



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

## ÍNDICE

|                                                     |       |
|-----------------------------------------------------|-------|
| 1.RESUMEN/ABSTRACT .....                            | 3-4   |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....                  | 4     |
| 3. METODOLOGÍA.....                                 | 4     |
| 4. INTRODUCCIÓN .....                               | 4-5   |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                     | 5-27  |
| 5.1. Emergencia de las Leptospiras .....            | 5-6   |
| 5.2. Etiología, clasificación y su complejidad..... | 6-10  |
| 5.3. Epidemiología .....                            | 10-14 |
| 5.4. Patogenia.....                                 | 14-17 |
| 5.5. Cuadro clínico .....                           | 17-20 |
| 5.6. Diagnóstico .....                              | 20-24 |
| 5.7. Tratamiento .....                              | 24-25 |
| 5.9. Prevención y control.....                      | 25-27 |
| 6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....                   | 28    |
| 7. VALORACIÓN PERSONAL .....                        | 28-29 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA .....                               | 29-35 |

## 1. RESUMEN/ABSTRACT

### **Leptospirosis y Leptospirosis canina: estado actual de su conocimiento y dificultades diagnósticas**

La Leptospirosis es la zoonosis bacteriana más diseminada en el planeta, causada por diferentes serovares patógenas del género *Leptospira*. En los mamíferos suele ser subclínica, pero puede ocasionar cuadros graves y mortales. En las personas puede cursar cuadros similares a una gripe, o evolucionar a cuadros graves con fallo renal, hepático, pulmonar y muerte (Enfermedad de Weil). Los principales reservorios en el entorno humano son las ratas, bóvidos, porcino, perros y caballos. Frecuentemente, la diseminación e infección ocurren a través del agua contaminada con la orina de portadores asintomáticos y de los reservorios que excretan la bacteria en orina, incluso por alimentos o suelo contaminados. La Leptospirosis es un problema grave de Salud Pública en zonas donde los factores de riesgo son abundantes, como Sudamérica y el Sur-Este de Asia. En áreas de clima templado se estima que afecta a 0,1-1/100.000 habitantes por año, mientras que en climas tropicales la cifra supera los 10/100.000 habitantes al año. La incidencia real de Leptospirosis se desconoce, debido a la existencia de enfermedades endémicas con signos clínicos similares y a la falta de servicios diagnósticos adecuados en las zonas de mayor incidencia, que suelen coincidir con zonas de escasos recursos económicos. En España, el número de casos declarados en humanos ha ido en aumento desde 2015, con 5 casos declarados, al 2016 con 15 casos y al año 2017 con 23 casos, todos ellos sin muertes. La vacunación es el gran reto de cara a su prevención y control.

### **ABSTRACT: Leptospirosis and Canine Leptospirosis: current state of knowledge and diagnostic difficulties**

Leptospirosis is a worldwide bacterial zoonosis caused by different pathogenic serovars of the genus *Leptospira*. It is subclinical in most mammals but it also may cause severe or even mortal cases. Leptospirosis in humans may vary in severity. It ranges from a mild, influenza-like illness to a severe infection with renal and hepatic failure, pulmonary distress, and death (Weil's disease). The main reservoirs in the human environment are rats, cattle, pigs, dogs and horses. The spread and infection of the disease is often through exposure to urine of asymptomatic carriers which contaminate water and also by contaminated food or soil. Leptospirosis is a great Public Health problem most likely to be endemic in areas where the risk factors are abundant, such as South America and South-East Asia. In mild climate areas it is estimated that affects 0.1-1/100,000 habitants per year, while in tropical areas the number increases to more than 10/100,000 habitants per year. The true incidence of leptospirosis is unknown, due to the similarity of clinical signs with those of other endemic diseases, and the lack of diagnostic services in areas with higher incidence, which usually occurs in areas with low economic

incomes. In Spain, the number of cases declared in humans has been increasing since 2015, with 5 declared cases; in 2016, with 15 cases and 23 cases in 2017, none of them fatal. Vaccination is a great challenge with regards to its prevention and control.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es actualizar el conocimiento de la leptospirosis, mediante una revisión bibliográfica que ayude a desvelar el estado de la clasificación, el comportamiento patógeno de la bacteria y la vacunación, aportando nuevos datos de las investigaciones más recientes.

## 3. METODOLOGÍA

Para la realización de éste trabajo se parte de una revisión bibliográfica.

La búsqueda se ha realizado con las herramientas de búsqueda de la web de la biblioteca de la Universidad de Zaragoza, como *Alcorze*, y bases de datos como *Web of Science*, *Science Direct* y *Pubmed*. También se ha utilizado el buscador especializado en información científica *Google Scholar* y páginas web oficiales, como la de la OIE (*Organización Mundial de Sanidad Animal*) y WHO (*World Health Organisation*). Las palabras clave se han introducido en inglés y español, por su importancia en Latinoamérica. Algunas fueron: “Leptospirosis”, “Human leptospirosis”, “Animal leptospirosis”, “Canine Leptospirosis”, “Leptospirosis etiology”, “Leptospirosis clasification”, “Leptospirosis epidemiology”, “Leptospirosis immunopathogeny”, “Leptospirosis diagnosis”, “Leptospirosis treatment”, “Leptospirosis prevention”, “Leptospirosis vaccine”.

Filtros utilizados: temporales, desde el año 1984 en adelante, siendo el rango 2008-2019 (n=59) los analizados con mayor detalle.

Ejemplo de búsqueda en Science Direct: Página web de la BUZ → enlace a *Science Direct* → Palabra clave → “Canine Leptospirosis” → 1.330 resultados → filtro temporal desde 2008-2018 → 624 resultados. Tras la aplicación de los filtros de revistas (revisadas), especies animales (excluidos animales de abasto) e idioma (seleccionados inglés y español): se ha reducido a **92 artículos (33 entre 2015 y 2019)** y páginas web de instituciones relacionadas. En el texto se utiliza “en nº” para referirse a artículos “citados por”.

## 4. INTRODUCCIÓN

Se cree que la leptospirosis ya era conocida por civilizaciones antiguas, como Mesopotamia, el antiguo Egipto o en Grecia, en la época de Hipócrates y Galeno, ya que se han encontrado en los restos de estas civilizaciones descripciones de lesiones que podrían relacionarse con la Leptospirosis. Se cree que la enfermedad de Weil apareció en Europa en el siglo XVII, con la introducción de la rata (*Rattus norvegicus*) desde Asia<sup>27</sup>. La enfermedad recibió diversos nombres asociados a su origen o fuentes de infección relacionadas con el medio ambiente, los

reservorios animales o sus características clínicas, en épocas en las que todavía el diagnóstico de la infección no era posible.

Lacereaux, en 1802, realizó una descripción clínica de un caso que podría reconocerse como Leptospirosis, siendo el primero en describirla clínicamente (en<sup>34</sup>). Landarouzy, en 1883, describió un cuadro de hemorragias e ictericia al que llamó “tifus hepático”, distinguiéndola de otras entidades clínicas semejantes y que podía ser leptospirosis (en<sup>51</sup>). En 1886, Adolf Weil en Alemania y Mathieu en Francia (en<sup>1</sup>), describieron cuadros clínicos similares (agudos, con afección renal grave e ictericia). Goldschmidt, en 1887 (en<sup>34</sup>) la denominó “enfermedad de Weil” cuando detectó signos de esta sintomatología en agricultores, diferenciándola del resto de ictericias. En 1914, Inada y col, en Japón, demostraron la presencia de espiroquetas en el hígado de cobaya inoculada con sangre de una persona con la “Ictericia infecciosa”, denominándola *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (en<sup>34</sup>). En 1917, el Instituto Pasteur desarrolló un test serológico diagnóstico de la enfermedad. La denominación *Spirochaeta interrogans* se debe a Stimson (1907), cuando observó la morfología del extremo de la leptospira en el microscopio (en<sup>50</sup>). En 1917 fue identificada en el riñón de la rata y se demostró su papel en la transmisión a las personas (en<sup>1, 51</sup>). Paralelamente, en Alemania, varios médicos observaron el agente de la que llamaban “enfermedad francesa” en los soldados, y Fromme y Reiter, por separado, observaron la espiroqueta en la sangre de cobayas inoculadas con la sangre de los soldados (en<sup>1, 51</sup>). La importancia del perro se demostró en 1918 (en<sup>51</sup>), a la par que se demostró su papel en la “ictericia contagiosa” descrita por Weil, denominada previamente como “enfermedad de las alcantarillas”. Posteriormente se demostró en el cerdo, bóvidos, casi todas las especies domésticas y en un gran número de especies salvajes. En 1920, Noguchi le dio el nombre de *Leptospira* cuando estudiaba la “Fiebre amarilla” en Mérida (Yucatán) (en<sup>34</sup>). La infección por leptospiras en poiquiloterms existe pero es poco conocida y difícil de demostrar, aunque ha habido casos humanos que se han relacionado con acuicultura, principalmente<sup>24, 64</sup>.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Emergencia de las Leptospiras

Estudios recientes han establecido que las Leptospiras aparecieron en el planeta hace alrededor de 2,02 miles de millones de años. Derivadas de *Leptonema illini*, más o menos a la par que *Treponema* y *Borrelia*<sup>47</sup>, lo que sugiere que las *Spirochaetae* divergen unas de otras (en<sup>47</sup>). De hecho las leptospiras saprofitas divergen del resto de las especies, y las intermedias divergen de las patógenas. La adaptación a los mamíferos parece asociada a la pérdida de algunos receptores sensoriales de las señales de transducción y a la ganancia de algunos genes

de virulencia (en<sup>47</sup>). *L.interrogans* divergió de *L.kirschneri*, en el Paleogeno (periodo templado de 23-29°C y húmedo), cuando los mamíferos se estaban desarrollando y evolucionando (en<sup>47</sup>). En el análisis filogenético de 45 cepas aisladas entre 1929 y 2014, se detectó un ancestro común a ellas en 1350 AD y se separaron en 2 linajes, con diferentes años de evolución de los ancestros entre ambas. En el linaje 2 se encontró el ancestro canino (Thai), con riqueza de ribosomas, posiblemente asociado al aumento de la actividad celular y su crecimiento, aumentando la síntesis de proteínas y su replicación, que se adaptó a diferentes nichos ecológicos y hospedadores. Estas cepas caninas Thai se aislaron a partir de orina de perros asintomáticos y habían ganado familias de genes en los procesos de biosíntesis de vitamina B, adhesión celular y en la estructura externa de encapsulación, ya que para su supervivencia las leptospiras necesitan cobalamina (B12) y riboflavina (B2) (en<sup>47</sup>). De hecho, *L.interrogans* posee un set casi completo de genes relacionados con la producción de cobalamina para facilitar la supervivencia en fuentes de nutrientes limitadas, como ocurre en los túbulos renales. Además, la adhesión celular y la encapsulación (como sería el biofilm), son importantes en la colonización renal y en la evasión inmune de las leptospiras patógenas, y podría estar relacionado con su adaptación en las infecciones crónicas (en<sup>47</sup>).

## 5.2. Etiología, clasificación y su complejidad

El Género *Leptospira* (Lepto=fino y espira=espiral) pertenece al Orden *Spirochaetales*, Familia *Leptospiraceae*<sup>35</sup>. Es una bacteria alargada (6-25µm x 0.1-0.2µm) helicoidal, con extremos en forma de gancho, aerobia estricta y gran movilidad debida a dos flagelos periplásmicos de inserción polar y estructura proteica compleja<sup>1,51</sup>. Consta de tres componentes estructurales: el cilindro protoplásmico, que se dispone alrededor del eje central o axis; los dos filamentos axiales de naturaleza proteica y una doble membrana externa en la que la membrana citoplásmica y la pared celular de peptidoglicanos están estrechamente unidas y cubiertas por la membrana externa, en la cual los lipopolisacáridos tienen composición similar a las de otras bacterias Gram negativas, pero con escaso poder endotóxico<sup>1, 7, 36, 51</sup>. Tiene tres tipos de movimientos: rotación alrededor del axis central; movimiento progresivo en la dirección del extremo recto y movimiento circular<sup>21, 51</sup>.

