



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO  
PARA LEPTOSPIROSIS EN CANINOS REMITIDOS PARA  
PRÁCTICAS DE NECROPSIAS AL LABORATORIO DE PATOLOGÍA  
DE LA FES CUAUTITLÁN, UNAM.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A N**  
**JESSICA KRISTAL GARCÍA PAEZ**  
**EUSTAQUIO ROMERO MORALES**

**ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015.**

---

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

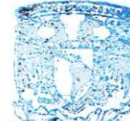
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación y comparación de pruebas de diagnóstico para leptospirosis en caninos remitidos para prácticas de necropsias al Laboratorio de Patología de la FES Cuautitlán, UNAM.

Que presenta la pasante: Jessica Kristal García Paez  
Con número de cuenta: 305007371 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
<b>VOCAL</b>	Dr. José Francisco Morales Alvarez	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
<b>1er. SUPLENTE</b>	I.Q. Rigoberto García Reynaga	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación y comparación de pruebas de diagnóstico para leptospirosis en caninos remitidos para prácticas de necropsias al Laboratorio de Patología de la FES Cuautitlán, UNAM.

Que presenta el pasante: Eustaquio Romero Morales  
Con número de cuenta: 305156383 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
<b>VOCAL</b>	Dr. José Francisco Morales Alvarez	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
<b>1er. SUPLENTE</b>	I.Q. Rigoberto García Reynaga	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm\*

## *AGRADECIMIENTOS*

Infinitas gracias a Dios por permitirme este paso tan importante en mi vida el cual no fue nada fácil pero sin embargo hoy puedo saber el precio del éxito.

Millones de gracias a mis padres: Papá Leo y Mamá Mary por darme la vida, educarme, inculcarme grandes valores, pero sobre todo por creer en mí y su infinito apoyo, son maravillosos los dos, los amo, sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí ni sería lo que hoy soy.

A mis queridos y valiosos hermanos: Erika por sus consejos y regaños; Gonz por dejarme aprender de ti por lo ñoño que eres; Karina por el ánimo brindado y siempre escucharme; Blanca por tu gran amistad y malos consejos; Pero sobre todo gracias por su comprensión, apoyo y educación que me brindaron de cierta manera, los quiero mucho.

Gracias a mis otros Padres que me enseñaron a trabajar desde muy pequeña, me educaron, inculcaron valores, muchas pero muchas gracias por su apoyo brindado hasta hoy en día, por todos sus buenos consejos y hasta regaños, también forman parte de mi familia son mis otros papas, los quiero mucho y siempre están presentes en este corazón Sr. José Luis Velázquez y esposa.

Gracias a mi compañero de tesis , amigo, primo y casi hermano , fue un periodo duro , de peleas , discusiones , aprendizaje , pero hoy y ahora ya estamos aquí , valió la pena , gracias por dejarme aprender de ti y haber aceptado la colaboración, hoy te digo : “¡eres libre!” , “¡lo logramos!” , sin ti no hubiera sido posible este trabajo de tesis. Millones de Gracias Tako ; =)

Amigas y amigos mil gracias por su amistad, confianza y apoyo, por todas las historias locas de universidad, Pollo, Rodrigo y André, por ser como unas amigas rudas y groseras, los quiero mucho y de aquí en adelante espero cruzar más los caminos.

A mis amigas lokas y mis colegas favoritas: mamá Karo, Ale, Mary, Ana, Adriana, Dafne y todos aquellos que pintaron este camino de colores durante todo ese tiempo en aquella gran y maravillosa casa de estudios.

Aidé miles de gracias por tu amistad y enseñarme que si existen las mejores amigas, te quiero mucho.

Gracias Susana por acompañarme en varias etapas de mi vida eres una buena amiga y gracias por tus consejos eres mi psicóloga favorita.



Porque soy ORGULLOSAMENTE UNAM, infinitas gracias por darme esta gran oportunidad. GOOOOOOOOOOOOOOYaaaaa!!

A la persona que ha visualizado este sueño desde un rincón de mi vida y hoy está más cerca que nunca, gracias por los costales de apoyo, buena vibra y entusiasmo que me has regalado, gracias Joel.

Gracias al INIFAP y las maravillosas personas que conocí en este lugar , Selenita por hacer las comidas ocurrentes , Dino-Arlene por el lazo creado en tan poco tiempo y la buena amistad que hasta hoy en día mantenemos, Jesús(Gorshdo) , Laura, Kike , Fechì, por aguantarme, por su amistad brindada y esos buenos momentos que hacían nuestra estancia muy divertida.

Creo que las gracias no son suficientes para usted respetable, honorable y magnífica persona que es mi jefe: Dr. José Francisco Morales, porque me ha enseñado tanto en el ámbito académico y social, por su amistad, comprensión, por la oportunidad y sobre todo por su sencillez.

¡¡¡SOY SU FAN!!!

Estoy eternamente agradecida contigo M. en C. Lupita Martínez, por dejarme aprender tanto de ti, eres calidad de ser humano y millones de gracias por la amistad y confianza brindada.

Gracias a la FES Cuautitlán y al Departamento de Patología por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Gracias a los profesores por su enseñanza, por impulsar a sus alumnos a ser mejores cada día.

Gracias al jurado por tomar parte de su tiempo para la revisión del trabajo.

Millones de gracias a los animales de experimentación, sin ellos es imposible el trabajo de toda investigación, porque gracias a ellos hoy la ciencia avanza y avanza.

**¡INFINITAS GRACIAS!!!!!!**

“Por mi raza hablara mi espíritu”

## *DEDICATORIA*

*A mis Padres: este es el resultado de su arduo trabajo y todos sus alientos, No les falle!*

*Para mis pequeños sobrinos: Allison, Maythe, Mahus, Ari, Holly y Alonso, porque deseo ser un buen ejemplo para ustedes, para que se sigan sorprendiendo más y más, se arriesguen a soñar y cumplan todo lo que se propongan.*

*A mi abuelita que sé que me cuida mucho y hoy está más cerca que nunca, por sus consejos, por ser un ejemplo de mujer inteligente, ruda, trabajadora y muy cabrona, siempre seré tu "Leoncita".*

*A la vida y a Dios que me han dado tanto.*

*Y hoy les digo:*

*"Las mejores cosas no son las que compras, si no las que logras..."*

*"¡Nunca te rindas, nunca te rindas y nunca te rindas!"*

## *AGRADECIMIENTOS*

A mi familia, mis padres: Nicodemos y Juana, mis hermanos: Marcos, Genaro y Paulina por ser el pilar de mi vida, por el apoyo y la paciencia para ver concretado este logro.

A la FES-C, la encargada de mi formación académica, por permitirme desarrollarme como estudiante, permitirme conocer a amigos y compañeros de vida, y por permitirme conocer a gente que enriqueció mi estancia dentro de ella.

A mis profesores que más allá de la enseñanza se convirtieron en maestros de vida, ejemplos a seguir e inspiración para siempre seguir adelante.

A mi asesor el Dr. José Francisco Morales que me permitió aprender de él dentro y fuera del CENID gracias por ayudarme a ser siempre una mejor persona y a la M. en C. María Guadalupe Martínez por ser mi guía, por compartir su conocimiento, sabiduría, y por brindarnos una amistad sincera. A Selenita que siempre nos apoyó y compartió con nosotros momentos agradables.

A kristal compañera académica, y amiga de por vida, gracias por invitarme a emprender este camino profesional juntos, por aguantarnos y tolerarnos, este logro es de ambos.

A mis amigos de la *"office"* a Moni, Tania y Campero, Berenice, Jazmín, Martin, Vero, Gabo, David, Toñito, Oscar, Moi, Elena, Marcos, Gaby P., Mariana, Anel, Sara, Jonathan, Moroni, Windy, Erick, Memo, Alex, Quique, Daniel, Kendra, Laurita con los que compartí clases, aventuras, logros, y toda una vida dentro de la FESC, gracias mi otra familia. A mis amigos Sarai (lola), Erick (el pollo), Andres, Nina, Wen, Rox, Gaby B., Carito, gracias por esas aventuras y por compartir su tiempo conmigo.



A amigos del CCH siempre presentes en mi vida Laura, Gaby, Monica, Raúl, aun distantes hemos sabido siempre estar juntos.

A mis amigos del INIFAP, Arlene Jáuregui, Laura, Fer, Erika O., Kike, Chucho, Raquel que hicimos todo un mundo dentro del instituto y lo convertimos en nuestro hogar y aunque la distancia nos separe, siempre seremos amigos.

A todos esos animales que compartieron un poco de si para poder enseñarnos y hacer de este un lugar mejor, gracias.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber” Albert Einstein

Gracias a todos.

“Por mi raza hablara mi espíritu”.



## DEDICATORIA

*A la vida misma por permitirme iniciar esta aventura en este mundo y en este tiempo, en la que hago una escala para reconocer a aquellas personas importantes que pertenecen a esta aventura.*

*A mis padres Nicodemos y Juana por permitirme estar presente en esta vida, por educarme, por cuidarme, por enseñarme los valores que ahora me rigen, por todo lo que les aprendí, aprendo y aprenderé de ellos, por permitirme tener y compartir estos logros, sin ellos no habría podido terminar este proyecto.*

*A mis hermanos Marcos, Genaro y Paulina, con los que compartí y comparto momentos inolvidables, travesuras, peleas y reconciliaciones, gracias por estar siempre apoyándome, aun cuando muchas cosas cambien siempre seremos hermanos.*

*A todas esas personas que directa e indirectamente me ayudaron a completar esta etapa que parecía interminable.*

*Dedicación especial a todos aquellos animales que contribuyeron con poco de ellos a la realización de este proyecto, proporcionando la enseñanza necesaria para hacer este un lugar mejor, nos vemos pronto.*



*“Transformar el mundo” dijo Marx, “Cambiar la vida” dijo Rimbaud.*

*Gracias por su apoyo.*

## CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>4</b>
2.1. Taxonomía y clasificación de leptospira.....	<b>4</b>
2.2. Características generales del género <i>Leptospira</i> .....	<b>5</b>
2.3. Reservorios.....	<b>7</b>
2.4. Aspectos históricos.....	<b>8</b>
2.5. Distribución geográfica.....	<b>9</b>
2.5.1. Distribución mundial.....	<b>9</b>
2.5.2. Distribución y prevalencia en México.....	<b>10</b>
2.6. Transmisión de la leptospirosis.....	<b>13</b>
2.7. Cuadro clínico.....	<b>14</b>
2.7.1. Manifestaciones clínicas.....	<b>14</b>
2.7.2. Forma anictérica.....	<b>16</b>
2.7.2.1. Enfermedad de Stuttgart.....	<b>16</b>
2.7.3. Forma ictérica.....	<b>18</b>
2.7.3.1. Enfermedad de Weil.....	<b>18</b>
2.8. Lesiones características en tejidos y órganos.....	<b>20</b>
2.8.1. Lesiones macroscópicas.....	<b>20</b>
2.8.2. Lesiones microscópicas.....	<b>21</b>
2.8.2.1. Nefritis intersticial.....	<b>22</b>
2.8.2.2. Hepatitis necrótica multifocal.....	<b>23</b>

