiodot un Valor Predictivo Positivo en un 82.7% y el Negativo de 91.6%.

La Prevalencia Aparente aportada por el Aubiodot (37.6%) próxima a la Prevalencia Verdadera del MAT (36.6%), todo lo anterior es debido a ser el Aubiodot una prueba cualitativa y rápida que solo determina presencia o no de anticuerpos leptospirales sin determinar títulos, siendo menos precisa respecto al MAT teniendo como propósito discernir en breve tiempo la presencia o no de la enfermedad dado su similitud en los síntomas con otras lo cual resulta una ventaja a los efectos terapéuticos, además de tener la técnica en estudio un Valor Predictivo Global de 88.3%. Respecto a la Sensibilidad fue de 85.7% y la Especificidad de 89.7%, estos resultados coinciden con Hatta; et al (2000) cuando desarrollaron técnicas rápidas y sencillas para la detección de inmunoglobulinas alcanzando incluso valores de Sensibilidad (91.6%) y Especificidad (93.6%) superiores al obtenido con el Aubiodot.

Las Pruebas Estadísticas dan una Razón de Verosimilitud superior a 1 y la Prueba J de Youden de 0.75 dando validez a los resultados obtenidos, también el Coeficiente de Kappa (0.75) indica concordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas.

En los sueros de caninos con sospecha fueron identificados con el MAT los serogrupos *ballum* en 12 muestras (17%), y *canicola* en 12 muestras (17%) quedando en el resto con cantidades mínimas para los serogrupos *pomona icterohaemorrhagiae*, y *australi*, coincidiendo con Duarte (2002) al reportar la identificación de los serogrupos antes mencionados en nuestro país mediante el empleo del MAT.

**Tabla No. 1.-** Resultados y valores predictivos del análisis de las muestras de Sueros de cánidos provenientes del CENEDI (crías no controladas) . MAT versus AuBiodot

	MAT		
AuBiodot	+	-	Total
+	24	5	29
-	4	44	48
Total	28	49	77

Sensibilidad	85.7%
Especificidad	89.7%
Prevalencia verdadera	36.3%
Prevalencia aparente	37.6%
Valor Predictivo positivo	82.7%
Valor predictivo negativo	91.6%
Valor predictivo global	88.3%
Razón de verosimilitud	8.3
Prueba de Youden	0.75
Coeficiente Kappa	0.75

Es de destacar la presencia en la población canina del serogrupo *ballum* en el 17% de las muestras y su circulación en los animales procedentes de las Clínicas Caninas a donde llegan por lo general de una convivencia con las familias y donde además no esta este serogrupo dentro de las cepas vacunales; en el caso de los animales identificados en su suero sanguíneo el serogrupo *canicola* es posible no hayan recibido la vacuna y no tengan inmunidad contra la leptospirosis.

Con esta técnica se comprobó la efectividad en la utilización de la cepa saprófita *patoc* al reaccionar su antígeno y detectar de forma cualitativa y rápida la presencia de anticuerpos en los sueros, lo cual coincide en su empleo con Sharma ;et al (2000) al utilizar esta cepa en una técnica de aglutinación en placa en el diagnóstico de la leptospirosis humana con una concordancia de 96.4% con el MAT y un 94.5% con la identificación microscópica, así también con Obregón y col (2004) al utilizar antígeno de la *L. biflexa* en el diagnóstico de la leptospirosis humana.

La necesidad del uso de diagnosticadores más rápidos y menos complejos en su ejecución, unido al empleo de menor cantidad de recursos posibles con elevada precisión con lleva a la búsqueda de técnicas capaces de reafirmar la sospecha clínica de la enfermedad, por lo que es posible el uso de la técnica serológicas en estudio para detectar anticuerpos de leptospiras en caninos criados en condiciones no controladas y remitidos a las Clínicas Veterinarias por sospecha de leptospirosis y a la vez diferenciar en breve tiempo de otras enfermedades con síntomas clínicos similares.

Mediante la técnica Aubiodot con la utilización del antígeno de la cepa *patoc* (*L. biflexa*) se obtuvo un Valor Predicativo Global de 88.3%

El empleo de la técnica en poblaciones de caninos de vida no controlada, llevados a las Clínicas fue capaz de detectar anticuerpos en los sueros sanguíneos de aquellos con padecimiento de la enfermedad y de los que rebasaron la misma al tener títulos muy bajos e incluyendo animales asintomático.