Es una bacteria lábil que se destruye con la desecación, la luz solar directa, pH menor de 6 o mayor de 8, temperaturas menores de 13°C o mayores de 35°C. Es sensible a todos los desinfectantes habituales, la bilis, la putrefacción y a la mayoría de los antibióticos<sup>1</sup>.

El aislamiento en cultivo es difícil, lento y necesitan medios especiales enriquecidos. Clásicamente se enriquecían con suero de conejo y posteriormente con sero-albúmina bovina, ácidos grasos de cadena larga y una fuente nitrogenada, vitaminas B2 y B12 como factores de

crecimiento y tween 80 (medio de Ellinghausen McCullough-Johnson-Harris o EMJH). Pueden sobrevivir varios días en medios con sangre<sup>51</sup>. Se cultiva entre 28-30 °C en un pH=6,8-7,4 al menos 3 meses para descartarlo como negativo. Se suelen añadir 5-fluorouracilo, Sulfato de neomicina, polimixina B, rifamicina o vancomicina para inhibir otras bacterias.

El mantenimiento de la bacteria se realiza por sub-cultivo cada 7-10 días en estos medios, durante años<sup>51, 62</sup>, en medios semisólidos (crecen en el límite inferior de la superficie del medio, a 30°C o a Tª ambiente), con subcultivos cada 2-6 meses, por liofilización y congelación a -70°C<sup>1, 24, 51</sup>. La observación en preparaciones frescas se realiza en microscopio de contraste de fases o de campo oscuro. En microscopio ordinario, por tinción de impregnación argéntica, o en tejidos fijados mediante inmunohistoquímica. En tejidos frescos y sedimentos urinarios con la tinción específica de anticuerpos fluorescentes (FA)<sup>1, 24, 51</sup>. Ocasionalmente en microscopio electrónico.

Biología Molecular: El genoma de las leptospiras está formado por dos cromosomas circulares<sup>10</sup>, cuya secuencia completa se estableció en 1998 y tiene una longitud superior a la de otras espiroquetas. Está formado por aproximadamente 5.000 Kb<sup>5</sup>, comprimido en dos secciones, un replicón grande de 3,6 a 4,3 mega pares de bases (Mb) con funciones típicas de las bacterias conteniendo los genes de la replicación de las proteínas dnaA, dnaN, gyrA y gyrB y numerosos genes esenciales y conservados<sup>90</sup>. Por otro lado, el replicón pequeño de 277 a 350 Kb, similar a un plásmido con genes esenciales para la biosíntesis de aminoácidos. En *L.biflexa* se describe un replicón de 74 kb no presente en las especies patógenas<sup>9, 88</sup>. Los estudios de estos genes indican que las leptospiras pueden codificar de 3085 a 3600 proteínas, de las que se desconoce su papel en un alto porcentaje. En 3 especies secuenciadas (*L.biflexa*, *L.interrogans* y *L.borpetersenii*) se han encontrado 2052 genes comunes. Un tercio de los genes de *L. biflexa* no están presentes en las especies patógenas y en su mayoría se relacionan con la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente<sup>1, 65</sup>. Se han encontrado 50 genes asociados con la motilidad<sup>10</sup>, que le permite invadir los tejidos y se relaciona con el poder patógeno<sup>30, 31, 42</sup>.

Poseen genes implicados en el sistema de utilización de ácidos grasos de cadena larga, un ciclo de ácido tricarbóxico y una cadena de transporte de electrones y hay pocas diferencias entre las especies. Lo mismo se observa con los genes implicados en la síntesis de aminoácidos<sup>88</sup>.

Además, en las leptospiras se encuentran secuencias de inserción (SI), que son elementos de transposición. Varían en tamaño desde 700 a 2500 pares de bases (pb) y poseen uno o más marcos abiertos de lectura (Open Reading Frames, ORF). También poseen varios tipos de secuencias repetidas en su genoma que incluyen varias SI y codifican para la enzima transpononasa (SI1533), con un solo ORF. Ejercen el papel de transposición y reordenamiento genómico, así como la transferencia horizontal<sup>92</sup>. *L. borpetersenii* tiene un número de SI 10

veces superior a *L. biflexa* y *L. interrogans*, además de contener más pseudogenes: más de 600 pseudogenes, transposonas o SI (22%), comparado con el 2% en *L.interrogans* y 1% de *L.biflexa*. Esto ha dado lugar a sugerir que *L.borgpetersenii* está en fase de especialización y estos elementos se relacionan con menor adaptación a condiciones ambientales, lo que podría conllevar que la transmisión se realice por contacto<sup>2,91</sup>.

Taxonomía y nomenclatura: La clasificación se realiza por dos métodos: serológico o fenotípico y genético. Como los resultados de estos métodos no son coincidentes entre sí, actualmente se están empleando ambos. Se han detectado unos 300 tipos de variantes antigénicas, lo que dificulta la diferenciación de las cepas aisladas por métodos serológicos. El análisis genético permite detectar la homología del ADN y detecta las variables filogenéticas, de modo que se han podido diferenciar las especies patógenas, intermedias y saprofitas<sup>49</sup>.

En 1989, Prior las clasificó por el método serológico en dos especies: *L.interrogans*, que incluye los serovares patógenos y *L.biflexa* para los serovares saprofitos<sup>24</sup>. La unidad taxonómica en *Leptospira* es el serovar, se clasifican por medio del test de microaglutinación tras la absorción cruzada con anticuerpos homólogos y heterólogos (CAAT)<sup>46</sup>. Las leptospiras patógenas se agrupan dentro del «complejo interrogans», que posteriormente se denominó *L.interrogans* sensu lato. Los serovares homólogos antigénicamente han sido agrupados en serogrupos, que han sido de una gran utilidad epidemiológica<sup>46</sup>. Los serovares tienen distribución ubiquitaria o local, poder patógeno variable y preferencia por diferentes especies animales<sup>46, 89</sup>. Los serovares saprofitos se agrupan en el «complejo biflexa», posteriormente denominado *L. biflexa* sensu lato. La nomenclatura aceptada consiste en la utilización de letra itálica en el género y la especie, y los serovares se indican en letra normal con la primera letra en mayúscula<sup>16</sup>. Existen más de 60 serovares de *L.biflexa* sensu lato y más de 200 serovares (algunas todavía no validadas), agrupadas en 24 serogrupos dentro de *L.interrogans* sensu lato. La gran cantidad de serovares existentes<sup>3</sup>, unida al cambio constante de sus antígenos de superficie hace que haya muchas cepas y que sea difícil llevar un registro de todas, porque su identidad molecular continúa cambiando según el huésped y los nichos ambientales que habitan. El “Comité internacional de taxonomía sistemática de procariotas”, en concreto el subcomité para *Leptospiraceae*, actualiza periódicamente los serovares<sup>77</sup>. En la reunión de 2017<sup>66</sup> el subcomité reconoció la especie *L.venezuelensis*, aislada en un humano, una rata y una vaca<sup>68</sup> y no se han descrito nuevas especies desde 2015.

Técnicas moleculares para la subclasificación y catalogación de leptospira son: Prueba de restricción de la endonucleasa (REA, siglas en inglés), Electroforesis de campo pulsado (PFGE, siglas en inglés), Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP, siglas en inglés) o PCR basado en secuencias elegidas arbitrariamente.



Estas técnicas tienen inconvenientes, ya que necesitan grandes cantidades de DNA de alta calidad, tienen un poder discriminatorio y una reproductibilidad bajas, interpretación de datos ambigua y hay problemas en la transferencia de datos<sup>3</sup>.

La técnica MLST (Multiple Locus Sequence Typing) está basada en la PCR simple, y utiliza secuenciadores de ADN automáticos para asignar y caracterizar alelos presentes en diferentes genes objetivo. Se ha utilizado para diferenciar las distintas especies de *Leptospira*, y examinar sus relaciones intra e interespecíficas<sup>3</sup>. La principal ventaja de esta técnica frente a las anteriores es la facilidad de compartir y comparar datos entre diferentes laboratorios a través de Internet<sup>3</sup>. Se ha completado la secuenciación del genoma completo de varios serovares. *L.interrogans* sv. Lai fue la primera<sup>71</sup>, con 4768 genes. La clasificación genotípica se basa en la homología del ADN, los serovares se definen cuando tienen un 70% de homología y un 5% de divergencia en el ADN. Está sujeta a revisiones continuas, las genomoespecies no se corresponden con las dos especies descritas, y las serovares patógenas y no patógenas se hayan dispersas entre ellas<sup>12, 70, 89</sup>. También hay heterogeneidad genética entre los serovares, de modo que las características fenotípicas utilizadas para diferenciar *L.interrogans* sensu lato de *L. biflexa* sensu lato no sirven para diferenciar las genomoespecies. El análisis filogenético permite clasificar el género *Leptospira* en 3 linajes, que incluyen 10 especies patógenas: *Leptospira interrogans*, *L.borgpetersenii*, *L.santarosai*, *L.noguchii*, *L.weillii*, *L.kirschneri*, *L.alexanderi*, *L.alstonii*, *L.kmetyi* y *L.mayottensis*; 6 intermedias: *L.inadai*, *L.broomii*, *L.fainei*, *L.wolffii* y *L.licerasiae* y *L.venezuelensis* y 7 saprofitas: *L.biflexa*, *L.wolbachii*, *L.vanthielii*, *L.terpstrae*, *L.meyeri*, *L.idonii*, y *L.yanagawae*<sup>13</sup>.

El grupo patógeno incluye cepas aisladas de humanos y animales; las especies intermedias son saprofitas genéticamente pero su virulencia aún no se ha determinado experimentalmente, y las no patógenas o saprofitas son las propias del medio ambiente<sup>67</sup>.

Se considera que el genoma de *L.biflexa* es bastante estable mientras que en las especies patógenas hay numerosas inserciones y reorganizaciones de secuencias<sup>3,72</sup>. Se han comparado casi 500 genomas de especies de *Leptospira* y los principales serovares<sup>13,28</sup> mediante MLST<sup>53</sup> y análisis filogenético<sup>13</sup>. Actualmente se conocen gran cantidad de secuencias genéticas completas de aislamientos mundiales de *Leptospira spp*, y con herramientas en línea se pueden asignar tipos de secuencia de MLST directamente con esas bases de datos. La técnica MLST ayuda a la clasificación serológica como un enfoque complementario. El análisis filogenético muestra que la recombinación, la conversión de genes o la transferencia lateral de genes desempeñan un papel importante en la continua evolución del género *Leptospira*<sup>13,44</sup>.