2.9. Factores de virulencia.....	24
2.9.1. Producción de toxinas.....	24
2.9.2. Adherencia.....	25
2.9.3. Proteínas de superficie.....	25
2.9.4. Mecanismos inmunes.....	26
2.10. Métodos de diagnóstico.....	28
2.10.1. Métodos directos.....	28
2.10.1.1. Aislamiento bacteriológico.....	28
2.10.1.2. Observación directa al microscopio en campo oscuro y contraste de fases.....	28
2.10.1.3. Inmunofluorescencia directa.....	29
2.10.1.4. Tinciones histopatológicas; detección de estructuras compatibles con <i>Leptospira sp.</i> .....	29
2.10.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
2.10.2. Métodos indirectos.....	31
2.10.2.1. MAT. Microaglutinación.....	31
2.10.2.2. ELISA.....	31
2.10.2.3. Detección de lesiones sugerentes de leptospirosis (tinciones histológicas).....	32
2.11. Tratamiento.....	33
2.12. Prevención.....	34
2.13. Situación actual en México.....	35
<b>3. Justificación.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
4.1. Objetivo general.....	39

4.2. Objetivos específicos.....	39
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Materiales y métodos.....</b>	<b>40</b>
6.1. Material biológico.....	40
6.2. Técnica de microaglutinación (MAT).....	41
6.3. Análisis histopatológico.....	42
6.3.1. Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	42
6.3.2. Tinción argéntica (Warthin-Starry).....	42
6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
6.4.1. Extracción de DNA.....	42
6.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa – punto final (PCR-PF)....	43
6.4.3. Electroforesis de los productos de la PCR.....	45
6.5. Análisis estadístico.....	46
<b>7. Resultados.....</b>	<b>47</b>
7.1. MAT. Evidencia de anticuerpos.....	47
7.2. Análisis histopatológico (HP).....	50
7.2.1. Tinción de Hematoxilina-Eosina. ....	50
7.2.2. Tinción Warthin-Starry (WS).....	52
7.3. PCR-PF.....	53
7.3.1. Optimización de parámetros de PCR.....	53
7.3.1.1. Temperatura óptima de los iniciadores ( <i>primers</i> ).....	53
7.3.1.2. Concentración de los iniciadores ( <i>primers</i> ).....	54
7.3.2. Resultados generales de la prueba de PCR-PF.....	55

7.3.3. Resultados de PCR-PF en muestras de hígado, riñón y orina.....	55
7.4. Resultados generales de las pruebas; MAT, PCR, HP.....	56
<b>8. Análisis estadístico.....</b>	<b>57</b>
8.1. Prueba de concordancia de Kappa.....	57
8.2. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR.....	58
<b>9. Discusión.....</b>	<b>59</b>
9.1. Análisis comparativo de las pruebas de MAT, HP, PCR.....	67
9.2. Índice de concordancia de kappa.....	69
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>70</b>
<b>11. Recomendaciones.....</b>	<b>72</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>74</b>
<b>13. Referencias.....</b>	<b>88</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Micrografía de <i>Leptospira biflexa</i> serovariedad andama al microscopio electrónico de barrido.....	6
Figura 2	Reporte de casos mundiales de leptospirosis en animales domésticos y silvestres.....	10
Figura 3	Situación de leptospirosis en México del año 2005 al 2011.....	11
Figura 4	Reporte de resultados de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.....	12
Figura 5	Estados de la República Mexicana confirmados de leptospirosis del año 2000 al 2010.....	13
Figura 6	Fase icterica en caninos a causa de la serovariedad <i>L. icterohaemorrhagiae</i> .....	19
Figura 7	Nefritis intersticial, apariencia microscópica. Infección por <i>L. canicola</i> .....	22
Figura 8	Hepatitis necrótica multifocal.....	23
Figura 9	Modelo murino propuesto en la eliminación de la <i>Leptospira</i> .....	27
Figura 10	Toma de muestra sanguínea y tejidos en caninos.....	40
Figura 11	Cepario de leptospiras.....	41
Figura 12	Interpretación de la prueba de MAT.....	41
Figura 13	Extracción de DNA. Muestra de procedimiento.....	43
Figura 14	Colocación de los microtubos para la PCR.....	45
Figura 15	Colocación de los productos de PCR en el gel de agarosa, visualización de los productos de la PCR en el transiluminador.....	46

Figura 16	Resultados generales de la prueba de microaglutinación en placa de sueros caninos ( $\geq 1:200$ ) .....	<b>48</b>
Figura 17	Frecuencia del serovariedad presente en sueros positivos a la prueba de MAT ( $\geq 1:200$ ).....	<b>49</b>
Figura 18	Nefritis intersticial crónica. Corte de riñón. Resultado de la tinción H-E.....	<b>51</b>
Figura 19	Lesiones encontradas en riñón e hígado no sugerentes a leptospirosis.....	<b>51</b>
Figura 20	Estructuras compatibles con <i>Leptospira</i> sp. Corte de riñón, resultado de la tinción de Warthin Starry .....	<b>52</b>
Figura 21	Gradiente de temperatura en gel de agarosa al 2.5% teñido con Bromuro de etidio.....	<b>53</b>
Figura 22	Gel de agarosa al 2.5% teñido con Bromuro de etidio, bandas de amplificación del género <i>Leptospira</i> sp a diferente concentración de <i>primers</i> .....	<b>54</b>
Figura 23	Resultados generales de las pruebas diagnósticas realizadas: MAT, PCR, HP-HE, HP-WS.....	<b>56</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Secuencia de iniciadores Lepto F y Lepto R.....	44
Cuadro 2	Componentes de la reacción de PCR.....	44
Cuadro 3	Condiciones de amplificación de PCR.....	45
Cuadro 4	Resultados generales de la prueba microaglutinación en placa de sueros caninos. ....	47
Cuadro 5	Frecuencia de serovariedades presente en sueros positivos.....	47
Cuadro 6	Resultados generales de la prueba microaglutinación en placa de sueros caninos.....	48
Cuadro 7	Frecuencia de serovariedades presente en sueros positivos.....	49
Cuadro 8	Frecuencia de serovariedades <i>L. interrogans</i> presente en sueros positivos.....	50
Cuadro 9	Resultados de la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).....	50
Cuadro 10	Resultados de la tinción de Warthin Starry (W-S).....	52
Cuadro 11	Resultados generales de la prueba de PCR-PF.....	55
Cuadro 12	Frecuencia de <i>Leptospira sp</i> presente en hígado, riñón y orina.....	55
Cuadro 13	Resultados generales de las pruebas: MAT, PCR, HP-HE, HP-WS...	56
Cuadro 14	Índice kappa de la prueba de PCR-PF en base a la técnica de MAT como prueba de referencia. ....	57
Cuadro 15	Índice kappa de la prueba de histopatología (tinción H&E) en base a la técnica de MAT como prueba de referencia. ....	57
Cuadro 16	Índice kappa de la prueba de histopatología (tinción W-S) en comparación con la técnica de MAT como prueba de Referencia.....	58
Cuadro 17	Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR-PF referenciando en la prueba de MAT como prueba de referencia.....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	Registro de características generales de perros y toma de muestras...	74
Anexo B	Protocolo de extracción de DNA para tejidos a base de CETAB.....	76
Anexo C	Protocolo de la reacción de PCR- PF.....	79
Anexo D	Foto PCR-PF para la detección de <i>Leptospira sp</i> .....	81
Anexo E	Tabla de comparación con resultados generales de las pruebas de diagnóstico realizadas.....	82
Anexo F	Principales lesiones encontradas en tejidos en la prueba de histopatología con la tinción de H-E en muestras de riñón.....	84
Anexo G	Gráfico de resultados generales de la prueba microaglutinación en placa de sueros caninos ( $\geq 1:100$ ).....	84
Anexo H	Gráfico de frecuencia del serovariedad presente en sueros positivos a la prueba de MAT ( $\geq 1:100$ ).....	85
Anexo I	Gráfico de resultados de la técnica de histopatología tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) en muestras de riñón.....	85
Anexo J	Gráfico de resultados de la técnica de Histopatología tinción de Warthin Starry (W-S), en muestras de riñón.....	86
Anexo K	Gráfico de resultados generales de la prueba de PCR-PF.....	86
Anexo L	Gráfico de frecuencia de <i>Leptospira sp</i> presente en hígado, riñón y orina detectados mediante la prueba de PCR –PF.....	87

## RESUMEN

La leptospirosis es considerada la zoonosis de mayor difusión en el mundo, los principales reservorios son los roedores, ovinos, porcinos, equinos y caninos; el perro es la mascota doméstica más común en zonas rurales y urbanas convirtiéndose en el principal transmisor de la leptospira hacia el humano, por lo que contar con un panel de pruebas diagnósticas efectivas, rápidas, de alta sensibilidad y especificidad, permitirá ofrecer un diagnóstico oportuno, e implementar medidas de control y prevención de la leptospirosis. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *Leptospira sp* en caninos remitidos al Laboratorio de patología de la FES Cuautitlán UNAM, mediante diferentes pruebas diagnósticas las cuales fueron: la técnica de microaglutinación (MAT) para las serovariedades *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo* y *L. tarassovi*; la identificación de lesiones sugerentes de leptospirosis (nefritis intersticial crónica no supurativa y hepatitis necrótica multifocal) mediante el análisis histopatológico con la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y la identificación de la leptospira por la tinción de Warthin-Starry (WS); así como, la implementación de la prueba de PCR-Punto Final (PCR-PF) contra *Leptospira sp* en riñón, hígado y orina. Se obtuvieron las muestras de suero, orina, hígado y riñón de 54 perros, las cuales fueron sometidas a las pruebas de MAT, PCR-PF y al análisis histopatológico. Los resultados obtenidos indican el 18.5% de seropositividad para al menos una de las 5 serovariedades de *Leptospira* incluidas en este estudio a una dilución 1:200. En la PCR se obtuvieron fragmentos de amplificación en el 20.3% en por lo menos uno de los tejidos de cada animal, siendo el riñón el órgano donde más detecciones se realizaron (18.51%). En el análisis histopatológico el 27% de los riñones mostraron lesiones compatibles con *Leptospira sp* (nefritis intersticial crónica no supurativa). Sin embargo sólo en el 11.1% de los casos se logró identificar estructuras compatibles con *Leptospira sp* por la tinción de Warthin Starry.