Es de destacar la posibilidad del empleo de la Técnica Aubiodot por su rapidez, sencillez y fiabilidad de sus resultados cuyas ventajas permiten conocer el diagnóstico de la enfermedad y la aplicación de las medidas terapéuticas, así también para estudios serológicos.

Los indicadores, de acuerdo a los exámenes estadísticos tuvieron validez, fiabilidad y concordancia (Coeficiente Kappa, 0.73) con los resultados obtenidos por el MAT como técnica de referencia.

## **Conclusiones**

- En la técnica probadas frente al MAT en caninos con sospecha de la enfermedad, existe validez y concordancia en sus resultados,
- El Aubiodot pueden constituir un diagnóstico presuntivo para su posterior confirmación por la técnica de referencia.
- Con el Aubiodot la brevedad de los resultados es relevante y posibilidad terapéutica inmediata



- Se obtuvo resultados validos con el empleo del antígeno de *L. biflexa* (saprófita) serogrupo *samaranga*, cepa *patoc*, capaz de reaccionar con los anticuerpos antileptospirales.

### **Recomendaciones**

- Como el Aubiodot permite la identificación rápida y diferencial de anticuerpos antileptospirales es conveniente su uso para el diagnóstico de la leptospirosis canina en las Clínicas Veterinarias lo que permitirá la aplicación del tratamiento de forma inmediata.

### **Bibliografía**

1. Acha PN., Szyfres B. (2003) Zoonosis y enfermedades trasmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera Edición Volumen I Bacteriología y Miosis Publicación Científica No. 580 OPS pp. 175-184
2. Andreescu N, Badulescu A, Gabrila S, Popa AC. (1999): Leptospirose etiology in pulmonary and upper respiratory tract. Roum Arch Microbial Inmuno; 58. pp 273-9
3. Bal AM, Krakani AL, Bharadwai RS, Kagal AS, Joshi SA, Arjunwadker VP. (2002): Evaluation of clinical criteria for the diagnosis of leptospirosis. J Assoc Physicians India. 50:394-6.
4. Costa M, Sagarra I. (2000): Encuesta serológica de la leptospirosis en diferentes especies de animales de la provincia de Guantánamo. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Cuba. pp. 384.
5. Del Monte E. Pérez Y. (2000): Resultado de la encuesta serológica de *Leptospira* en la provincia de Holguín en el año 1999. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Cuba. pp 332
6. Hatta H, Smits HL, Gussehoven GC, Gooskens J. (2000): Introduction of a rapid dipstick assay for the detection of leptospira-specific immunoglobulin in antibodies in the laboratory diagnosis of leptospirosis in a hospital in Makassar, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health; 31:515-20.
7. International Leptospira Society. OMS. (2003) Human leptospirosis. Guidance for diagnosis. Surveillance and control (2003)
8. Levett PN, (2001) Leptospirosis. Clin Microbiol Rev; 2:296-326.
9. Livett PN, Branch SL, Willington CV, Edwards C, Paxtón H (2001) Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. Clin. Diagn. Lab Inmunol; 2: 349-51
10. Machado H, Santizo C.(1995): Recombinant vaccines for the control of cattle tick. Elfos Sciental. pp 103-11.
11. Norma Ramal. Leptospirosis. (1994) Diagnóstico de Laboratorio. Rectificación. NRAG-673.
12. Obregón AM.,Martínez B., Fernández C., Rodríguez I. (2004) Lepto Tex Dip Stick y Lepto Tex Dri Dot, técnicas útiles para el diagnóstico rápido de leptospirosis humana en Cuba Bioquimia Vol. 1 pp. 88

13. Puentes, Teresa; Pérez, E.; Vásquez, R.; Hernández, A.; Duarte C.; Herrera, F. (2000) Estudio preliminar del impacto del tiempo y del clima en la aparición y evolución de focos de leptospirosis animales en las provincias habaneras. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. pp. 284
14. Rodríguez I., Fernández C., Obregón AM., Zamora Y., Rodríguez J., Rodríguez NM., Berdaquera D., Llop A. (2007) Confirmación microbiológica de dos brotes emergentes de leptospirosis humana en Cuba Rev. Cubana Med. Trop. (59) No.1
15. Smiths HL, Chee HD, Eapen CK. (2001) Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. Trop Med Int Health; 6:114-8.
16. Vanasco NB, Lottersberger J, Sequiera MD, Tarabla H. (2001): Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents. Vet Microbiol 82:321-30.

REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 7

Recibido 21.01.09 - Ref. prov. F0907 - Aceptado 16.06.09  
Ref. def. 070904\_RED VET Publicado: 01.07.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070709.html>  
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070709/070904.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org>  
y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>