Una **nueva técnica de identificación** es el **MALDI-TOF MS** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization and Time of Flight Mass Spectrometry). Es una técnica de detección de

péptidos de 2 a 20 Kd derivados de fragmentos de proteínas de los ribosomas capaz de identificar a nivel de especie y subespecie, que ha sido equiparada al MLST en su capacidad de identificación de microorganismos. Cualquier pequeña variación en las proteínas ribosomales conservadas es suficiente para distinguir los microorganismos a nivel de subespecie. Karcher et al, en 2018<sup>44</sup>, presentaron un estudio realizado en Brasil con cepas de *L.interrogans* y *L.kirschneri* de referencia y 22 patógenas aisladas de campo y no patógenas aisladas de orina de bóvidos, personas, perros y ratas. Todas ellas habían sido identificadas previamente por PCR. Así consiguieron elaborar una base de datos de su espectro y concluyeron que MALDI-TOF-MS tiene el suficiente grado de precisión para diferenciar las cepas patógenas de las no patógenas y para distinguir especies muy relacionadas entre sí, como *L.interrogans* y *L.kirschneri*<sup>44</sup>.

### 5.3. Epidemiología

La Leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial con mayor prevalencia en zonas intertropicales y subtropicales. Aproximadamente se informan al año 1,03 millones de casos y unas 60.000 muertes. Se ha calculado una pérdida de 2,9 millones DALY's por año (Disability-Adjusted Life Years o "pérdida de años de vida saludable")<sup>17, 22, 81</sup>. El cálculo es difícil porque en los países donde es más frecuente carecen de la suficiente estructura de diagnóstico y vigilancia como para tener datos fiables. La OMS reconoce que en Hawaii podrían producirse el doble de casos de los que se informa y en Perú se considera infradiagnosticada, con consecuencias clínicas graves en áreas urbanas sobre todo. En Gabón más del 15% de las personas de los suburbios tienen evidencia de infección por leptospirosis pero no son informadas.

En la especie humana, la enfermedad es esporádica o en focos anadémicos (adquirida de una fuente común). En los animales es enzoótica y esporádica (desde el punto de vista clínico). Las cepas y/o serovares prevalentes en diferentes zonas geográficas pueden ser variadas y no coincidentes, dado que su presencia depende del tipo de hospedadores, animales de la zona, del clima, tipo de suelo, presencia de inundaciones, época de lluvia intensa, etc. Esto también es aplicable a su patogenicidad, ya que serovares muy patógenas en una especie pueden ser completamente apatógenas en otra. Así, se puede hablar de serovares de distribución mundial como *L.Icterohaemorrhagiae*, que es muy patógena en humanos pero apatógena en ratas, y de serovares más adaptadas a una especie, como *L.Canicola*, patógena en humanos y parcialmente apatógena en el perro, que se convierte en reservorio de esta serovariedad<sup>51</sup>.

Faine<sup>24</sup> definió 3 patrones epidemiológicos de leptospirosis humana: 1) en zonas de clima templado donde las personas se infectan por contacto directo con *animales de granja*. 2) En

áreas tropicales, donde hay un mayor número de serovares y de animales reservorios implicados, como las *ratas*, los *perros* y el *ganado*. 3) la infección transmitida por roedores en el medio urbano. Ocurre sobre todo en países en desarrollo. Los humanos se infectan por contacto directo con la orina o a través del suelo, agua o alimentos contaminados<sup>51</sup>.

En *España*, la leptospirosis clínica humana se diagnostica poco y se suelen declarar entre 0 a 6 casos por año, sin embargo es infradiagnosticada. Por ejemplo, en un estudio realizado con estudiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza durante el curso 1994-1995 se observó que la prevalencia de leptospirosis en los estudiantes de veterinaria aumentaba de un 8,14% al comienzo del curso a un 11,4% al final del mismo. Se vio que la seroprevalencia era siempre mayor a final de curso, y que el mayor aumento era en los estudiantes de quinto curso y el menor en los de primer curso. Ninguno de estos casos fue informado en el centro de Salud<sup>76</sup>.

En el año 2017 se comunicó un caso relacionado con un triatlón en la ría de Bilbao. Tres deportistas de los 1.200 participantes desarrollaron leptospirosis y hubo que alertar a todos ellos, llegando a comunicar 23 casos sin muertes. Se ha mejorado en la vigilancia de esta enfermedad y se están comunicando un mayor número de casos a la OIE (en 2016, 15 casos, en 2017, 23 y en 2018, 64, sin muertes). El aumento de actividades al aire libre, y la posible influencia del cambio climático puede favorecerlo<sup>29</sup>.

Factores que lo favorecen: en la especie *humana* la transmisión de la infección y el desarrollo de la enfermedad y su duración dependen del clima, la densidad de población y el grado de contacto con los hospedadores accidentales y los reservorios, que a su vez se relaciona con la profesión y actividades relacionadas con medios hídricos. La infección tiene lugar por contacto *directo* con la orina o material derivado del aborto de animales infectados u otros fluidos y excreciones, o bien *indirectamente* a través del suelo o el agua contaminadas en las que puede persistir meses o años si se encuentra en condiciones de humedad o medio líquido, suelo alcalino, protección de luz solar directa, contenido rico en restos de orina y otras materias orgánicas y temperatura templada<sup>22, 39, 79</sup>. En consecuencia, está relacionado con la *profesión* (agricultor, ganadero, veterinario, personal de mataderos, y de manejo de productos animales, personal de mantenimiento de alcantarillas, etc), con la *zona geográfica* donde se habita (zonas marítimas, cerca de lagos, pantanos, ríos), la *estación* del año (templadas y húmedas), y en *viajes y actividades* al aire libre en zonas donde coinciden esos factores<sup>22</sup>. Los viajes internacionales a países en desarrollo con condiciones sanitarias e higiénicas deficientes, y el comercio con animales domésticos y salvajes están teniendo un papel importante en la transmisión de la leptospirosis humana<sup>33</sup>.

Fuentes de infección: Independientemente de la especie animal, la bacteria es excretada por los enfermos en altas dosis en todas las secreciones y excreciones, mientras que los infectados

subclínicamente pueden excretarla en la orina durante años a bajas dosis o de forma intermitente y los reservorios la excretan durante años o toda la vida<sup>1,51</sup>.

Los reservorios: las leptospiras colonizan y persisten en los túbulos renales de un amplio rango de mamíferos salvajes y se excretan en la orina con diferente frecuencia durante toda la vida, contaminando el agua y el suelo continuamente. Son una fuente de infección perpetua para las personas y otros animales domésticos. Los más importantes son los roedores, dentro de ellos las ratas (principal reservorio de leptospiras patógenas), los animales domésticos y los mamíferos silvestres. Según el área geográfica también intervienen otros animales como pequeños marsupiales, erizos, ciervos, etc. Casi cada mamífero puede ser un reservorio de leptospiras (incluidos mamíferos acuáticos), y puede intervenir en la transmisión a las personas. En la Especie humana se le considera una infección accidental<sup>22</sup>. La infección interhumana es casi inexistente y raramente desarrolla infección crónica, a pesar de que ocasionalmente, deja secuelas tras la enfermedad<sup>1</sup>.

Los *perros* son *indicadores de los serovares* prevalentes en una zona, y pueden ayudar a detectar cambios en su prevalencia, independientemente de que se observe un descenso de prevalencia de infección por leptospiras a nivel global gracias a la vacunación. Sin embargo, hay países en los que se considera una infección re-emergente debido a cambios en la infecciosidad de los serovares y al aumento de serovares no contenidos en la vacuna (en<sup>48</sup>). En *Europa*, los perros están más expuestos a los serogrupos Icterohaemorrhagiae (hospedador: rata), Australis (hospedadores salvajes), Canicola (hospedador: perro), Grippytyphosa y Sejroe (hospedador: roedores). La prevalencia de estos serovares es dependiente de la presencia de los roedores. En *Grecia y Alemania* también se ha detectado un aumento del serogrupo Pomona, que tradicionalmente se ha asociado a los animales de abasto (en<sup>48</sup>). En Nueva Zelanda entre los años 2001 y 2015, los *serovares prevalentes en las personas fueron:* Ballum, Tarassovi, Pomona, Canicola, Copenhageni, Australis y Grippytyphosa<sup>22</sup>. En general, con las variaciones debidas a los factores mencionados, los *serovares más comunes en el perro* son: Australis, Bratislava, Autumnalis, Canicola, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Saxkoebing y Sejroe<sup>22,51</sup>.

La transmisión de leptospiras entre los hospedadores, ocurre por contacto directo o indirecto. La transmisión *indirecta* ocurre por exposición a fuentes de agua, suelo o alimentos contaminados. La transmisión *directa* se da vía cutánea por contacto con orina infectada, sobre todo si hay erosiones en la piel o incluso en piel intacta favorecido por la humedad del ambiente, también a través de las mucosas, por vía venérea o placentaria, heridas por mordedura o ingestión de tejidos infectados<sup>48,79</sup>. El serogrupo Icterohaemorrhagie, compuesto por los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni, es el más patógeno para las personas.

Este serovar, en particular la cepa FIOCRUZ L1-130, es el más prevalente en la leptospirosis humana y en la canina<sup>74</sup>.

En el *perro*, hay brotes de infección tras los periodos de mayor humedad, que varía geográficamente dependiendo del patrón de lluvias y de los periodos de frío. Perros que vagabundean en áreas rurales o perros que viven en patios traseros de barrios periféricos en los que pueden contactar con animales salvajes son propensos a infectarse. También se observa en perros de trabajo. Los perros de rescate que realizan actividades al aire libre (búsqueda y rescate de personas entre escombros tras incendios o desastres naturales, oler cadáveres...), están más expuestos al suelo y agua contaminados con *Leptospiras*. Es importante saber qué serovares infectan a estos perros, puesto que sus cuidadores están constantemente en contacto con ellos y por tanto en riesgo de exposición<sup>48</sup>. Independientemente de que cualquier perro, de cualquier edad, raza y sexo puede infectarse, en un estudio se observó una mayor incidencia en perros de entre 4 y 10 años de raza grande. Podría deberse a que son muy activos al aire libre, lo que incrementa el riesgo de exposición<sup>48</sup>. El contacto con roedores es posible tanto en ambiente rural como en ciudades<sup>51,79</sup>.

Las *inundaciones* después de fuertes lluvias representan un peligro importante para la especie humana y los animales, al favorecer un ambiente adecuado para su diseminación. En *Sri Lanka*, en el 2018, se identificaron los efectos de las inundaciones en la propagación de leptospirosis en algunas zonas de Sri Lanka, además de otros factores (cultivo de arroz y cría de ganado)<sup>85</sup>. Los agricultores de los arrozales se identificaron como el grupo más vulnerable, ya que usaban el agua contaminada para su higiene personal y otras actividades. También se exponían a la infección al andar en el agua contaminada y haciendo deporte en ellas sin la protección adecuada. En el 2019, se realizó una revisión sistemática de los datos de la zona y se comprobó que los niveles de población afectada eran muy superiores a los que se conocían anteriormente (300,6 casos/100.000 habitantes)<sup>85</sup>.

En *Kansas y Nebraska (EEUU)* se estudió el riesgo hidrológico en la leptospirosis canina y se observó que la distancia a la zona inundada (hasta 2500 metros alrededor de ella), la densidad de zonas hidrológicas y la frecuencia de inundaciones, son factores de riesgo. Las áreas frecuentemente inundadas dentro de los límites urbanos son especialmente importantes en la transmisión de la leptospirosis debido a la mayor densidad de perros y mamíferos salvajes. El aumento de la expansión urbana y otras actividades desencadenan la pérdida de hábitat para los mamíferos silvestres y hacen que cada vez vivan más cerca de las ciudades<sup>69</sup>.

Tras un análisis de 24 *pacientes humanos* con leptospirosis entre 2011 y 2017 en el centro médico de la universidad de Hamburgo-Eppendorf que habían viajado al sudeste asiático se

concluyó que los viajes a éste continente si además se acompañaba de actividades en medios de agua dulce, son factores de riesgo para contraer leptospirosis<sup>11</sup>.