Se calculó el índice de Kappa ( $k$ ) para las pruebas anteriores, tomando como referencia la técnica de MAT, obteniéndose para la prueba de PCR-PF un índice de Kappa de 0.23, la prueba de HP-HE reportó un  $k=0.33$ , para la prueba de HP-WS el valor de  $k=0.12$ . De acuerdo al criterio de Landis Koch las pruebas de PCR-PF y HP-HE se consideran de concordancia *aceptable* mientras que la prueba de HP-WS se consideró *reducida*. Finalmente se determinó la sensibilidad y especificidad para la prueba de PCR-PF en base a la técnica de MAT obteniendo una sensibilidad del 40% y una especificidad del 84%. El cuadro clínico de la leptospirosis es habitualmente confundido con otras patologías por lo que es importante contar con suficientes pruebas de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, que sirvan de herramientas para ofrecer un diagnóstico oportuno de la leptospirosis y poder establecer medidas de control y prevención oportunas en los sectores de salud animal y humana.



## 1. Introducción

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial. La leptospirosis es capaz de infectar cualquier mamífero doméstico o silvestre, en especial perros, gatos, cerdos, caballos, ratas y humanos <sup>1</sup>.

En el continente americano, ha sido publicado la prevalencia en algunos países como: México 18.9%; Argentina 26.8%; Brasil 22.3%; Cuba 48.7%; Salvador 17.5% y Colombia 25% <sup>2</sup>.

La *Leptospira sp*, es de forma helicoidal, aerobia obligada, posee gran movilidad. Tiene un diámetro aproximado de 0.25µm y una longitud de entre 6-25µm, estas características hacen que la *Leptospira sp* sea observable únicamente en un microscopio de campo oscuro o de contraste de fases, y no se pueda colorear con anilinas <sup>3</sup>.

El género *Leptospira*, pertenece a la familia *Leptospiraceae* y al orden *Spirochaetales*. Las leptospirosis son muy sensibles a la desecación, luz y pH ácido. Una temperatura menor a 13°C y mayor a 35°C provoca su muerte rápidamente <sup>4</sup>. Son sensibles a soluciones hipertónicas de sal común (2.8%), bilis y a la mayoría de los antibióticos in vitro o in vivo como la penicilina, estreptomycin y los grupos macrólidos.

Se difunde principalmente a través de la orina de los animales infectados y la transmisión hacia otros animales y personas ocurre por el contacto con el agua, suelo o vegetación contaminada con orina de los hospederos de *Leptospira sp* patógena. El mecanismo de contagio es a través de mucosas, piel lesionada o por ingestión y se replica en diversos tejidos como riñón, hígado, pulmón, ojos y el sistema nervioso central <sup>5</sup>.

La leptospirosis presenta un cuadro clínico asociado a fiebre alta y compromete el funcionamiento normal de órganos; puede confundirse con otras enfermedades que presentan síntomas similares como fiebre amarilla, influenza, paludismo, hepatitis, dengue, etc.

El diagnóstico bacteriológico se basa en el aislamiento, cultivo e identificación. Para el diagnóstico de la leptospirosis se cuenta con técnicas de diagnóstico como la observación en microscopio de campo oscuro, tinción argéntica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y la observación directa de leptospiras en sedimentos de orina. Existen otros métodos para la detección de leptospiras, como el marcado de partículas de oro, aglutinación microscópica (MAT), microaglutinación microscópica con antígeno muerto (MSAT), aglutinación macroscópica, prueba hemolítica, fijación de complemento, ensayo inmunoenzimático (ELISA) y PCR <sup>6</sup>.

Las técnicas directas (microscopio de campo oscuro, contraste de fases e inmunofluorescencia) son poco sensibles, necesitan cargas altas de células/ml, y son potencialmente peligrosas. Las técnicas indirectas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA), técnica de aglutinación de microcápsula (MCAT) y microaglutinación (MAT) requieren de mucho tiempo, pueden ser costosas y retrasan el diagnóstico temprano de la enfermedad en su fase aguda <sup>7</sup>. En la actualidad, el uso de herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera altamente sensible, específica y rápida.

Por todo lo anterior, se considera importante contar con suficientes alternativas de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, que sirvan de herramientas para detectar la leptospirosis y realizar un diagnóstico de la enfermedad de manera rápida y eficiente, para poder establecer medidas de control y prevención oportunas en las poblaciones susceptibles.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Taxonomía y clasificación de leptospira**

La leptospira presenta la siguiente clasificación taxonómica <sup>8</sup>.

- División: *Procariones*.
- Clase: *Schizomicetes*.
- Orden: *Spirochaetales*.

- Familia: *Leptospiraceae*.
- Género: *Leptospira*.
- Especies: *L. interrogans*, *L. biflexa*.

El método tradicional de clasificación dividió a las leptospiras en aproximadamente 200 serovariedades basados en las diferencias antigénicas (serológicas), todas las leptospiras patógenas fueron clasificadas como una especie, *L. interrogans*; las serovariedades de vida libre no patógenos fueron incluidas en la especie *L. biflexa*<sup>9</sup>.

El complejo *L. interrogans* con base en propiedades antigénicas, se subdivide a su vez en aproximadamente 180 serotipos. Estos 180 serotipos, por su comportamiento inmunológico, se han dividido en 18 subgrupos. Entre los más comunes se encuentran: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. autumnalis*, *L. canícola*, *L. pomona*, *L. georgia*, *L. australis* y *L. grippotyphosa*. No hay especificidad de hospedador ni de cuadro clínico como se creía antes<sup>10</sup>, pero podemos encontrar ciertas serovariedades más frecuentemente en algunos mamíferos.

Sin embargo, la nueva clasificación del Género *Leptospira* se inclina sobre las relaciones genéticas del organismo, por ejemplo: el análisis de endonucleasa y la restricción de DNA cromosomal. Hay actualmente 7 genoespecies, 28 serogrupos y numerosas serovariedades y genotipos<sup>9</sup>.

## **2.2. Características generales del género *Leptospira***

*Leptospira sp* es una bacteria en forma de espiroqueta, delgadas y flexibles de 5 a 10µm de longitud y de 0.1 a 0.2µm de ancho con espirales muy finas. A menudo uno de los extremos del microorganismo se dobla para formar un gancho. La movilidad es lograda por un par de filamentos axiales, uno en cada extremo.

Estas bacterias solo son visibles al microscopio de campo oscuro o de contraste de fases, pero no por microscopía de luz de campo claro, se caracterizan por ser microorganismos aerobios obligados de crecimiento lento<sup>11</sup>. No se tiñen con

facilidad, pero se pueden impregnar con plata, rojo Congo, tinta china, fluoresceína, peroxidasa conjugada más reactivos coloreados o por hibridación del DNA con reactivos coloreados biotina avidin "DAB" <sup>5</sup>.

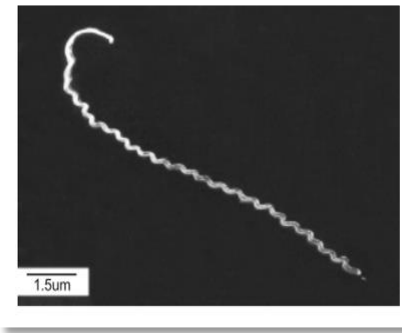


Figura 1. Micrografía de *Leptospira biflexa* serovariedad andama al microscopio electrónico de barrido 8000x<sup>12</sup>.

La leptospira se cultiva en medios artificiales, los cuales pueden contener 10% de suero de conejo ó 1% de suero albúmina bovina y *tween* 80, a un pH 6.8-7.4; el crecimiento óptimo se da a una temperatura de entre 28 y 30°C. Para evitar la contaminación del medio se puede adicionar antibióticos o intercalantes como el 5-fluorouracil y el sulfato de neomicina para hacerlo selectivo. El medio más usado es el *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium*(EMJH) el cual contiene 1% BSA y Tween 80 <sup>13</sup>.

La leptospira es altamente susceptible a la desecación y a los cambios de pH; pH<6 y pH>8 son inhibidores; temperaturas <7-10°C y temperaturas >34-36°C son nocivas. Sobreviven hasta 180 días en suelos húmedos, por varios meses en superficies acuosas y sobreviven aún mejor en agua estancada que en movimiento <sup>10</sup>.

### 2.3. Reservorios

Los principales reservorios de la leptospira en el ambiente urbano son los caninos y los roedores, así como los bovinos, porcinos y equinos en el campo. La leptospira se adaptó a "hospedadores reservorios primarios", los cuales comúnmente son animales salvajes. Estas mismas especies de leptospira también se presentan en casi cualquier otro hospedador mamífero como "hospedadores reservorio incidentales o accidentales" <sup>9</sup>.

Los caninos son el reservorio primario para la *L. canicola* y la *L. bataviae*, sin embargo pueden infectarse con varias serovariedades como *L. icterohaemorrhagiae* y *L. georgia*, y servir como hospedadores accidentales. Los bovinos son reservorios primarios para la *L. hardjo* y *L. pomona*, y hospedadores accidentales para la *L. grippotyphosa*. Los porcinos son reservorios primarios para la *L. bratislava*, al igual que los equinos y accidentales para la *L. autumnalis*, a diferencia de los equinos que lo son para la *L. pomona*. Los roedores son reservorios primarios para la *L. icterohaemorrhagiae* y accidentales para la *L. pomona*. Los ovinos y caprinos son reservorios primarios para las *L. ballum* y *L. hardjo* y accidentales para la *L. pomona* <sup>14</sup>.

También pueden ser reservorios primarios algunos animales silvestres como los zorrillos, cabras, conejos y murciélagos, mientras que el hombre es un mal reservorio; hecho que se explica porque los primeros tienen el pH de la orina alcalino, favoreciendo la sobrevivencia de la leptospira. Así se sabe que 1ml de orina de vaca puede contener hasta 100 millones de microorganismos, a diferencia del hombre que tiene una orina relativamente ácida para la leptospira, constituyéndose en un hospedador accidental. La excreción de la leptospira en la orina de los reservorios puede ocurrir por períodos prolongados y contaminar el ambiente <sup>10</sup>.

## 2.4. Aspectos históricos

En 1907, Stimson descubrió el microorganismo en los túbulos renales de un paciente que murió de la llamada fiebre amarilla. La espiroqueta fue aislada por primera vez en Japón por Inada y compañeros de trabajo en 1915 al que denominaron *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*; casi 30 años después Weil describió la enfermedad clínica en 1886. Su relativamente reciente descubrimiento desmiente la larga historia de la leptospirosis, que probablemente se conocía mucho antes en China y Japón por nombres como "ictericia de la cosecha" y "fiebre de otoño". El género *Leptospira* contiene ambas cepas patógenas y no patógenas <sup>15</sup>.

Históricamente, las serovariedades asociados con la enfermedad clínica en los caninos incluían a *L. canícola* y *L. icterohaemorrhagiae*. Sin embargo, la idea que se tenía de la enfermedad cambió cuando cientos de casos de leptospirosis fueron reportados en Long Island, Nueva York (USA) en 1996. Desde entonces, *L. grippotyphosa* y *L. pomona* se han convertido en los más prevalentes en esa región <sup>9</sup>.

En el congreso de la asociación mundial de animales menores del 2004 se expuso que la tendencia de cambio en la epidemiología de la enfermedad está relacionada a dos factores importantes <sup>16</sup>.

1. La vacunación preventiva, que no ha podido erradicar la enfermedad clínica.
2. Se ha producido un aumento en la migración de vida salvaje, donde las serovariedades grippotyphosa y pomona son los más prevalentes.



## 2.5. Distribución geográfica

### 2.5.1. Distribución mundial

La Leptospirosis es una enfermedad cosmopolita. Teóricamente, cualquier mamífero puede infectarse por cualquier serovariedad; pero en realidad, solo algunas serovariedades pueden ser consideradas como endémicas y/o enzoóticas en una región. A nivel internacional los países endémicos son: España, Barbados, Holanda, Francia, Rusia, Perú, Argentina, Chile, Canadá, Eslovaquia, Escocia, Pakistán, Tailandia, Nigeria, Costa Rica, Alemania, Dinamarca, Italia, Cuba, Australia, Zaire, Yugoslavia, Irlanda del Norte, Bangla Desh, Gabón, Japón, Venezuela. Los países epidémicos son: Brasil, China, India, Puerto Rico y casos aislados Estados Unidos de América.

Las serovariedades como: *L. pomona*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* y *L. grippotyphosa* se consideran de distribución mundial. La presencia de una u otras serovariedades dependen de la existencia de mamíferos silvestres en la región.

La distribución como la incidencia de la enfermedad depende del tipo del suelo, pH, la temperatura y de la capacidad de las aguas naturales de mantener a los microorganismos intactos <sup>5</sup>.

En el continente americano, la prevalencia en algunos países son: México 18.9%; Argentina 26.8%; Brasil 22.3% Cuba 48.7%; Salvador 17,5% y Colombia 25% <sup>2</sup>.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) por medio de su base de datos WAHID muestra el reporte de los casos de leptospirosis en animales domésticos y silvestres reportados en el periodo de Enero a Junio del 2011 (Figura 2).

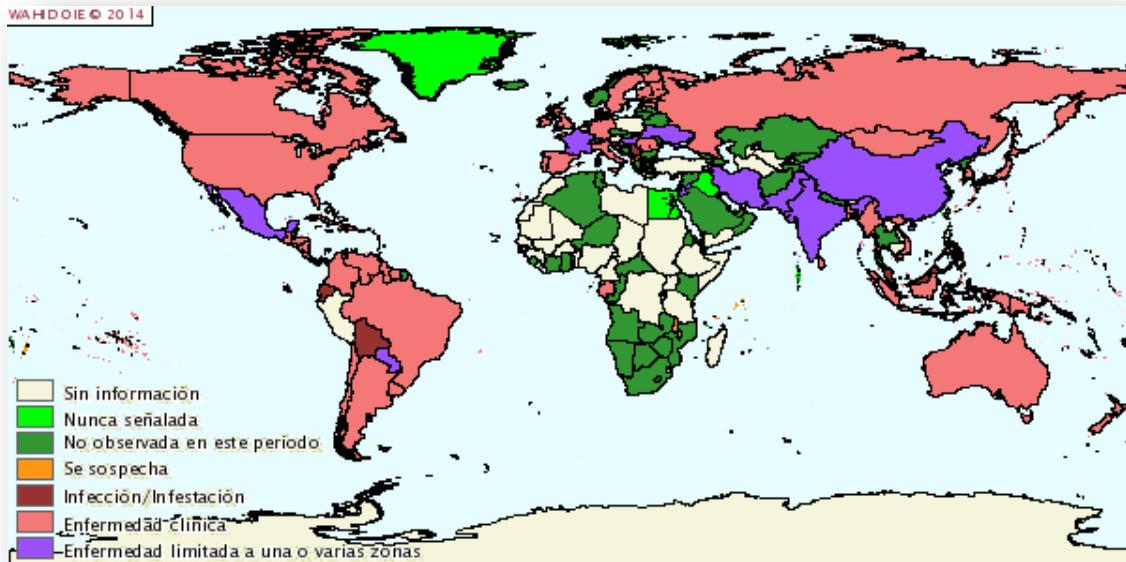


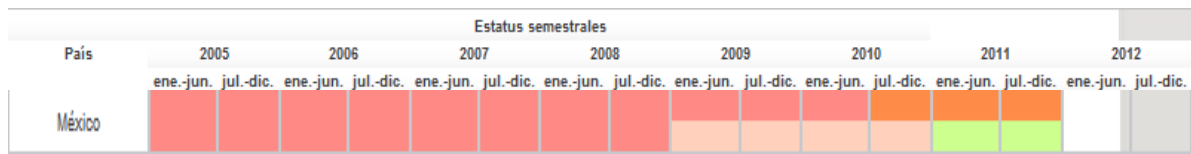
Figura 2. Reporte de casos mundiales de leptospirosis en animales domésticos y silvestres (Ene-Jun, 2011) WAHID-OIE. El continente Americano muestra un reporte de enfermedad clínica en la mayor parte de los países. México presenta reporte de enfermedad limitada a una o varias zonas.

Mostrando así que la leptospirosis se presentan en la mayoría de los países del mundo y en México se presenta en una o varias zonas limitadas.

### 2.5.2. Distribución y prevalencia en México

En México las especies de mayor importancia económica son: bovinos, equinos, cerdos, ovejas y cabras. Las cuales son susceptibles al contagio por leptospira la cual también puede afectar en mayor o menor grado a otros animales domésticos y salvajes como: perros, gatos, venados, mofetas, mapaches, zarigüeyas, musarañas, murciélagos, peces, reptiles, ranas, conejos, zorros, erizos, ratas y ratones <sup>6</sup>.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) por medio de su base de datos WAHID muestra que entre el periodo del 2005-2011 México presenta infección por leptospira en animales (Figura 3).



### Frecuencia de las enfermedades

#### Clave para los colores

No hay información disponible para esta enfermedad

Enfermedad nunca señalada

Enfermedad no señalada durante este periodo

Se sospecha de la enfermedad pero no ha sido confirmada

Presencia de la infección pero sin signos clínicos

Presencia de la enfermedad

Enfermedad limitada a una o varias zonas

Infección/Infestación limitada a una o varias zonas

Sospecha de la enfermedad sin confirmación limitada a una o varias zonas

Cuando la situación sanitaria en los animales domésticos y salvajes es diferente, la casilla se divide en dos:

- La parte superior indica la situación en los animales domésticos

- La parte inferior indica la situación en los animales salvajes

Figura 3. Situación de leptospirosis en México del año 2005 al 2011. En el periodo de 2005 a 2008 existe presencia de la enfermedad, del periodo de 2009 al 2011 existe la presencia de la enfermedad y se sospecha de la enfermedad pero no ha sido confirmada. OIE –WAHID.

La WAHID reporta que dentro del periodo de Enero a Diciembre del 2011, México tuvo 346 casos de leptospirosis en animales.

La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, quien en el periodo de 1989 a 1998, reporta haber procesado 1,746 muestras provenientes de diferentes entidades (Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán); encontrándose según la especie animal una positividad de 97% en caprinos (43 muestras), de 55.5% en equinos (9 muestras); de 55% en ovinos (40 muestras); de 49.1% en bovinos (846 muestras), de 27.6% en perros (423 muestras), de 18.5% en porcinos (286 muestras).

#### Distribución de casos de leptospirosis en la República Mexicana 1989-1998.

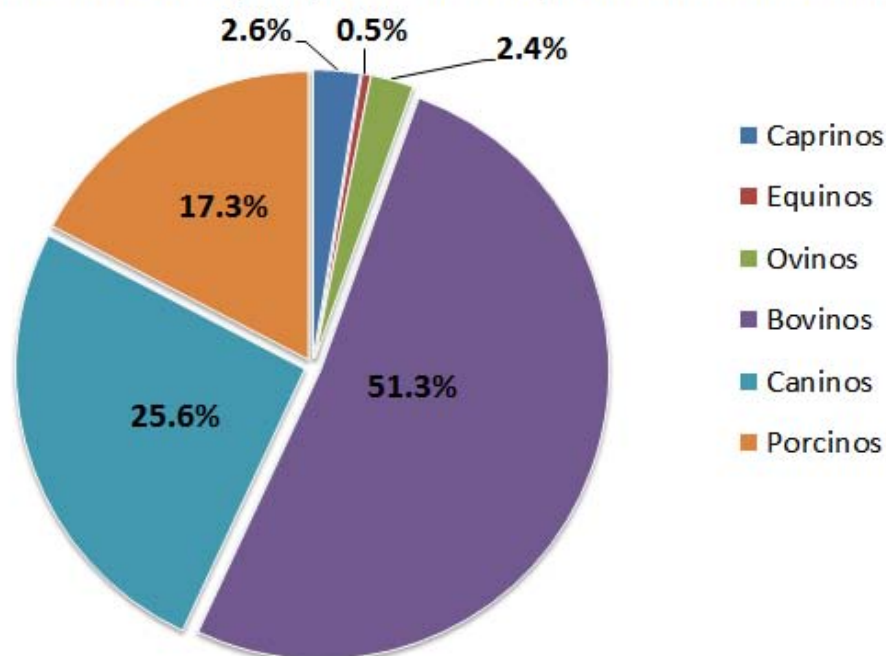


Figura 4. Reporte de resultados de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; 1647 muestras positivas provenientes de Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán <sup>6</sup>.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de SAGARPA, también ha realizado estudios serológicos en animales domésticos en el lapso de 1985 a 1997, en muestras provenientes de 19 entidades (Aguascalientes, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, y Yucatán) se estableció como promedio de positividad de 65.8% en caprinos y de 55.6% en ovinos, así como una positividad de 90.6% en animales silvestres y de 56% en roedores <sup>6</sup>.

La leptospirosis en humanos no se reportaba en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Se inició su registro a partir del año 2000.