En Febrero del 2011 se informó un caso clínico de un varón de 37 años que se presentó en urgencias con fiebre aguda, mialgia e hiperemia conjuntival, y en el hospital desarrolló la tríada clásica de la enfermedad de Weil (fallo renal agudo, ictericia y esplenomegalia). Semanas más tarde se confirmó que el paciente se infectó a través de 4 ratas blancas que tenía como mascotas, las cuales resultaron positivas para *L.interrogans* seovar Icterohaemorrhagiae o Copenhageni a partir de muestras de riñón. Por tanto, las personas que tienen ratas como mascota son un grupo de alto riesgo de contraer esta enfermedad<sup>43</sup>.

#### 5.4. Patogenia

Los mecanismos por los que las leptospiras patógenas causan daño tisular aún no se conocen bien, aunque gracias a los avances en las técnicas moleculares se van definiendo algunos factores<sup>1, 49</sup>. Es probable que en su evolución, las leptospiras patógenas hayan adquirido factores de virulencia por transferencia horizontal de genes, intentando adaptarse a nuevos hábitats<sup>88</sup>. En órganos como el riñón y el hígado, el daño tisular puede ser reversible, pero los daños que persisten en tejidos como el miocardio pueden dejar secuelas. Las leptospiras patógenas son resistentes a la acción del complemento y los neutrófilos en hospedadores que no están inmunizados, pero sí que son destruidas si hay anticuerpos específicos presentes<sup>1</sup>.

Tras penetrar a través de las mucosas o la piel son capaces de entrar en el sistema circulatorio en poco tiempo y establecer una bacteriemia que suele durar unos 7 días, variable dependiendo de la dosis infectante, las condiciones de la exposición, la cepa y la respuesta inmune del hospedador<sup>35</sup>. Durante este periodo de leptospiremia se diseminan a tejidos y órganos, principalmente a riñones, hígado y pulmón. En consecuencia, para ejercer su acción patógena, las leptospiras tienen que sobrevivir a la acción del complemento, diseminarse por la sangre, alcanzar los órganos diana y permanecer en los túbulos renales durante meses.

A diferencia de otras bacterias, las leptospiras mantienen su movilidad a través del tejido conjuntivo. Este es un paso esencial en su diseminación y se consigue con proteínas quimiotácticas, que les permiten adaptarse y migrar hacia tejidos y órganos. Las leptospiras virulentas se adhieren a componentes de la matriz extracelular (ECM, sus siglas en inglés), como el colágeno tipo I, tipo IV, la laminina y la fibronectina, mediante más de 200 proteínas de la membrana externa de la bacteria (adhesinas). Se han ido identificando adhesinas como la Lsa24, que se une a la laminina (ésta posteriormente se ha conocido como LenA o endostatina A); Lsa21 muestra similitudes con el lípido LipL53 y se une al colágeno IV. Las proteínas Lig son propias de las leptospiras patógenas. Las LigA y LigB interactúan con la fibronectina, laminina y

colágeno I y IV. La Lsa23 también se une fuertemente a la laminina y al colágeno IV. También está reconocida la interacción de la LigB con el colágeno III, elastina y tropoelastina. Otras proteínas identificadas se pueden unir al plasminógeno transformándolo en plasmina, que a su vez degrada la fibrina, y otra acción es la inhibición de la vía clásica del complemento. La OmpL1 (porina de la membrana externa), también se une a la laminina y fibronectina<sup>15, 52</sup>.

Mecanismos de evasión de la fagocitosis: las leptospiras escapan a la acción de los macrófagos para sobrevivir en el hospedador. Inducen la apoptosis de los macrófagos con fagocitosis inhibida, pero aún no se conoce la base molecular y el mecanismo de este proceso<sup>20</sup>. Los macrófagos (de ratón y humano) con fagocitosis inhibida (inducida experimentalmente), sufrieron apoptosis durante la infección con *Leptospira interrogans*, por lo que puede ser que los inductores de apoptosis se expresen en la superficie de las leptospiras<sup>20</sup>. Se ha observado que la única proteína capturada por las proteínas Fas de ratón y humanos es el producto del gen de *L.interrogans* LB0476 (LP-OMP047). La proteína recombinante de éste gen (rLP-OMP047) se une fuertemente a las proteínas Fas de ratón y humanos. No se produce la apoptosis si el Fas está bloqueado o eliminado, mientras que la inhibición de las caspasas 3 y 8 causa un descenso notable en la inducción de la apoptosis de los macrófagos mediante la rLP-OMP047. De lo que se ha deducido que ésta proteína induce la apoptosis de los macrófagos por la vía del Fas/FasL-caspasa-8/3. También se ha observado que los LPS de esta bacteria inducen la apoptosis con menor intensidad<sup>20</sup>.

Las hemorragias son otra de las consecuencias graves de la infección y otro de los aspectos poco conocidos de su patogenia. Para controlar las hemorragias debe haber agregación plaquetaria, cuyo paso inicial es la unión del factor de von Willebrand (vWF) a la glicoproteína-Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ) de las plaquetas. Los genes *vwa-I* y *vwa-II* son los que contienen esos dominios, sin embargo su capacidad para inducir hemorragias no se conocía. En un estudio con *L. interrogans* cepa Lai que contiene esos genes, se obtuvieron las proteínas que codifican por tecnología recombinante (rLep-vWA-I y rLep-vWA-II) y se vio que eran capaces de unirse a la ristocetina, que induce la agrupación plaquetaria en humanos, inhibiéndola. Si se utilizaban anticuerpos específicos frente a las rLep-vWA-I y rLep-vWA-II, se bloqueaba la unión y la inhibición. De este modo demostraron que los genes *vwa-I* y *vwa-II* inducen hemorragia por inhibición competitiva de la agregación plaquetaria mediada por el vWF<sup>25</sup>.

Se le reconoce acción hemolítica in vitro, debida a la presencia de esfingomielinasas intra o extracelulares (cuyos genes se han identificado), y fosfolipasa. Además, se conocen al menos siete genes (*sphA-like*) relacionados con la producción de estas hemolisinas en las leptospiras patógenas, que incluyen la hemolisina sphH, aunque es difícil demostrar estos factores de virulencia en la patogénesis *in vivo*<sup>28, 65, 88</sup>.

La membrana externa de las leptospiras contiene lipopolisacáridos (LPS) y lipoproteínas OMPs (Proteínas de la membrana externa)<sup>36, 38</sup>. Los LPS son altamente inmunogénos y determinan la especificidad del serovar<sup>14, 19</sup>. La expresión de OMPs parece tener relación inversa con la virulencia<sup>36,38</sup> y la producción de hemólisis<sup>24</sup>. La lipoproteína LipL32 es la más abundante, con 272 aminoácidos y el lípido palmitato, y solo se detecta en las leptospiras patógenas<sup>18</sup>. Tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad y apoptosis de las células endoteliales experimentalmente en la vena umbilical humana. Podría ser la que favorece el establecimiento de la infección al principio y la entrada a la circulación sanguínea<sup>57</sup>. Puede interactuar con el receptor tipo Toll-2, encargado de la expresión de isoleucina 8, que favorece la inflamación. La disminución de la expresión de esta LipL32 podría ser una estrategia de la bacteria para no ser reconocida por el sistema inmune<sup>40, 84</sup>.

La lipoproteína LipL41, menos abundante, está muy conservada entre las serovariedades patógenas y no se detecta en las saprofitas. Junto a la porina transmembrana Ompl1, forman un conjunto de antígenos proteicos que se están estudiando para conferir protección en la infección aguda. Ésta porina está formada por 320 aa y se considera un interesante marcador diagnóstico para la leptospirosis humana y canina puesto que favorece la unión de la leptospira con la EMC, por medio de la fibronectina plasmática, la laminina y otros componentes del suero. Se expresa durante la infección y parece participar en la patogenia<sup>26</sup>.

La inmunopatogénesis de la enfermedad no está bien entendida. Se ha evaluado la correlación entre la forma aguda de la enfermedad y la relación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (interleukina-10) con la expresión de TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$  (interleukina-1 $\beta$ ) proinflamatorios durante la fase temprana de la infección. Se han usado dos cepas de Leptospiras virulentas: *L.interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae cepa Verdun (LiVV) y *L.borgpetersenii* serogrupo Ballum (B313S) para comparar ratones naturalmente resistentes (modelo resistentes a LiVV y reservorio de la cepa B313S), y hámsteres (modelos para reproducir la forma grave con ambos serovares)<sup>56</sup>. Se ha analizado la regulación de IL-10, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en sangre de estos dos modelos para investigar el efecto de las cepas en la expresión de citoquinas, y la relación entre la resistencia del animal y la regulación de citoquinas. Los ratios de expresión de IL-10/TNF-alfa e IL-10/IL-1 $\beta$  son más altos en los ratones que en los hámsteres, independientemente de la cepa de Leptospira, lo que sugiere un papel importante de estas citoquinas en la expresión clínica y la supervivencia de Leptospirosis<sup>55, 56</sup>. El TNF- $\alpha$  (proinflamatorio) y la IL-10 (antiinflamatorio) se encuentran entre los principales mediadores biológicos que ejercen efectos adversos durante la infección bacteriana. La IL-10 tiene un papel fundamental en la resolución de la inflamación durante la leptospiremia pero interfiere en la respuesta inmune innata y adaptativa favoreciendo la persistencia de las leptospiras<sup>57</sup>. Se



investigó la expresión del gen de estas citoquinas en el modelo susceptible (hámster), entre el tercer y cuarto día post infección, ya que es cuando la leptospiremia alcanza los niveles más altos. No se observaron diferencias en el nivel de expresión de TNF- $\alpha$  entre el hámster y el ratón cuando se infectan con la misma cepa. Por el contrario, el nivel de IL-10 es mayor en la sangre de ratón en comparación con la de hámster, independientemente de la cepa. Esto sugiere que la IL-10 tiene un papel importante en la resistencia de los ratones a la leptospirosis<sup>56</sup>. La citoquina IL-10 está asociada con la susceptibilidad y la resistencia a la infección y la persistencia de las leptospiras. Al neutralizar la IL10 con anticuerpos anti-IL10 en los ratones infectados con la cepa LiVV, se observaron síntomas clínicos y pérdida de peso, a pesar de que el ratón es resistente a esta cepa. Aunque la neutralización de la IL10 no afectó a la leptospiremia, sí que hubo evidencias de su papel en el aclaramiento bacteriano en los tejidos renales. De hecho, la neutralización de IL-10 en ratones infectados con *Leptospira* condujo a una disminución de la carga bacteriana en los riñones en la post infección en el día 7. Por lo tanto, la IL-10 podría ser un componente importante en el mantenimiento de leptospira en los riñones del ratón reservorio en su entorno natural<sup>55, 56, 57</sup>.

El fenotipo de los macrófagos que intervienen en la infección también determina la evolución. La cascada de quimiocinas involucradas en la progresión de la enfermedad crónica renal (ECR), a partir de la fase aguda, sugiere que los macrófagos productores de IP-10/CXCL10 son mediadores de la regeneración y resolución de la necrosis tubular, mientras que la fibrosis intersticial se ha relacionado con la acción de CXCR1 (receptor fractalquina) de los macrófagos. Los macrófagos fenotipo M1 se asocian a la inflamación y necrosis renal y los M2 se relacionan con la remodelación del tejido y efectos profibróticos del riñón. De hecho, los M1 se caracterizan por la producción de citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mientras que los M2 se relacionan con la excreción de IL-10, TGF-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Es decir, la progresión del fenotipo inflamatorio M1 al fenotipo de curación de heridas/profibrótico induce la progresión de la fase inflamatoria a la fase de reparación. La desregulación de los M2, potencialmente inclinaría al aumento de colágeno I y III que participan en el proceso fibrótico. Probablemente el desequilibrio de la concentración de macrófagos M1 y M2 en el microentorno renal podría contribuir al desarrollo de las lesiones renales fibróticas de la ECR observadas en casos humanos de leptospirosis<sup>32, 55, 56</sup>.