Un estudio realizado en México en 2013, por Z. Renato en base a los datos del SINAVE en el periodo de 2000-2010 mostró que la leptospirosis en humanos se

distribuye en los estados del sureste, presentando el mayor número de casos. También demostró que la serovariedad más frecuente sigue siendo *L. canícola* (Figura 5) <sup>17</sup>.

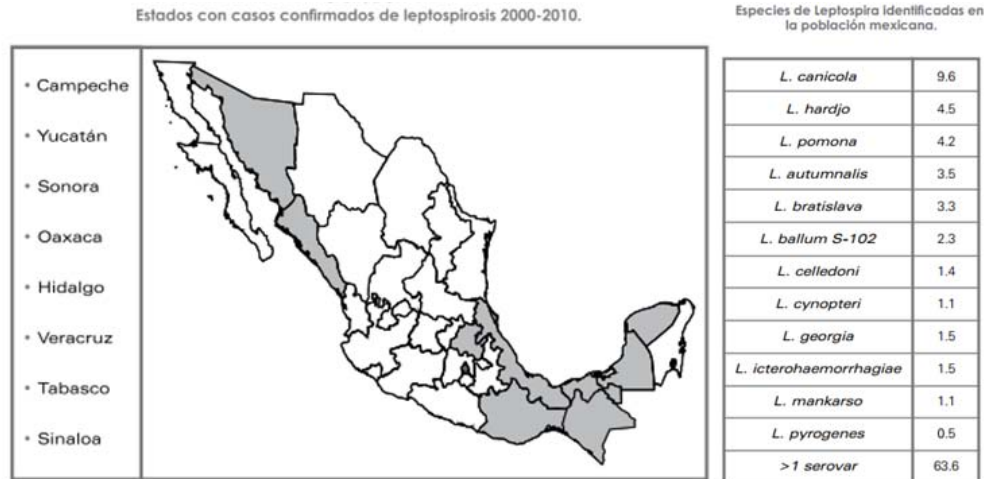


Figura 5. Izquierda: Estados de la República Mexicana confirmados de leptospirosis del año 2000 al 2010 se muestran en color gris. Derecha: Porcentaje de serovariedad aislado en la población mexicana <sup>17</sup>.

## 2.6. Transmisión de la leptospirosis

La leptospira no se multiplica fuera del hospedador y su supervivencia depende de las condiciones ambientales en las que se encuentren, por ejemplo, las condiciones del suelo y agua <sup>9 10</sup>.

Una mayor incidencia de la enfermedad ocurre en suelos con pH alcalino, durante las estaciones húmedas (áreas de alta precipitación), en áreas bajas donde es susceptible que la lluvia corra, climas cálidos y húmedos, áreas con abundante superficie de agua generando campos pantanosos y áreas barrosas <sup>9</sup>.

La infección en humanos y animales es por contacto directo con orina infectada, material o fluidos fetales y placentarios, descargas uterinas, o por contacto indirecto con el ambiente contaminado.

El hombre puede infectarse en actividades recreativas al entrar en contacto con agua dulce estancada contaminada (baño, pesca, deportes acuáticos) y por contacto con su mascota. Aerosoles inhalados pueden transportar microorganismos directamente a los pulmones.

Existen varias actividades que representan riesgo biológico en medicina veterinaria y en trabajadores agropecuarios, entre ellas se encuentran: la cría y la reproducción de especies animales, el sacrificio de los animales para el consumo humano, la atención de los animales enfermos en hospitales y zoológicos, las necropsias y los procesos inherentes a los laboratorios de investigación <sup>16</sup>.

Los caninos en patios cercados pueden exponerse a orina de animales salvajes, incluyendo roedores; caninos que son ejercitados mediante caminatas en parques, caninos de caza y aquellos que vagan en el campo o nadan en estanques, lagunas y en arroyos con poco y lento caudal están en un mayor riesgo a la exposición a leptospirosis y por lo tanto los dueños también se encuentran en riesgo, siendo introducidos en la cadena epidemiológica de modo accidental <sup>18</sup>.

## **2.7. Cuadro clínico**

### **2.7.1. Manifestaciones clínicas**

Después de un período de incubación de 7-12 días, los síntomas aparecen bruscamente.

Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son muy variables, la enfermedad presenta cuatro categorías clínicas amplias <sup>2</sup>.

1. Enfermedad leve de tipo pseudogripal.
2. Síndrome de Weil caracterizado por ictericia, falla renal, hemorragia y miocarditis con arritmias.
3. Meningitis/meningo encefalitis.
4. Hemorragia pulmonar con falla respiratoria.



En su forma más leve, la leptospirosis puede presentarse como un síndrome gripal con cefalea y mialgias. La leptospirosis grave, caracterizada por ictericia, disfunción renal y diátesis hemorrágica (Síndrome de Weil).

Las manifestaciones clínicas general se pueden dividir en dos síndromes clínicos distintos. El 90% de los pacientes presentan enfermedad febril anictérica leve; el 10% están gravemente enfermos con ictericia y otras manifestaciones (Síndrome de Weil)<sup>15</sup>.

En los animales, especialmente los bovinos se pueden complicar con abortos, disminución de la fertilidad y disminución de la producción láctea <sup>19</sup>.

En caninos la severidad de los signos clínicos se ve influenciada por la edad, estado de vacunación, la virulencia inherente de una serovariedad de leptospira en particular, la ruta y el grado de exposición. En la enfermedad pre-aguda a subaguda, los caninos pueden morir sin la presencia de signos clínicos. Estos caninos comúnmente se presentan con pérdida de apetito, fiebre 38.5 a 40°C, severa mialgia y se rehúsan a moverse, rigidez, temblores, debilidad progresiva y depresión, es posible la presencia de vómito y diarrea lo cual resulta en una rápida deshidratación y sed excesiva.

En las membranas mucosas a menudo presentan petequias y hemorragias equimóticas extensas; la ictericia no es común, y ocurre con mayor frecuencia en perros infectados con *L. icterohaemorrhagiae*.

Los caninos con enfermedad aguda además pueden presentar una deposición grisácea, piel y ojos amarillentos, y desarrollar pérdida de peso crónica. En casos crónicos, puede ocurrir que no exista enfermedad aparente, o sólo se presenta fiebre de origen desconocido y de leve a severa conjuntivitis <sup>9</sup>.

### **2.7.2. Forma anictérica**

Constituye de 90 a 95% de los casos y clínicamente, presenta 2 fases <sup>16</sup>:

- Fase 1 (infecciosa). Dura de 4 a 9 días. Hay instalación abrupta de cefalea, fiebre alta, escalofríos y mialgias severas, sobre todo en los miembros inferiores, en ocasiones acompañadas de hiperestésias. La anorexia, las náuseas y el vómito ocurren en la mitad o más de los pacientes. Hay conjuntivitis y exantema que puede ser maculopapular, macular o urticarial. La hepatoesplenomegalia puede ocurrir, pero es más bien rara. Esta fase coincide con la presencia de la leptospira en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la sangre.
- Fase 2 (inmune). Aparece después de un período corto de 2 a 3 días de disminución importante de síntomas y fiebre (corresponde a la aparición de leptospira en la sangre y del LCR), y dura de 1 a 3 días. Las manifestaciones clínicas son más acentuadas que en la fase 1. Hay reaparición de fiebre, casi siempre más baja que la fase 1, o puede faltar, y se agrega delirio. Hay cefalea intensa persistente que no responde a analgésicos comunes. Se encuentran mialgias severas que comprometen en especial los gastrocnemios, la región paraespinal, el abdomen y el cuello. También hay adenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia en 15-25% de los casos y erupción. A nivel ocular y en forma característica se presenta fotofobia, dolor, hemorragia conjuntival e iridociclitis.

#### **2.7.2.1. Enfermedad de Stuttgart**

Esta enfermedad está dada por la serovariedad *L. canicola* la cual se caracteriza por presentarse principalmente en caninos adultos de 3 a 8 años, aunque se han realizado aislamientos en animales de hasta 14 años. Tiene un periodo de incubación de 7 días aproximadamente y la signología se inicia con anorexia, polidipsia, emesis frecuente de consistencia mucosida blanquecina, que en su

última fase es de color café oscuro en forma de “taza de café” debida a la sangre digerida, deshidratación marcada, miositis, dolor sublumbar, paresia del tren posterior, renuencia a moverse causada probablemente por inflamación muscular, meníngea o renal. Se observa postración, estupor profundo, somnolencia, adelgazamiento rápido y progresivo de aproximadamente 40% del peso corporal, puede haber fiebre o bien hipotermia progresiva, congestión vascular episcleral y conjuntival, úlceras a lo largo de las encías y raramente halitosis urémica.

El cuadro generalmente cursa con estreñimiento, pero puede haber diarrea con heces sanguinolentas poco abundantes de color vino cada tres o cuatro días, dolor abdominal a consecuencia de la eliminación de urea por el tubo digestivo. Existe alteración renal con consecuente poliuria y posterior oliguria seguida de falla renal y proceso urémico, la respiración es pausada y profunda. En los casos de curso clínico grave, se puede manifestar ictericia poco progresiva de las mucosas y la piel; así mismo, hay taquicardia que evoluciona a una arritmia cardiaca, un estado de coma y posteriormente se presenta la muerte.

La enfermedad dura entre 8 y 10 días, en los casos graves la muerte puede ocurrir entre el tercero y sexto día, con un cuadro hipotérmico progresivo, disnea, cianosis, emesis, congestión episcleral y postración lateral.

Dentro de la variabilidad de los cuadros, se puede observar una forma sobreaguda en 48 a 72 horas con un estado febril de 41°C, emesis, congestión episcleral, disnea, cianosis, postración lateral y muerte que se puede confundir con una intoxicación. Existe también una forma crónica que se manifiesta con uremia sin alteraciones bucales y con poliuria pasajera o bien con una emaciación crónica sin causa aparente.

También se puede presentar en forma asintomática, teniendo el animal un estado físico saludable sin manifestar ningún trastorno clínico, quizá debido a que la leptospira se localiza de inmediato en el riñón y por lo tanto, la leptospiruria y los anticuerpos circulantes son los únicos datos que existen. La mortalidad puede llegar a ser de un 50% <sup>20</sup>.

### **2.7.3. Forma ictérica**

Es una forma más severa de la enfermedad. Por lo general su curso clínico es continuo y no bifásico como la forma anictérica. Los síntomas iniciales son similares a los de ésta, pero en el día tercero o sexto aparece ictericia progresiva con niveles de bilirrubina no mayores de 20mg/dl y fosfatasa alcalina moderadamente elevada. Hay dolor en el hipocondrio derecho, hepatomegalia leve o moderada, y alza de aminotransferasas que raramente excede 5 veces los valores normales <sup>10</sup>.