## 5.5. Cuadro clínico

El cuadro clínico es muy variable y depende de diversos factores: el serovar, la especie animal, la edad, la respuesta inmune del hospedador, la virulencia y la dosis infectante<sup>1, 51</sup>.

Los signos clínicos típicos de leptospirosis en el perro son: pirexia, vómitos, diarrea, apetito alterado, dolor abdominal, temblor, debilidad muscular, deshidratación, oliguria, anuria (a veces poliuria o polidipsia), shock, taquicardia, arritmias, letargo, trastornos hemorrágicos, tos, disnea o taquipnea, ictericia, encefalopatía hepática, conjuntivitis, vasos congestivos en la esclerótica y uveítis<sup>60</sup>.

En el perro se producen 4 tipos de síndromes: icterico, hemorrágico, urémico (enfermedad de Stuttgart) y reproductivo (abortos o cachorros prematuros o débiles). La forma aguda clínica típica: fiebre, ictericia, vómitos, diarrea, CID, uremia por el fallo renal, hemorragias y muerte<sup>1</sup>

Ha habido casos de perros con hepatitis granulomatosa crónica que podría estar asociada a la presencia de leptospiras en el hígado, sin evidencias clínicas ni afección renal. Se realizó la técnica FISH (Fluorescence in situ Hybridization) en muestras de hígado para confirmar la presencia de *Leptospira spp* en 10 perros de entre 2,8 y 10 años de edad. En 8 de ellos se identificaron agrupamientos de Leptospiras (indicando replicación), y en los otros 2 se identificaron leptospiras aisladas y otras especies bacterianas. Con histología se confirmó la hepatitis granulomatosa. No está claro si las leptospiras son la causa primaria de ésta, ocurren secundariamente a la hepatitis crónica o son el desencadenante de una enfermedad hepática crónica inmunomediada. En conclusión, las leptospiras deben ser consideradas como una causa potencial de hepatitis granulomatosa incluso en perros vacunados, sin evidencias de disfunción renal o sin seroconversión<sup>58</sup>.

En un estudio se hicieron ecografías abdominales a 35 perros entre los años 2013 y 2015 con Leptospirosis confirmada para ver si la enfermedad causa alteraciones en los órganos observables en la ecografía. En todos los pacientes hubo al menos una anomalía ecográfica a nivel renal, hepático o en la vesícula biliar, de hecho el mucocele en la vesícula biliar puede ser un signo de leptospirosis en perros. Parece no haber asociación entre serogrupos y los distintos hallazgos ecográficos. Por ello es importante que se hagan ecografías sistemáticas a todos los perros sospechosos de tener leptospirosis incluso aunque no tengan signos clínicos<sup>78</sup>.

En el ganado vacuno y en cerdos los signos clínicos incluyen fallo renal, abortos, mortinatos, fetos momificados o lechones o terneros débiles y agalaxia<sup>1</sup>.

En los gatos la leptospirosis es menos frecuente y no suelen desarrollar cuadros clínicos, si bien se han informado en gatos que conviven con perros de caza o que viven en ambientes muy contaminados y muestran seroconversión tras la infección, en especial frente al serogrupo Serjoë. Se han mostrado resultados positivos de serología en gatos, con una prevalencia de hasta el 35% en diferentes países, y también positividad en PCR de sangre y orina, lo que indica que podría haber portadores subclínicos. Algunos gatos desarrollan leptospirosis clínica con insuficiencia renal que puede acabar en fallo renal. Es importante incluir la leptospirosis en el

diagnóstico diferencial de gatos, especialmente en gatos que salen fuera de casa y cazan, con síntomas como vasculitis, aumento del ratio albúmina/globulina, fallo renal, poliuria polidipsia, uveítis, y para detectar posibles portadores asintomáticos<sup>6</sup>.

En las personas muestra un amplio espectro de gravedad, desde formas autolimitantes leves a enfermedad sistémica (en el 90% de los casos), y una forma grave, potencialmente mortal en la que se combinan el fallo renal, hepático y neumonía<sup>37</sup>. Los humanos suelen padecer la forma aguda de la enfermedad y ésta puede dejar secuelas a largo plazo<sup>1</sup>. Los cuadros clínicos se pueden clasificar en<sup>1</sup>: Enfermedad leve o pseudogripal; Enfermedad de Weil (ictericia, fallo renal agudo y hemorragias); Meningitis o meningoencefalitis; Hemorragia pulmonar y fallo respiratorio. Las formas graves de leptospirosis humana son por la infección con los serovares Icterohaemorrhagiae y Copenhageni (en Europa) y Lai (en el sudeste asiático) entre otras. La enfermedad empeora rápidamente y la insuficiencia renal puede ocurrir dentro de los 7 a 10 días postinfección, a veces acompañada o seguida de hemorragias en la piel y la mucosa, ictericia, hemoptisis, hemorragias pulmonares o insuficiencia hepática, lo que lleva a la muerte si no se trata<sup>1</sup>. Evoluciona en dos fases, una *fase septicémica* seguida del descenso de la fiebre, y posteriormente una *fase inmune* en la que los síntomas son graves, aunque muchos pacientes manifiestan únicamente el inicio de la segunda fase. En la *fase septicémica aguda*, tras 5 a 14 días de incubación, aparece bruscamente fiebre alta (38 a 40°C), con dolor de cabeza, escalofríos, mialgia, sufusión conjuntival, dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, tos, faringitis, leve proteinuria, piuria y raramente, erupción maculo-papular. Evoluciona en 5 a 7 días y no suele ser mortal. La *fase inmune* puede prolongarse de 4 a 30 días, no hay leptospiremia ni se detecta en el LCR y coincide con la aparición de las IgM<sup>37</sup>, pero se detecta en la mayoría de los tejidos. Además de los síntomas anteriores, se puede observar ictericia, fallo renal, arritmias, síntomas pulmonares, meningitis, sufusión conjuntival con o sin hemorragias, fotofobia, dolor ocular, debilidad muscular, adenopatía, hepato-esplenomegalia, dolor abdominal y abortos en mujeres gestantes. Éste es el cuadro más frecuente que caracteriza a la “Enfermedad de Weil”. En los casos más graves el paso de la fase aguda a la fase inmune es fulminante. La mortalidad varía del 5% al 40% según el área geográfica<sup>37</sup>.

Las lesiones son: cambios degenerativos de los hepatocitos, células Kupffer hipertrofiadas, colestasis, nefritis intersticial aguda, glomerulonefritis por depósito de inmunocomplejos, infiltrado difuso de células inflamatorias en región tubulointersticial, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares; pulmones muy congestivos y con focos de hemorragia intersticial e intra-alveolar; miocarditis, arteritis.

El síndrome de hemorragia pulmonar leptospiral (LPHS, siglas en inglés), es la manifestación más grave de la enfermedad y puede darse tanto en perros como en humanos. Puede

provocar una hemorragia pulmonar fulminante y mortal. Los mecanismos patogénos no están del todo claros, se hipotetiza que la LPHS es causada por un aumento en la permeabilidad alveolar provocada por las leptospiras patógenas en las células endoteliales del hospedador, las cuales se unen a moléculas específicas (como las VE-Cadherinas), y son capaces de inducir cambios en la expresión de las proteínas estructurales y de adhesión del hospedador<sup>25, 37</sup>.

## 5.6. Diagnóstico

**Clínico:** no hay síntomas y/o signos clínicos ni lesiones específicas de esta enfermedad.

**Laboratorial:** El diagnóstico laboratorial de la leptospirosis es complejo. Las muestras para el aislamiento y detección de las leptospiras<sup>54</sup> se pueden tomar de:

-In vivo, líquidos corporales: si se trata de animales con signos clínicos de la fase aguda se recoge sangre, orina, leche (en ganado doméstico), líquido cefalorraquídeo, torácico y peritoneal. La orina y la sangre deben recogerse antes de iniciar el tratamiento antibiótico. En el caso de la infección crónica, muestras de la madre, el feto y los fluidos del aborto.

-Muestras post mortem: hígado, pulmón, cerebro, riñón.

Hematología y bioquímica: en el *perro* se aprecia leucocitosis, aunque también se observa leucopenia en fase leptospirémica aguda; trombocitopenia de moderada a grave y anemia, consecuencia de las hemorragias, hemólisis o secundaria a la inflamación crónica. Puede mostrar coagulación intravascular diseminada (CID). Además, aumento de urea y creatinina (azotemia), ALT (alanina aminotransferasa) y ALP (fosfatasa alcalina), hipercalcemia, hiperfosfatemia, hiperbilirrubilemia, hipocalcemia o hipercalcemia, hipoalbuminemia<sup>60</sup>.

Urianálisis: isostenuria, glucosuria, hematuria, proteinuria, piuria.

Las pruebas laboratoriales pueden ser directas e indirectas. Las directas tienen como objetivo el aislamiento de las leptospiras y la detección de sus antígenos o los ácidos nucleicos, y las indirectas detectan los anticuerpos antileptospiras<sup>54</sup>.

### **Métodos directos:**

1) Aislamiento: debe realizarse por personal experimentado, a partir de muestras frescas (en fase de leptospiremia), evitando su contaminación. Se utilizan medios específicos y selectivos como el EMJH, de cultivo complejo y lento (29°C, mínimo 16 semanas). Cada 1 ó 2 semanas se examinan en microscopio de campo oscuro<sup>54</sup>. La sensibilidad y especificidad son bajas, hay muchos falsos positivos y negativos y no se recomienda como técnica única para el diagnóstico de leptospirosis. Se necesitan concentraciones de más de 10<sup>4</sup> leptospiras/ml para poder observarlas<sup>51</sup>.

2) PCR (reacción en cadena de la polimerasa): detecta el ácido nucleico de las leptospiras en los tejidos o fluidos corporales. Permite realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad. La

PCR cuantitativa (q-PCR) es más rápida que la clásica y por tanto menos sensible a la contaminación<sup>67</sup>. Las pruebas se clasifican en dos grupos en función de si se detectan los genes que están siempre presentes en la bacterias, como *gryB*, *rrs* y *secY*, o genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira*, como *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA*. Muchos de los conjuntos de cebadores de la PCR se han diseñado y evaluado para ser utilizados en muestras humanas y no animales, y no existe acuerdo sobre los que deben utilizarse en muestras de animales, aunque los más indicados se basan en el gen *lipL32*. Pueden presentarse falsos positivos por contaminación de la muestra y falsos negativos por la excreción intermitente. El procesamiento de la muestra para PCR y el control de calidad es decisivo y debe ser adecuado para el tejido, el líquido y la especie que se esté analizando<sup>54, 62</sup>.

3) IFD: su éxito depende del número de microorganismos presentes en la muestra, por lo que su utilidad para detectar portadores crónicos es escasa ya que el número de microorganismos es muy bajo o localizado. Las técnicas inmunohistoquímicas se realizan con tejidos de animales muertos<sup>54</sup>.

4) MALDI-TOF: actualmente, son pocos los laboratorios que pueden disponer de esta técnica, es costosa y en ocasiones no diferencia bien especies muy similares entre sí, aunque sí diferencia cepas patógenas de no patógenas<sup>44</sup>.