#### **2.7.3.1. Enfermedad de Weil**

La serovariedad *L. icterohaemorrhagiae* es la causa de un cuadro ictérico grave en caninos, muy semejante a la afección en el hombre. La frecuencia de presentación en el canino es baja (25%) en comparación con la frecuencia de presentación de la serovariedad *L. canicola* (75%). Afecta con mayor frecuencia a animales menores de 2 años. La ruta seguida por la infección y el período de incubación son similares a la infección por canícola, existe un aumento transitorio de la temperatura corporal (febrícula) que generalmente pasa inadvertido. Se observa una presentación súbita y progresiva de ictericia en tres a cuatro días que va de un color amarillo tenue a un color amarillo naranja que se manifiesta en la piel y las mucosas, la orina es amarilla parduzca. Se identifica una debilidad general en miembros anteriores dando apariencia en cachorros de “pata de liebre”; escalofríos, depresión, anorexia, emesis de cuatro a cinco veces al día con sangre fresca, polidipsia, emaciación del 40% del peso, deshidratación, hemorragias petequiales y/o equimóticas en conjuntiva y cavidad oral, existe una congestión conjuntival, úlceras y halitosis en cavidad oral. Hay dolor abdominal marcado con constipación inicial, moco y presencia de sangre fresca que puede ser seguida por diarrea; en cachorros se puede presentar intususcepción intestinal.



Figura 6. Fase icterica en caninos a causa de la serovariedad *L. icterohaemorrhagiae* <sup>9</sup>. Presencia de color amarillo-naranja en las encías del canino.

En cachorros se observa una descarga nasal que pasa de transparente a mucopurulenta con presencia de sangre, estado de shock y muerte. A pesar de existir daño hepático, no es posible palpar el hígado. Dentro de la variabilidad de cuadros clínicos podemos encontrar un trastorno respiratorio con trastornos disneicos, congestión episcleral y fiebre. Es una enfermedad que rara vez se torna crónica, la muerte generalmente suele ocurrir a los cuatro o cinco días de iniciados los signos clínicos, la mortalidad puede ser de un 100%.

La presencia de ictericia en la leptospirosis canina no es un signo patognomónico, en los casos clínicos se menciona una frecuencia del 10%. Al considerar que existe relación entre ictericia clínica (2-3mg/dl) y serológica, la presencia de ictericia en sueros para diagnóstico nos permitirá inferir la frecuencia de la enfermedad e inclusive la serovariedad involucrada <sup>20</sup>.

## 2.8. Lesiones características en tejidos y órganos

### 2.8.1. Lesiones macroscópicas

En estudios post mortem se observan hemorragias difusas a nivel de los tejidos, además de las ostensibles hemorragias externas (epistaxis, hemoptisis, hematemesis, melenas). La nefritis intersticial focal y necrosis tubular aguda, también focal, se han relacionado a la migración de leptospiras a través del riñón y al depósito de antígenos. El daño capilar pulmonar conduce a fallo respiratorio agudo y hemoptisis. Se han observado miocarditis intersticial y arteritis coronaria. En el músculo esquelético se ven áreas de necrosis hialina y hemorragias <sup>24</sup>.

Principales lesiones de los órganos más afectados <sup>10</sup>.

- **Hígado:** Se debe sobre todo a una disfunción hepatocelular usualmente sin necrosis o con ataque estructural leve. Los cambios microscópicos no son diagnósticos y se correlacionan poco con el grado de compromiso funcional. Estos cambios incluyen: edema de hepatocitos, disrupción de cordones hepáticos, agrandamiento de las células de Kupffer y estasis biliar canalicular, lo que explica en buena parte la ictericia en algunos pacientes. Las espiroquetas se pueden encontrar en el hígado de 25 a 30% de los casos.
- **Riñón:** La falla renal es principalmente consecuencia de lesiones tubulares. Este daño parece ser originado en isquemia renal por hipovolemia e hipotensión por pérdida del volumen intravascular, debido al compromiso endotelial o por algún efecto tóxico directo de la leptospira. La leptospira se visualiza con frecuencia en el lumen de los túbulos. En los casos graves hay edema intersticial e infiltrado celular de linfocitos, neutrófilos, histiocitos y células plasmáticas.
- **Músculo:** Los músculos voluntarios, en especial los miembros inferiores, presentan lesiones características que consisten en necrosis de fibras, vacuolización, hialinización e infiltrado inflamatorio.

- **Meninges:** Durante los primeros días se puede encontrar la leptospira en el LCR, pero los signos meníngeos están ausentes, y se presentan en la segunda fase de la enfermedad cuando se han producido anticuerpos, lo que significa irritación meníngea inmunológica.
- **Ojos:** Manifestaciones oculares pueden derivar amorbilidad significativa. Durante la fase aguda de la enfermedad, la congestión conjuntival es un hallazgo clínico común. Uveítis es una secuela poco probable <sup>26</sup>.
- **Sistema gastrointestinal:** Como hallazgos aislados se puede encontrar peritonitis y pancreatitis.
- **Corazón:** Se han encontrado bloqueos, miocarditis, arteritis coronaria, aortitis, pericarditis y endocarditis. Se cree que una fracción glicoprotéica de la célula leptospiral es la responsable de estos disturbios rítmicos, ya que podría inhibir la bomba sodio potasio ATPasa<sup>26</sup>.

### 2.8.2. Lesiones microscópicas

Las lesiones son localizadas en el cerebro, médula espinal, corazón, pulmones y riñones <sup>27</sup>:

- Miocarditis y encefalitis no supurativa, necrosante, multifocal.
- Focos centrales de necrosis rodeados por células inflamatorias (células gliales y mononucleares).
- Encefalitis multifocal con focos de gliosis o necrosis, los cuales están ocasionalmente mineralizados e inflamados.
- En el músculo esquelético y en el corazón se encuentran taquizoítos intracelulares, además, en este último, se observan en las fibras de Purkinje y las células endoteliales.
- Lesiones de necrosis hepática multifocal.
- Nefritis intersticial crónica no supurativa.
- Neumonía intersticial.
- Adenitis adrenal.

Dentro de las lesiones microscópicas la nefritis intersticial crónica en riñón y la necrosis hepática multifocal en hígado representan las lesiones más comunes provocadas por leptospirosis debido al curso de la infección y la patogenia de la leptospira<sup>28 27 24 8</sup>.

### 2.8.2.1. Nefritis intersticial

Las nefropatías intersticiales son aquellas enfermedades que afectan de forma predominante al intersticio renal. Aunque pueden encontrarse afectados en mayor o menor medida todos los integrantes del parénquima renal (glomérulos, túbulos, intersticio y vasos), se requiere que la agresión patogénica y la mayor lesión estructural se localicen en el intersticio para calificar como intersticial una determinada afección renal.

La nefritis intersticial se caracteriza por la presencia de infiltrados inflamatorios y edema en el intersticio, generalmente asociado a un deterioro de la función renal.

En las biopsias renales predominan las lesiones de atrofia tubular y fibrosis intersticial, siendo los focos de infiltrados celulares intersticiales muchos más aislados que en las formas agudas. Según va progresando la gravedad de las lesiones tubulo intersticiales, son más frecuentes las alteraciones glomerulares: fibrosis periglomerular y glomerulosclerosis global. Los vasos presentan un engrosamiento fibrointimal progresivo<sup>28</sup>

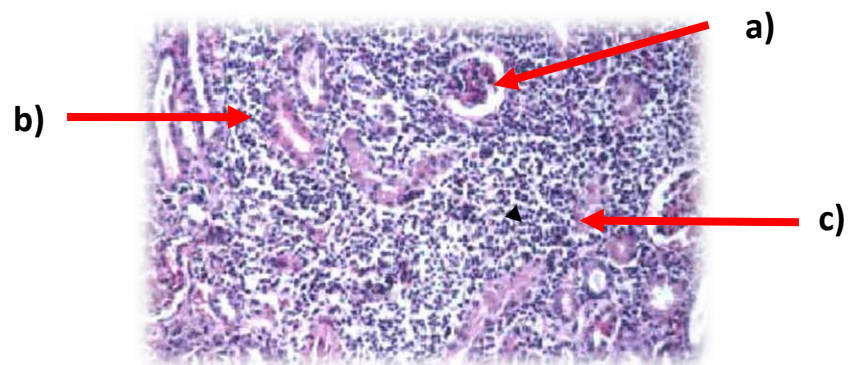


Figura 7. Nefritis intersticial, infección por *L. canicola*, Tinción H&E, 25x<sup>9</sup>, a) presencia infiltraciones celulares dentro del glomérulo, b) túbulo atrofiado, c) zona con infiltraciones celulares en el intersticio renal.



### 2.8.2.2. Hepatitis necrótica multifocal

Hepatitis necrótica multifocal o necrosis hepática multifocal se presenta cuando un agente etiológico genera daño celular en el hígado, no implica necesariamente la degeneración completa del hígado, sino la degeneración y/o necrosis de áreas extensas de parénquima que afectan a agrupaciones variables de lobulillos hepáticos completos.

La microscopía muestra zonas necróticas extensas y dispersas por el hígado. La necrosis hepática suele ser la consecuencia de un agente tóxico, por endotoxinas que inducen la necrosis hepatocelular. La forma ictericia del cuadro clínico de la leptospirosis se asocia con la necrosis hepática multifocal no grave <sup>5 29</sup>.

Durante el período de invasión tisular la leptospira puede provocar necrosis hepática como así también capilar y daño de células endoteliales. Como consecuencia, hemorragias petequiales podrían ocurrir en el parénquima renal junto con daño vascular y nefritis intersticial <sup>9</sup>.

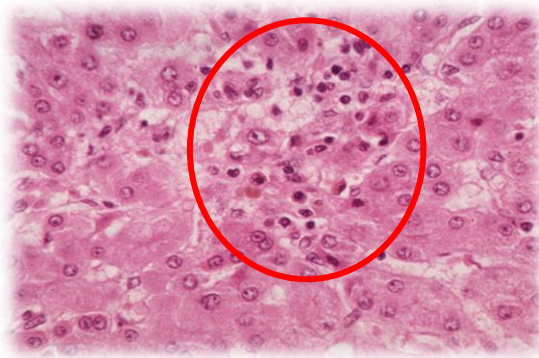


Figura 8. Hepatitis necrótica multifocal <sup>30</sup>, pequeña zona que muestra la presencia de infiltraciones celulares.

## 2.9. Factores de virulencia

Una vez que la leptospira entra al hospedador desarrollan una leptospiremia con la consecuente diseminación a todos los órganos incluyendo el líquido cefalorraquídeo. La multiplicación se lleva a cabo en la sangre y los tejidos.