#### **Métodos indirectos:**

Las pruebas serológicas son el método más utilizado para el diagnóstico de la leptospirosis, y la prueba de micro-aglutinación (MAT) es la prueba serológica estándar.

1) MAT (prueba de microaglutinación): es la prueba de referencia con la que se evalúan las demás pruebas serológicas. Es obligatoria para la importación/exportación de animales. Se realiza con antígenos vivos, y representa un riesgo para el personal de laboratorio<sup>54</sup>.

La sensibilidad de la prueba depende de los antígenos usados, que deben ser representativos de todos los serogrupos conocidos que existen en la región donde se trabaja<sup>54</sup>.

En Europa se recomienda incluir los serogrupos *L.Australis*, *L.Grippotyphosa*, *L.Canicola*, *L.Icterohaemorrhagiae*, *L.Sejroe* y *L.Autumnalis* en el panel<sup>60</sup>. Se puede mejorar la sensibilidad utilizando aislamientos locales junto a los de referencia, que ayudan en la comparación de los resultados entre los laboratorios. La especificidad de la MAT es alta al no presentar reacción cruzada significativa con los anticuerpos frente a otras bacterias, aunque sí que existen entre serovares y serogrupos de *Leptospira*. En consecuencia, no puede utilizarse para identificar el serovar en una infección individual o en un brote, y requiere el aislamiento del agente. Además, los animales vacunados pueden tener anticuerpos frente a los serotipos presentes en la vacuna utilizada y dar reacciones cruzadas en la MAT por lo que es importante considerar el historial de vacunación de los animales.

A efectos del comercio internacional se considera positivo un título de 1/100, pero dada su alta especificidad, pueden tomarse títulos menores como indicio de exposición previa a *Leptospira*. En un animal individual, la MAT es muy útil en el diagnóstico de la infección aguda. Tiene valor diagnóstico la demostración del aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos en muestras pareadas de sueros: la primera recogida en la fase aguda y la segunda en la fase convaleciente<sup>54</sup>. El método detallado de la MAT está descrito en el manual de la OIE 2018 para estandarizar el método entre laboratorios<sup>54</sup>. Es muy importante comprobar periódicamente la identidad y la pureza de los antígenos, preferiblemente cada vez que se realiza la prueba o al menos 2 veces al año. El esquema anual internacional de eficiencia de la MAT puede consultarse en la web de la Sociedad Internacional de Leptospirosis ([http://leptosociety.org/proficiency\\_testing](http://leptosociety.org/proficiency_testing)).

2) ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): el tipo de antígeno utilizado en la técnica ELISA determina su especificidad. Se han elaborado con células enteras, con OMPs de la bacteria o recombinantes, que detectan anticuerpos frente a las leptosiras patógenas, mientras que los antígenos basados en lipopolisacáridos (LPS) son específicos de serogrupo y son útiles en los estudios epidemiológicos y programas de control. Los que detectan IgM sirven en el diagnóstico de la infección aguda<sup>54</sup>. Recientemente se han usado antígenos de *Leptospira fainei* (grupo intermedio) para el diagnóstico temprano de leptospirosis humana (sensibilidad 94% y especificidad 100%), que se pueden utilizar también para el diagnóstico de la infección aguda en perros, con una sensibilidad de 95,6% y especificidad de 93%<sup>63</sup>.

3) Otras técnicas: Fijación del complemento, Inmunoelectroforesis, Inmunofluorescencia indirecta, Inhibición de la hemoaglutinación (IHA), lisis de eritrocitos sensibilizados, aglutinación al látex, aglutinación con microcápsulas. La aglutinación en placa con L. Patoc (apatógena), se desarrolló para simplificar el diagnóstico en las personas, incluso hay test rápidos de sondeo, (sistema inmunodot o detección en tiras), que se desarrollan en 30 minutos y no requieren refrigeración. La Inmunocromatografía de flujo lateral no requiere equipos especiales para detectar la positividad (aparición de una línea coloreada junto a otra línea control), y se desarrollan en 15 minutos. Dependiendo del test, se usa sangre, suero o plasma<sup>61</sup>. Estas pruebas detectan IgM hasta 2 semanas tras el comienzo de los síntomas, solo son útiles en la fase aguda. La sensibilidad puede ser baja (60%) dependiendo de la endemicidad de la infección y es muy variable de unos test a otros (el más bajo con la IHA respecto a la MAT). En un estudio comparativo, se concluyó que ninguno de los test rápidos es capaz de diagnosticar en la primera semana de la enfermedad (en Hawaii)<sup>61</sup>.

En los perros, cuando ya no es momento para realizar la PCR ni se puede confirmar con MAT, o en perros vacunados que se han infectado posteriormente (con resultados de MAT

confusos), se puede realizar el PP-ELISA, que detecta anticuerpos contra el péptido PP, derivado de Hap1/Lipl32 (antígeno lipoproteínico específico de leptospiras patógenas) y obtenido sintéticamente. Así se obtiene una sensibilidad del 96.4% para IgM y del 95.5% para IgG y proporciona un diagnóstico inmediato de leptospirosis<sup>4</sup>.

El **diagnóstico en el perro y en las personas** puede resumirse de éste modo:

-Perros: se recomienda realizar conjuntamente la técnica MAT y la q-PCR en sangre, orina u órganos (post mortem). En la infección aguda, la técnica MAT puede dar títulos negativos en la primera semana de la infección ya que aún no hay anticuerpos. Por otro lado, los anticuerpos de los animales vacunados confunden su interpretación, incluso puede haber títulos positivos de exposiciones anteriores a cepas patógenas. La q-PCR puede ser positiva en la primera semana de enfermedad en la sangre (leptospiemia) y tras la vacunación. Posteriormente será positiva en la orina coincidiendo con la aparición de los Acs en el suero, por lo que ambas técnicas pueden ser complementarias. La q-PCR permite el diagnóstico de la leptospirosis antes que la MAT, siempre que el animal no haya recibido tratamiento con antibióticos antes de recoger las muestras de sangre y orina<sup>41</sup>. La forma crónica de la Leptospirosis canina hace que numerosos perros sean portadores asintomáticos, manteniendo la bacteria en los túbulos renales y eliminándola en la orina durante largos periodos de tiempo. En Brasil se han estudiado perros con ERC y se han detectado más excretores (75%) de leptospira en la orina que en los que no tenían ERC (20.8%), demostrando que la infección asintomática por leptospiras está asociada con la ERC<sup>74</sup>. En los perros con leptospirosis no hay consenso sobre qué título debe usarse como límite para dar un resultado negativo con la MAT<sup>79</sup>. Por ésta razón, una sola muestra de suero no tiene valor diagnóstico, y se deben hacer varias a lo largo del transcurso de la enfermedad (2 ó 3 extracciones separadas 7-10 días), para demostrar seroconversión. Así se ha establecido un umbral de títulos orientativos en el perro<sup>8</sup>:

≤1/1800: demostrar seroconversión positiva en 7-10 días

≥1/1600 leptospirosis muy probable si no está vacunado, si está vacunado demostrar seroconversión positiva en 7-10 días

≥1/6400 leptospirosis muy probable

La eficacia del tratamiento se puede confirmar por el descenso a 1/1200 en 1 a 4 meses.

Los falsos negativos ocurren si el serovar infectante no está incluido en el panel de la MAT: en los perros se utilizan unos 5-7 serovares<sup>79</sup>. No detectar leptospiras en la orina de un animal no es suficiente para descartar que sea portador renal crónico, sólo indica que el animal no excretaba cantidades detectables de leptospiras en el momento del examen<sup>54</sup>.

Las pruebas rápidas que detectan las IgM y/o IgG para su uso en la clínica, se usan para la detección de la forma aguda en perros con signos clínicos, hemáticos y renales, sospechosos de ésta infección. El resultado negativo debe ser confirmado por MAT y qPCR<sup>82</sup>.

-Personas: la técnica MAT es la prueba estándar y puede ser positiva a los 10-12 días tras el inicio de la enfermedad (41% en la 1ª semana, 82% en la 2ª a 4ª semana y 96% posteriormente), o más tarde si reciben tratamiento antibiótico (se pueden elegir paneles de hasta 420 serovares). El título mínimo para considerar la infección es variable, desde 1/100 en zonas no endémicas a 1/400 en zonas endémicas<sup>61</sup>. Hay test ELISA comercializados. El punto de corte de la positividad se estandariza de acuerdo a los criterios seguidos por la MAT. Suele ser positivo a partir de 6-8 días (antes que el MAT) y también puede ser negativo antes. Numerosos tests comerciales llevan antígenos de *L. biflexa patoc* (apatógena). Permite la detección de IgM, y los positivos deben confirmarse por MAT. La qPCR para detectar el gen que codifica para el LipL32 es la única que detecta la infección en los primeros días de enfermedad y es sensible y específica<sup>73</sup>. La principal barrera es que todos los países no disponen de los medios suficientes para llevarla a cabo, que coincide con los países en los que la infección es endémica. En la segunda semana de la enfermedad, se debe recurrir al diagnóstico serológico por detección de IgM, si no se puede realizar el MAT, se pueden usar test rápidos<sup>61</sup>.

## 5.7. Tratamiento

El tratamiento debe realizarse en función de la gravedad de los síntomas. Como puede afectar a una gran cantidad de órganos, debe estar basado en la evaluación clínica y clínico-patológica de cada paciente, y consistirá en la aplicación de antibióticos y tratamiento de soporte según los órganos afectados. Los antibióticos de elección en perros y humanos con leptospirosis han sido tradicionalmente las penicilinas y la doxiciclina. Las leptospiras son resistentes al Cloranfenicol y las Cefalosporinas de primera generación son menos efectivas.

-Terapia antimicrobiana (en perros): hay que empezarla cuanto antes, en caso de sospecha, incluso antes de tener confirmación laboratorial de la enfermedad, para evitar la muerte del animal (si hay signos clínicos graves), y el riesgo de transmisión zoonótica<sup>75</sup>. El panel de consenso de la ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine) recomienda: Doxiciclina 5 mg/kg/12 horas o 10mg/kg/24 horas durante 2 semanas vía oral o intravenosa. Si hay vómito u otra reacción adversa se puede cambiar la doxiciclina por ampicilina 20 mg/kg/6 horas vía IV, o Penicilina G 25000-40000 UI/kg/12 horas vía IV. Tras la remisión de los síntomas gastrointestinales es conveniente administrar doxiciclina durante dos semanas para eliminar las bacterias de los túbulos renales e impedir así que el animal quede como portador<sup>79</sup>.



-Tratamiento del fallo renal agudo/ AKI (acute kidney injury): fluidoterapia para corregir los desórdenes electrolíticos y ácido-base. Diálisis o hemodiálisis indicada en perros con anuria severa, que no responden al tratamiento médico<sup>79</sup>.

-Otros: tratamiento de signos gastrointestinales con antieméticos y gastroprotectores; tratamiento hepático de soporte y tratamiento del síndrome hemorrágico leptospiral: de soporte, oxigenoterapia y si es necesario, ventilación mecánica<sup>79</sup>.

La OMS recomienda el uso de antibióticos en las personas, a pesar de que no está claro que se acorte la duración de la enfermedad. El tratamiento suele durar unos 7 días, aunque su duración óptima es desconocida. En las personas Ceftriaxona y Cefotaxime (antibióticos de tercera generación) son tan eficaces como la Penicilina. En fases avanzadas de la enfermedad grave, los beneficios de los antibióticos no quedan claros. Ésta forma se suele tratar con penicilina intravenosa mientras que la forma leve se trata con doxiciclina oral<sup>37</sup>.

## **5.9. Prevención y control**

Las medidas de prevención y control de la leptospirosis canina van encaminadas a evitar la transmisión a la especie humana y la diseminación de leptospirosis en el medio<sup>48</sup>.

### **Profilaxis higiénico-sanitaria**

Recomendaciones de la OMS para la prevención de leptospirosis<sup>87</sup>: La leptospirosis es una enfermedad de difícil erradicación, debido a la gran cantidad de serovares, de fuentes de infección y de animales reservorios. La prevención de la leptospirosis debe estar enfocada a:

a) Medidas de control de la fuente de infección: conocer las especies *reservorios* de la zona geográfica en cuestión; *reducir* si es posible las poblaciones de animales reservorios como los roedores; *separar a los reservorios* de las poblaciones humanas con métodos físicos: vallas, muros...; mantener *limpias las zonas verdes, retirar basuras, no dejar restos de comida* en los parques...; *vacunar* a los perros y al ganado doméstico

b) Medidas para interrumpir la transmisión: *evitar el contacto con ambientes contaminados* con orina de los animales reservorios; utilizar *ropa apropiada, cubrir las heridas* con material resistente al agua si va a haber una exposición potencial, como por ejemplo en actividades de ocio al aire libre acuáticas

c) Medidas para proteger a la población humana: *Sensibilizar a la población* para que conozca cuáles son los factores de riesgo de contraer la enfermedad, los reconozca con facilidad y ser tratada cuanto antes; en algunos países hay *vacunas* disponibles; los *veterinarios tienen que informar a los propietarios* sobre las medidas correctas de higiene a seguir en caso de que sus mascotas tengan leptospirosis, además de llevarlas a cabo en las clínicas u hospitales: limpieza y desinfección, aislamiento de los pacientes, evitar el contacto con otros animales...<sup>60</sup>.

Según el CDC (Centers for Disease, Control and Prevention), la forma más importante de prevenir la leptospirosis es evitar tocar o beber agua que pueda estar contaminada con orina de animales reservorios. Se pueden consultar las medidas recomendadas para proteger a la población en su página web.

### **Profilaxis médica → Vacunas**

Desde los años “20” se han usado vacunas para animales y personas, prácticamente todas inactivadas de la bacteria completa. Las vacunas inactivadas y atenuadas tienen problemas graves de eficacia y seguridad, actualmente están libres de proteínas extrañas del cultivo para aumentar su seguridad<sup>1</sup>. Las inactivadas podrían mejorar con adyuvantes, y las atenuadas deberán mejorar su seguridad atenuando genes de virulencia. Se ha propuesto combinar las inactivadas y atenuadas para aumentar su efectividad, aunque no ha prosperado. Las nuevas tecnologías permiten estudiar diferentes antígenos, generalmente relacionados con la patogenia de la enfermedad, con la finalidad de encontrar vacunas más seguras y eficaces. Las proteínas recombinantes relacionadas con la patogenia de la enfermedad (OMPL1, LipL41, LipL32, LipL45, LipL21, Hap1, LigA, LigB, factores de virulencia como FlaA y FlaB, de los flagelos periplásmicos y Hsp58, o las hemolisinas SphH y ChpK), son muy interesantes de cara a las nuevas vacunas. Se ha estudiado alguna vacuna de ADN como la del gen de la endoflagelina (*flaB2*) en animales de laboratorio, sin resultados apreciables. Otra opción considerada de cara a mejorar las vacunas, es la utilización vías de administración tópica (mucosas y piel)<sup>1, 59, 83</sup>.

En general, los estudios realizados con diversos antígenos y adyuvantes (sales de aluminio, emulsiones agua en aceite, saponinas, chitosan, etc), parece que no muestran consenso en la mejora de su eficacia. El modelo animal de estudio podría influir en los resultados. El modelo hámster, uno de los más usados da resultados contradictorios ya que el grupo control suele sobrevivir al desafío virulento, pero el gran problema es la falta de especificidad de los anticuerpos. Algunos adyuvantes ejercen un papel inmunomodulador. Esto parece estar influido por la capacidad de combinación del antígeno con el adyuvante. Por otro lado un alto título de anticuerpos no siempre se relaciona con protección y además, el perfil de citoquinas no desvela los mecanismos inmunes involucrados en la protección<sup>59, 80</sup>.

Actualmente, las vacunas para uso veterinario contienen uno o más serogrupos patógenos de la bacteria completa inactivada. Hay vacunas disponibles a nivel mundial para perros, ganado vacuno y cerdos. El uso de las vacunas en los animales tiene como objetivo protegerlos a ellos y también a las personas que están en contacto con ellos, son una herramienta importante en los programas de control. Los programas de vacunación tienen que adaptarse a cada población en concreto, siendo lo ideal vacunar antes de la posible exposición y tras ello, anualmente antes de esas épocas<sup>1, 54</sup>.

La protección es parcialmente eficaz, tanto en las personas como en los animales, ya que hay una gran cantidad de serogrupos circulantes, y no hay protección cruzada entre los que contienen las vacunas y el resto de serovares que pueda haber en el ambiente. La vacunación puede prevenir la enfermedad, pero conseguir un alto título de anticuerpos no es garantía de evitar la infección y desarrollar portadores renales. Confieren cierto grado de protección frente a los serovares más prevalentes en la zona que son los que se incluyen en la vacuna, lo cual es especialmente importante en zonas donde hay formas graves y acceso limitado a atención médica. En ganado bovino, las revacunaciones pueden realizarse cada 3 meses, en zonas de alto riesgo<sup>1, 54, 79, 80, 83</sup>.

Vacunación en perros: en Europa, Norte América, Sudáfrica y Australia hay disponibles vacunas bivalentes con los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Canicola; trivalentes y tetravalentes (con serogrupos Grippotyphosa y/o Australis). Los fabricantes demuestran, experimentalmente, protección de un año frente a la infección cuando se administran dos vacunas separadas 3 ó 4 semanas y recomiendan la revacunación anual, aunque en campo se han producido portadores renales vacunados<sup>45, 83, 86</sup>. Es una vacuna no esencial aunque se recomienda en todos los perros, sea cual sea su estilo de vida. Es difícil que un perro no tenga nunca acceso al aire libre, a fuentes de agua no controladas, como lagos, ríos, charcos, u otras áreas que puedan estar contaminadas. En perros que viven en ciudad también se dan casos de leptospirosis, probablemente porque entran en contacto con orina de roedores u otros animales salvajes nocturnos y otros perros. También se recomienda que la vacunación sea más frecuente en perros con mayor riesgo de exposición, como perros de caza y perros que vivan en regiones con mayor prevalencia y en épocas templadas y lluviosas<sup>45</sup>.

Se suelen administrar junto a virus vivos atenuados del Moquillo canino, Parvovirus, Adenovirus canino tipo 2 y virus Parainfluenza canino, ya sea con 2, 3 ó 4 serogrupos de leptospira inactivados (polivalente). Las pruebas experimentales realizadas por los fabricantes en perros de 6 semanas de edad que recibieron dos dosis de vacuna polivalente junto a 4 serogrupos de leptospira, separadas 3 semanas, mostraban anticuerpos frente a Leptospira a los 21 días de la primera vacunación y alcanzaban el máximo entre 3 a 6 semanas después de la segunda. Los títulos disminuían durante los siguientes 12 meses<sup>45, 86</sup>.

Vacunación en humanos: Las vacunas para personas solo se han usado en Cuba, Francia y China, Japón y Vietnam, tras inundaciones. Se debe revacunar anualmente. La ingeniería genética podría ofrecer nuevas alternativas en la vacunación, aunque en estas vacunas. Las vacunas de subunidades se consideran más seguras y menos tóxicas que las inactivadas, pero no se conocen las moléculas clave que consigan dar una respuesta inmune adecuada. Las

vacunas inactivadas solo provocan respuesta inmune frente a lipopolisacáridos, y su duración es escasa<sup>1, 59, 80, 83</sup>.

## **6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**

1-La tendencia en la clasificación de leptospiras es la unificación de los métodos serológicos y genéticos, que en el momento actual no se ha conseguido. Los 300 serovares de leptospiras conocidos siguen evolucionando, y es difícil registrar todas las cepas existentes

2-La patogenia sigue siendo una incógnita en muchos de sus aspectos a pesar de los avances de la biología molecular. No se observa una variación del comportamiento patógeno de las leptospiras en la especie humana ni en los animales

3-La leptospirosis sigue siendo una infección infradiagnosticada en las personas y en los animales. La biología molecular promete mejorar el diagnóstico, pero no llegan a los países en vías desarrollo, no diferencian bien las formas subclínicas y necesita la técnica MAT

4-La prevención, la educación higiénico-sanitaria y el control de los principales reservorios son esenciales y la vacunación es el complemento necesario, aunque aún queda un largo camino para conseguir vacunas eficaces

Conclusions:

1-The trend on Leptospire classification is the serological and genetic methods unification, which has not been achieved yet. The 300 serovars of leptospire known are still evolving. It is difficult to keep track of all existent strains

2-Most pathogenic aspects remain unknown despite advances in molecular biology. None leptospire pathogenic behaviour changes are observed in humans and animals

3-Leptospirosis is still an underdiagnosed infection in both, people and animals. Molecular biology attempts to improve diagnosis, but it does not reach to developing countries. It also does not provide a clear difference among subclinical forms, and the MAT is still required

4-Preventive measures, hygienic-sanitary education and control of the main reservoirs are essential and vaccination is the necessary complement, but there is still a long way to achieve effective vaccines

## **7. VALORACIÓN PERSONAL**

Mi objetivo con este trabajo era el de profundizar en el conocimiento de esta enfermedad que está presente en todo el mundo y cada vez más en Europa. He aprendido a hacer búsquedas

bibliográficas de calidad, a utilizar recursos informáticos que no conocía, a sintetizar la información y a trabajar de manera ordenada. He pretendido hacer un resumen de todos los datos más relevantes sobre la leptospirosis para que quien lo deseé pueda consultar de manera rápida qué se debe hacer ante un caso sospechoso, qué medidas preventivas se pueden tomar, la frecuencia de vacunación, etc. Por último, agradecer a mi tutora María Carmen Simón, por haber estado siempre disponible y dispuesta a ayudarme.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 140(3-4): 287-96.
2. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol.* 2011; 153(1-2): 73-81.
3. Ahmed N, Devi SM, Valverde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006; 5: 28.
4. Andre-Fontaine G, Aviat F, Marie JL, Chatrenet B. Undiagnosed leptospirosis cases in naïve and vaccinated dogs: Properties of a serological test based on a synthetic peptide derived from Hap1/LipL32 (residues 154–178). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015; 39: 1-8.
5. Baril C, SaintGironsl. Sizing of the *Leptospira* genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 59 (1-2): 95-9.
6. Beaudu-Lange C, Lange E. Unusual clinical presentation of Leptospirosis in a cat. *Revue Veterinaire Clinique.* 2014; 49:115-22.
7. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3:757-71.
8. Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a re-emerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1996; 11 (3): 166-71.
9. Bourhy P, Frangeul L, Couve E, Glaser P, Saint Girons I, Picardeau M. Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. *J Bacteriol.* 2005; 187(12): 3931-40.
10. Boursaux-Eude C, Saint Girons I, Zuerner R. *Leptospira* genomics. *Electrophoresis.* 1998; 19 (4): 589-92
11. Brehm T, Wiesch JS, Lütgehetmann M, Tappe D, Eisermann P, Loshe AW, *et al.* Epidemiology, clinical and laboratory features of 24 consecutive cases of leptospirosis at a German infectious disease center. *Infection.* 2018; 46: 847-53.

12. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49 (2): 839-58.
13. Caimi K, Repetto A, Varni V, Ruybal P. *Leptospira* species molecular epidemiology in the genomic era. *Infect Genet Evol.* 2017; 54:478-85.
14. Chapman AJ, Adler B, Faine S. Genus-specific antigens in *Leptospira* revealed by immunoblotting. *Zentbl Bakteriol.* 1987; 264 (3- 4): 279-93.
15. Cinco M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of hostdefences. *New Microbiol.* 2010. 33(4): 283-92.
16. Comité de Taxonomía de *Leptospira*, de la Unión de Sociedades Microbiológicas Internacional. Disponible en[ <https://www.leptosociety.org/resources> ]
17. Costa F, Hagan J, Calcagno J, Kane M, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9:238-98.
18. Darian EK, Forghanifard MM, Bidhendi SM, Chang YF, Yahaghi E, Esmaelizad M, et al. Cloning and sequence analysis of LipL32, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* spp. *Iran Red Crescent Med J.* 2013; 15(11).
19. De la Peña-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovarHardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjo prajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjo bovis. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 177 (2): 319-26.
20. Du P, Li SJ, Ojcius DM, Li K-X, Hu W-L, Lin X, et al. A novel Fas-binding outer membrane protein and lipopolysaccharide of *Leptospira interrogans* induce macrophage apoptosis through the Fas/FasL-caspase-8/-3 pathway. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7:135.
21. Ellis WA. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec.* 2010; **167**:602-5.
22. El-Tras WF, Bruce M, Holt HR, Eltholth MM, Merien F. Update on the status of leptospirosis in New Zealand. *Acta Tropica.* 2018; 188:161-7.
23. Everard COR, Jones CJ, Inniss VA, Carrington DG, Vaughan AW. Leptospirosis in dogs on Barbados. *Isr J Vet Med.* 1987; 43: 288-295.
24. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. (1999). *Leptospira* and Leptospirosis. MediSci. Melbourne, Australia
25. Fang J-Q, Imran M, Hu W-L, Ojcius DM, Yan J. vWA proteins of *Leptospira interrogans* induce hemorrhage in leptospirosis by competitive inhibition of vWF/GPIIb-mediated platelet aggregation. *E Bio Med* 37. 2018. 428–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.033>

26. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcellos SA, et al. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun*. 2012; 80(10): 3679-92.
27. Fernández LA, Arencibia DF, Batista N, Jirón W, Valdés BY, Suárez YE, et al. Leptospirosis, una revisión actualizada. *Vet Arg*. 2012; 29(291).
28. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg D.E, et al. What makes a bacterial species pathogenic? comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2016; 10, e0004403.
29. Fraser T, Brown PD. Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. *Front Microbiol*. 2017; 8:783.
30. Fukunaga M, Mifuchi I. The number of large ribosomal RNA genes in *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa*. *Microbiol Immunol*. 1989; 33 (6): 459-66.
31. Fukunaga M, Mifuchil. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. *J Bacteriol*. 1989; 171 (11): 5763-67.
32. Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. 2009; 13: 9.
33. Garba B, Bahaman AR, Bejo SK, Zakaria Z, Mutalib AR, Bande F. Major epidemiological factors associated with leptospirosis in Malaysia. *Acta tropica*. 2018; 178: 242-7.
34. García-González R, Reyes-Torres A, Basilio-Hernández D, Ramírez-Pérez, M, Rivas-Sánchez B. Leptospirosis; un problema de salud pública. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2013; 60(1).
35. Greene CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstaein RE, Schultz RD. Leptospirosis. En: Greene, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Cuarta Edición. Elsevier Inc. Saunders. 2012. ISBN 978-1-4160-6130-4.
36. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, et al. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infect Immun*. 2000; 68 (4): 2276-85.
37. Haake DA, Levett PN. *Leptospira* Species (Leptospirosis). En: Bennett JE, Dolin R, Blaser M.J, editores. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Octava edición. Canadá: Elsevier. 2015. Cap 241. ISBN 978-1-4557-4801-3.
38. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsu-naga J, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*. 1999; 67 (12): 6572-82.

39. Hartskeerl R.A, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and reemerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17:494-501.
40. Hsu SH, Lo YY, Tung JY, Ko YC, Sun YJ, Hung CC, et al. Leptospiral outer membrane lipoprotein LipL32 binding on toll-like receptor 2 of renal cells as determined with an atomic force microscope. *Biochemistry.* 2010; 49(26): 5408-17.
41. Hugonnard M. Apports comparés de la sérologie et de la PCR dans le diagnostic de la leptospirose canine. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie.* 2012; 47: 111-17.
42. Hyde FW, Johnson RC. Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira* spp. *J Clin Microbiol.* 1984; 20 (2): 151-4.
43. Jansen A, Schneider T. Weil's disease in a rat owner. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(2):152.
44. Karcher D, Grenfell RC, Moreno AM, Moreno LZ, Vasconcellos SA, Heinemann MB, et al. Identification of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species of Brazilian isolates by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization and Time Flight mass spectrometry. *Rev Bras Epidemiol.* 2018; 49, 900-8.
45. Klaasen HLBM, Van der Veen M, Sutton D, Molkenboer MJCH. A new tetravalent canine leptospirosis vaccine provides at least 12 months immunity against infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 158(1-2): 26-9.
46. Kmety E, Dikken H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, 1993.
47. Kurilung A, Keeratipusana C, Horiike T, Suriyaphol P, Hampson DJ, Prapasarakul N. Chronology of emergence of the genus *Leptospira* and over-representation of gene families enriched by vitamin B2, B12 biosynthesis, cell adhesion and external encapsulating structure in *L. interrogans* isolates from asymptomatic dogs. *Infect Genet Evol.* 2019; 73:7-12.
48. Lau SF, Wong JY, Khor KH, Roslan MA, Rahman MA, Bejo SK, et al. Seroprevalence of Leptospirosis in working dogs. *Topics in Companion Animal Med.* 2017; 32(4), 121-5.
49. Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. Leptospiral pathogenomics. *Pathogens.* 2014; 3(2): 280-308.
50. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (1): 11- 4.
51. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (2): 296-326.
52. Lux R, Moter A, Shi W. Chemotaxis in pathogenic spirochetes: directed movement towards targeting tissues? *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000; 2(4):355-64.



53. Maiden M.C, Bygraves J.A, Feil E, Morelli G, Russel J.E, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998; 95, 3140-45.
54. Manual terrestre de la OIE (2018). Capítulo 3.1.13. Leptospirosis. Disponible en: [[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.12\\_LEPTO.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf)]
55. Matsui M, Roche L, Geroult S, Soupé- Gilbert M-E, Monchy D, Huerre M, et al. Cytokine and Chemokine Expression in Kidneys during Chronic Leptospirosis in Reservoir and Susceptible Animal Models. PLoS ONE. 2016; 11(5): e0156084.
56. Matsui M, Roche L, Soupé-Gilbert ME, Hasan M, Monchy D, Goarant C. High level of IL-10 expression in the blood of animal models possibly relates to resistance against leptospirosis. Cytokine. 2017; 96:144-51.
57. Matsui M, Soupe ME, Becam J, Goarant C. Differential *in vivo* gene expression of major *Leptospira* proteins in resistant or susceptible animal models. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(17): 6372-76.
58. McCallum KE, Constantino-Casas F, Cullen JM, Warland JH, Swales H, Lingham N, et al. Hepatic leptospiral infections in dogs without obvious renal involvement. J Vet Intern Med. 2019; 33(1): 141-50.
59. Moura M, Larré O, Andrade R, McBride AJA, Dellagostin OA, Dawanz. DNA vaccines against leptospirosis: a literatura review. Vaccine, 2017, 35: 5559-67
60. Murphy K. Leptospirosis in dogs and cats: new challenges from an old bacteria. In Practice. 2018; 40(6), 218-29.
61. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. J Microbiol Immunol Infect. 2013; 46:245-52.
62. Palmer M, Waitkins SA, Zochowski W. Survival of leptospires in commercial blood culture systems. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]. 1984; 257 (4): 480-87.
63. Penna B, Marassi C, Libonati H, Narduche L, Lilenbaum W, Bourhy P. Diagnostic accuracy of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* as antigen for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017; 50:13-5.
64. Perolat P, Baranton G. *Leptospira interrogans* et la Leptospirose. Bull Inst Pasteur. 1990; 88: 315-33.
65. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS One. 2008; 3(2): e1607.
66. Picardeau M, Levett PN. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospiraceae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2018; 68:3362.

67. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013; 43(1): 1-9.
68. Puche R, Ferrés I, Caraballo L, Rangel Y, Picardeau M et al. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018; 68:513–7.
69. Raghavan RK, Brenner KM, Higgins JJ, Shawn Hutchinson JM, Harkin KR. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002–2009). *Pre Vet Med.* 2012; 107:105-9.
70. Ramadass P, Jarvis BDW, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol.* 1992; 42 (2) 215-9.
71. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003; 422 (6934):888-93.
72. Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6, e1853. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853>.
73. Riediger IN, Stoddard RA, Ribeiro GS, Nakatani SM, Moreira SD, Skraba I et al. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira* lipL32-based real-time PCR assay. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(9).
74. Sant Anna R, Vieira A.S, Oliveira J, et al. Asymptomatic leptospiral infection is associated with canine chronic kidney Disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2019; 62: 64-7.
75. Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 2015; 56(3):159-79.
76. Simón MC, Ortega C, Alonso J.L, Gironés O, Muzquiz J.L, García J. Risk factors associated with the seroprevalence of leptospirosis among students at the veterinary school of Zaragoza University. *Vet Rec.* 1999; 144: 287-91
77. Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013; 63(Pt 5): 1859-62.
78. Sonet J, Barthélemy A, Goy-Thollot I, Pouzot-Nevoret C. Prospective evaluation of abdominal ultrasonographic findings in 35 dogs with leptospirosis. *Vet Radiol Ultrasound.* 2018; 59(1): 98-106.

79. Sykes J.E, Hartmann K, Lunn K.F, Moore G.E, Stoddard R.A, Goldstein R.E. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:1–13
80. Teixeira AF, Fernandes LGV, Cavenague MF, Takahashi MB, Santos JC, Passalia FJ et al. Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. *Vaccine.* 2019; 37: 3961-73
81. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(1). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004122>
82. Troia R, Balboni R, Zamagni S, Frigo S, Magna L, Perissinotto L, et al. Prospective evaluation of rapid point-of-care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Vet J.* 2018. 237: 37-42
83. Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. Leptospirosis vaccine. 2007, 6: 39 doi:10.1186/1475-2859-6-39
84. Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang XF, Zhang C, Ding S, et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF-kappaB signaling pathways. *PLoS One.* 2012; 7(8).
85. Warnasekara J, Koralegedara I, Agampodi S. Estimating the burden of leptospirosis in Sri Lanka; a systematic review. *BMC infect Dis.* 2019; 19 (1): 119.
86. Wilson S, Stirling C, Thomas A, King V, Plevová E, Chromá L, et al. Duration of immunity of a multivalent (DHPPi/L4R) canine vaccine against four *Leptospira* serovars. *Vaccine.* 2013; 31(31): 3126-30.
87. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. ISBN 92 4 154589 5.
88. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect.* 2009; 11(3): 328-33.
89. Yasuda PH, Staigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1987; 37: 407-15.
90. Zuener RI. Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19 (18): 4857-60.
91. Zuerner RL, Bolin CA. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(10): 2612-7.
92. Zuerner RL, Huang WM. Analysis of a *Leptospira interrogans* locus containing DNA replication genes and a new IS, IS1502. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 215(2): 175-82.