Las leptospiras alteran el endotelio de los capilares resultando en una vasculitis la que juega un papel importante en las manifestaciones de la enfermedad. Los riñones y el hígado son los órganos más afectados, aunque cualquier tejido puede estar comprometido <sup>19</sup>.

Los posibles factores de virulencia que podrían explicar las diferencias entre las infecciones leves, autolimitadas y las infecciones más severas en los seres humanos, podrían ser la producción de toxinas, adherencia, algunas proteínas de superficie y sus mecanismos inmunes <sup>5</sup>.

### 2.9.1. Producción de toxinas

La actividad endotóxica ha sido reportada en varias serovariedades. En algunos ensayos biológicos realizados, las preparaciones de lipopolisacáridos (LPS) de leptospira exhiben la actividad de una endotoxina pero a muy bajo nivel.

La serovariedad *L. pomona* se ha caracterizado por la producción de una enfermedad hemolítica en ganado; mientras que la serovariedad *L. ballum* la causa en hámster <sup>21</sup>.

Las hemolisinas de varias serovariedades como *L. ballum*, *L. hardjo*, *L. pomona* y *L. tarassovi*; son esfingomielinasas. Algunas serovariedades virulentas exhiben quimiotaxis con respecto a la hemoglobina. En serovariedades como *L. pomona* y *L. copenhageni* elaboran una proteína (citotoxina) detectándose actividad citotóxica en el plasma de animales infectados. *In vivo*, la presencia de esta toxina, tiene un efecto histopatológico típico, con infiltrado de macrófagos y células polimorfonucleares. La invasión en el líquido cefalorraquídeo y el humor acuoso

del ojo puede estar facilitada por la acción horadante del par de flagelos axiales y la liberación de hialuronidasa. Algunos estudios realizados en ratones sugieren que el derrame capilar y las hemorragias son el resultado de la ruptura endotelial de las membranas celulares de los vasos de pequeño calibre por la intercalación de una toxina glucoproteíca, que desplaza los ácidos grasos de la cadena larga del hospedero requerido para mantener la integridad de la pared de las células vasculares.

Sin tener en cuenta el mecanismo, las lesiones petequiales reflejan una vasculitis sistémica, lo que permite la migración y proliferación de las espiroquetas en casi todos los órganos y tejidos, y son responsables de un amplio espectro de enfermedades clínicas. Puede suceder una lesión vascular severa, que causa, por ejemplo, hemorragia pulmonar, isquemia de la corteza renal que conduce a una necrosis de las células epiteliales tubulares y destrucción de la arquitectura hepática que produce ictericia y lesión hepática con necrosis o sin ella <sup>22</sup>.

### **2.9.2. Adherencia**

Las leptospiras se adhieren al epitelio renal de células *in vitro*, y su adhesión es aumentada por concentraciones aglutinantes de anticuerpos homólogos. Las bacterias son fagocitadas por macrófagos en presencia de un anticuerpo específico. Las leptospiras llegan a estar asociadas con los neutrófilos pero no son eliminadas; se cree que en su membrana externa las leptospiras poseen un componente antifagocítico por lo que no son eliminadas y favorecen la infección <sup>21</sup>.

### **2.9.3. Proteínas de superficie**

La membrana externa de las leptospiras está constituida por LPS y varias lipoproteínas o proteínas de membrana externa. El lipopolisacárido desencadena reacciones inmunológicas importantes y es el responsable de la especificidad de la serovariedad.

Se ha demostrado una relación inversa entre la expresión de las proteínas de membrana externa transmembrana y virulencia. Se ha demostrado que una lipoproteína de la membrana externa la LipL36 tiene la propiedad de evadir la respuesta inmune. Los componentes de la membrana externa pueden ser importantes en la patogénesis de nefritis intersticial. Una fibronectina de unión a proteínas fue identificada recientemente <sup>23</sup>.

#### **2.9.4. Mecanismos inmunes**

La respuesta inmune está implicada en la patogénesis de la leptospirosis, como la formación de inmunocomplejos, liberación de citoquinas y vasculitis autoinmune. Es así que los signos y síntomas del compromiso pulmonar, renal y hepático aparecen en la fase inmune cuando las aglutininas específicas comienzan a ser detectadas. También la trombocitopenia se atribuye a ese mecanismo <sup>24</sup>.

La respuesta inmune humoral de los seres humanos está dirigida contra los epítopes de la cadena lateral del LPS de la envoltura externa; los antígenos de LPS desencadenan la producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG los cuales se unen de una manera específica con los epítopes, o reaccionan de manera cruzada con la serovariedad o serovariedades, causando infección. Después de la opsonización y la fagocitosis posterior en el pulmón y el hígado, las espiroquetas se eliminan de la circulación por el sistema reticulo endotelial; la rapidez de la depuración de las leptospiras es de importancia pronostica.

Los antígenos de superficie pueden desempeñar algún papel, ya que ciertas serovariedades se asocian con enfermedad leve (*L. ballum*, *L. canicola*, *L. hebdomadis*, *L. hardjo*, *L. hyos*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, y *L. tarassovi*), mientras que otras serovariedades como los miembros del serogrupo *L. Icterohaemorrhagiae* (*L. copenhageni*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. lai*, *L. australis*, *L. autumnales* y *L. pyrogenes*) se asocian con la enfermedad más severa. Factores físicos como extremos curvos o en forma de gancho y la movilidad también puede desempeñar un papel, ya que estas características se pierden de

manera gradual después del cultivo en el laboratorio, lo que da origen a microorganismos menos virulentos <sup>5</sup>.

Los perros en diferentes partes del mundo posiblemente se ven infectados por muchas serovariedades diferentes, pero la prevalencia local varía. El desarrollo de la inmunidad protectora hacia leptospirosis se cree que está asociada con la opsonización y anticuerpos bactericidas dirigidos hacia LPS y antígenos proteicos asociados. La leptospira induce inmunidad de tipo humoral que protege solo frente a la serovariedad infectante <sup>24</sup>.

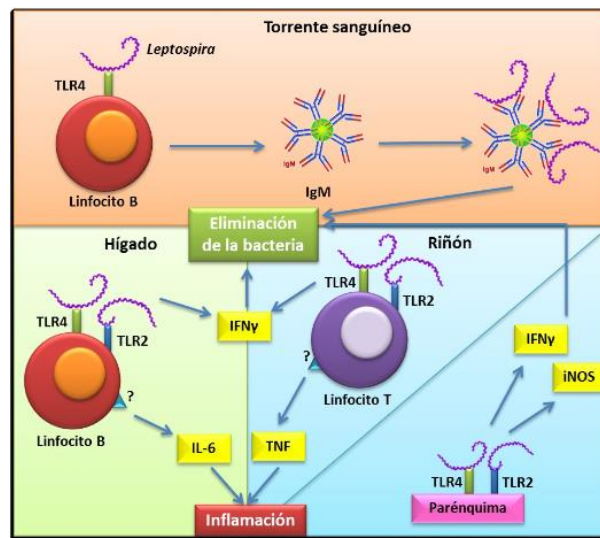


Figura 9. Modelo murino propuesto en la eliminación de *Leptospira* <sup>25</sup>. En el torrente sanguíneo, la infección con leptospira estimula las células B y lleva a la producción de TLR4 de IgM específica anti-LPS, que puede opsonizar la bacteria y promover su fagocitosis y muerte. Esta activación resulta en la producción de IFN $\gamma$ , el cual promueve la fagocitosis y muerte de la bacteria.

La localización de leptospiras en los túbulos proximales renales, y su supervivencia en el fluido cerebroespinal (CSF) y humor vítreo del ojo en algunos animales infectados, refleja la inhabilidad de los anticuerpos para penetrar en aquellos sitios sin causar inflamación.

La protección contra leptospirosis está relacionada al nivel de anticuerpos aglutinantes y/u opsonizantes de anticuerpos <sup>9</sup>.

## **2.10. Métodos de diagnóstico**

### **2.10.1. Métodos directos**

Este tipo de métodos son aquellos que tienen como objetivo evidenciar la leptospira, como agente causal de la enfermedad:

- Aislamiento bacteriológico.
- Observación directa al microscopio en campo oscuro y contraste de fases
- Inmunofluorescencia directa.
- Tinciones histopatológicas. Detección de estructuras compatibles con *Leptospira sp*
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **2.10.1.1. Aislamiento bacteriológico**

Las muestras para cultivo deben ser múltiples y tomadas según el estadio de la enfermedad; en la primera semana, de sangre y de LCR, y de la segunda semana en adelante, de orina. Las muestras se deben inocular en medios de cultivo medio EMJH y/o el medio Tween 80-albúmina <sup>10</sup>. El cultivo tiene el inconveniente de ser muy largo (5-6 semanas de incubación).

#### **2.10.1.2. Observación directa al microscopio en campo oscuro y contraste de fases**

La microscopía de campo oscuro se utiliza en muestras de sangre, suero, sedimento de orina, líquido cefalorraquídeo o en sedimento de mezclas de tejidos. En manos experimentadas es muy valiosa. En ocasiones, la leptospiremia es escasa y pueden no ser visualizadas las leptospiras o, por el contrario, ser confundidas con restos de fibrina u otros artefactos que poseen movimiento Browniano y se asemejan a leptospiras <sup>31</sup>.

### **2.10.1.3. Inmunofluorescencia directa**

A menudo el examen de orina con microscopio de campo oscuro es inconcluso. El examen del sedimento de orina centrifugada mediante anticuerpos inmunofluorescentes es una prueba más definitiva y las leptospiras no necesariamente deben estar viables<sup>9</sup>.

### **2.10.1.4. Tinciones histopatológicas; detección de estructuras compatibles con *Leptospira sp***

En tejidos recuperados por biopsia y necropsias se realizan cortes histológicos de tejido renal, hepático y feto/placentario, en los cuales se podrán realizar las tinciones histopatológicas que permitan evidenciar estructuras compatibles con leptospira. Las coloraciones más empleadas para este diagnóstico son la impregnación argéntica (tinción de plata de Warthin-Starry) y la tinción de Giemsa<sup>9</sup>.

### **2.10.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En la actualidad se cuenta con pruebas de diagnóstico específicas como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual tiene una alta especificidad.

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA de *Leptospira sp* durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. La reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células<sup>32</sup>.

Los elementos que componen la reacción son; el templado o molde (DNA), la enzima *Taq Polimerasa*, los oligonucleótidos o *primers*, los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg<sup>+</sup>), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O libre de DNAasas y RNAsas. Los elementos interactúan en tres etapas principales de las que se

compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.

Al término del proceso; para corroborar la amplificación de la secuencia de interés, los productos de la PCR (amplicones) son analizados en geles de agarosa o acrilamida; la reacción se revela en el gel con ayuda de un intercalante de ácidos nucleídos el cual permite visualizar el producto de la reacción, a este proceso se le denomina PCR-PF (Punto Final), el cual hace referencia a la lectura realizada al finalizar el proceso de PCR, existen otros tipos de PCR como Q-PCR (PCR en tiempo real) en el cual se utilizan fluorómeros los cuales permiten detectar y visualizar la reacción en tiempo real mediante un programa informático, por otro lado el PCR Multiplex permite agregar hasta tres pares de *primers* permitiendo así diferenciación entre serovariedades <sup>32</sup>.

La PCR detecta por amplificación, el DNA de las espiroquetas en muestras de sangre, orina, humor acuoso y líquido cefalorraquídeo (LCR), e incluso tejidos. Esta técnica es una excelente opción para la detección temprana de leptospirosis.

En el genoma de *Leptospira*, se han detectado amplificaciones de segmentos de DNA de los genes 16S rRNA y 23S rRNA por PCR para la identificación específica de leptospirosis patógenas y de 23S rRNA para otros géneros de *Leptospiras* <sup>33</sup>.

La amplificación del DNA usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una excelente técnica diagnóstica, debido a la rapidez con que provee el resultado, y a su alta sensibilidad <sup>5</sup>.

Una limitación del diagnóstico por PCR de la leptospirosis es la incapacidad de la mayoría de los análisis de PCR para identificar la serovariedad. Esto no es significativo para el tratamiento de paciente, pero tiene un gran valor en la epidemiología y la salud pública <sup>13</sup>.



## **2.10.2. Métodos indirectos**

Este tipo de métodos son aquellos que tienen como objetivo determinar la leptospirosis, por medio de otros parámetros relacionados con la patogenia de la leptospira. Como un ejemplo aquí se presentan los métodos serológicos para la determinación de la enfermedad.

### **2.10.2.1. MAT. Microaglutinación**

La técnica de Microaglutinación MAT es una prueba que determina los anticuerpos aglutinantes en el suero mediante la mezcla de varias diluciones de éste contra cepas de serovariedades de leptospiras vivas o muertas. Los anticuerpos anti-leptospiras presentes en el suero hacen que las leptospiras se peguen unas a otras formando grumos. Este proceso de agrupamiento es llamado aglutinación y es observado usando microscopía de campo oscuro. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG <sup>34</sup>.

La batería que se usa como antígeno está representada por las serovariedades más prevalentes del área. Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos en el suero, identificar los aislamientos, clasificar cepas y servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad <sup>35</sup>.

### **2.10.2.2. ELISA**

Es un test género-específico. El antígeno, preparado con *L. interrogans*, puede reaccionar con el suero resultante de la infección con leptospiras de 11 serogrupos. Usando diferentes conjugados de peroxidasa puede determinarse tanto IgG como IgM. Los anticuerpos IgM comienzan a detectarse alrededor de 1 semana después del inicio de la enfermedad y se mantienen títulos altos después de 4 a 6 semanas; después, gradualmente, bajan a lo largo de varios meses. Los anticuerpos IgG pueden detectarse un poco más tarde que los IgM; se encuentran después de unas pocas semanas y caen poco a poco, con los años. La detección de anticuerpos específicos IgM con una sola muestra es confirmatoria de infección

reciente por leptospiras. Cuando se utilizan antígenos de leptospiras no patógenas (de amplio espectro de reactividad), no se podrá detectar la serovariedad causante de la infección. En general, el test de ELISA se hace positivo más temprano durante la infección que la MAT, se aprecia una sensibilidad baja del 15% y una excelente especificidad del 91% al 96% tanto en la fase aguda como en la convaleciente de la enfermedad <sup>31</sup>.

### **2.10.2.3. Detección de lesiones sugerentes de leptospirosis (tinciones histológicas):**

La histopatología es una prueba que ayuda a determinar lesiones en tejidos, por medio de cortes histológicos teñidos. Las lesiones sugerentes de leptospirosis son la nefritis intersticial crónica y la hepatitis necrótica multifocal. Sin embargo estas lesiones pueden tener diferentes causas como lo son:

- Nefritis intersticial inducida por fármacos.
- Nefritis intersticial relacionada con infecciones.
- Formas idiopáticas (síndrome de nefritis túbulo intersticial y uveítis,
- Nefropatías por anticuerpos
- Nefritis intersticial asociada con sarcoidosis y otras enfermedades sistémicas.
- Nefritis intersticial asociada a productos tóxicos
- Nefritis intersticial asociadas a alteraciones metabólicas
- Nefritis intersticial asociadas a procesos glomerulares y proteinuria crónica

Este tipo de ensayos deben concordar con la historia clínica y la confirmación de leptospirosis por medio de otras técnicas,

## 2.11. Tratamiento

Las leptospiras son sensibles a la mayoría de los antibióticos. En el tratamiento para caninos los antibióticos recomendados son penicilina G procaínica (40,000 a 60,000UI/kg vía intramuscular o vía subcutánea cada 24 horas o dividido cada 12 horas), dihidroestreptomicina (10-15mg/kg vía intramuscular o vía subcutánea cada 12 horas o 25 mg/kg cada 24 horas), tetraciclinas (5-10mg/kg vía intramuscular cada 12 horas) y doxiciclina (2.5 a 5 mg/kg vía oral cada 12 horas y posteriormente cada 24 horas.) durante dos semanas como terapia alternativa, cuando los animales toleran la medicación oral. Hay que considerar que la penicilina no quita el estado de portador a diferencia de la estreptomicina y doxiciclina, la primera es el antibiótico de elección a pesar de su nefrotoxicidad, la segunda se sugiere posterior al tratamiento parenteral con beta-lactámicos o cualquier otro antibiótico diferente a los recomendados. La combinación, el cambio de medicamento, así como los días de tratamiento que son 15 en promedio, dependerán principalmente de la evolución del estado hepático y renal del paciente, así como del criterio del médico <sup>20</sup>.

El tratamiento para el humano la penicilina es la más efectiva, cuando se administra tempranamente. En los pacientes graves debe iniciarse el tratamiento con penicilina G (1,5 millones de unidades cada 6 horas) o ampicilina (500-1000mg cada 6 horas) por vía endovenosa, aun si el paciente lleva varios días con la enfermedad. Otro régimen recomendado antes de que ocurra la ictericia son grandes dosis de penicilina cristalina (6 a 8 millones de unidades) en dosis divididas por vía endovenosa durante 5 a 7 días o 4 a 5 millones diarios a partes iguales, de penicilina cristalina y procaínica por vía intramuscular. En casos menos graves, en que los pacientes toleran la vía oral, se puede emplear la doxiciclina (100mg dos veces al día), ampicilina (500-750mg cada 6 horas). La doxiciclina en una dosis de 200mg semanal se utiliza con éxito en la prevención de esta enfermedad <sup>31</sup>.

## 2.12. Prevención

La prevención de zoonosis para el humano se basa en la vacunación de las especies afectadas por la leptospirosis. La vacunación con las serovariedades más prevalentes en la zona son el métodos más utilizado para la prevención.

Las vacunas actualmente utilizadas en perros y otros animales en la mayoría de los países contienen las serovariedades *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*. En vacunas más recientes *L. grippityphosa* y *L. pomona* han sido agregadas. Vacunas más viejas pueden producir inmunidad la cual es adecuada para suprimir la invasión sistémica por serovariedades homólogos, pero no para prevenir la colonización renal de un perro, resultando en un estado de portador renal.

La protección aportada por bacterinas de célula completa es corta (alrededor de 9 meses) sugiriendo que perros con alto riesgo de infección requieran refuerzos al menos dos veces al año.

La investigación actual sobre vacunas está enfocada hacia los productos de la subunidad y su objetivo es determinar que fracción ó fracciones de la pared celular de la leptospira son inmunogénicas y protectoras sin ser tóxicas al animal. Una vacuna ideal reduciría el índice de reacciones adversas, y así mismo produciría protección contra ambas serovariedades homólogos y heterólogos<sup>9</sup>.

La leptospirosis es una zoonosis que para prevenirse y controlarse requiere acciones conjuntas de los sectores público, social y privado, a través de promoción de la salud, saneamiento básico, atención médica, capacitación del personal de salud y vigilancia epidemiológica. Dentro de las medidas a tomar se encuentran las siguientes:

- Realizar consulta médica a toda persona con sospecha y probabilidad de la enfermedad.
- Tratamiento de los casos sospechosos de acuerdo a NOM-029-SSA2. Para la vigilancia Epidemiológica, prevención y control de la "Leptospirosis".

- Verificación de casos con definición operacional de caso probable de Leptospirosis para establecer el diagnóstico inicial.
- Notificación inmediata a la jurisdicción sanitaria de los casos de Leptospirosis, en las primeras 24 horas de su detección por los servicios de salud en cualquiera de los casos probables o confirmados.
- Tabulación, registro y envío correspondiente en el Informe Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades de la totalidad de los casos probables a través del "Informe Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades".
- Elaboración del Estudio Epidemiológico de Caso.
- Toma de muestras al 100% de los casos probables para envío a la jurisdicción sanitaria, así como para el diagnóstico confirmatorio.
- Envío oportuno y en condiciones óptimas las muestras de casos probables de Leptospirosis.
- Notificación inmediata de brotes por el medio más expedito.
- Participación de especialistas en la investigación de brotes.
- Participación del sector salud en la clasificación de los casos y defunciones en el seno del Comité Jurisdiccional de Vigilancia Epidemiológica u homólogo.
- Difusión de la información sobre la situación de Leptospirosis en el país.
- Evaluar el impacto de las acciones de control.
- Elaborar y difundir avisos y alertas epidemiológicas de riesgos a la salud de la población.

### **2.13. Situación actual en México**

En México las acciones de vigilancia en humanos se apoyan en la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública (RNLSP) de la cual el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) es el laboratorio de referencia. En el InDRE se realiza el diagnóstico con un panel de 19 serovariedades de

Leptospiras, los laboratorios estatales solo trabajan aquellas serovariedades con mayor prevalencia en su región.

En nuestro país, la NOM-029-SSA2-1999 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano, hace referencia a la leptospirosis como una enfermedad de notificación semanal, a través del formato denominado "Informe Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades", en caso de brotes, se debe notificar de manera inmediata en los formatos que establece el órgano normativo nacional la NOM-017-SSA2-1994 para la vigilancia epidemiológica. Ambas normas la NOM-017-SSA2-1994 y la NOM-029-SSA2-1999, tienen como objeto establecer las medidas preventivas, de control y vigilancia epidemiológica de la leptospirosis en el humano. Para efecto de estas normas, las actividades se han dividido en medidas de prevención, medidas de control y de vigilancia epidemiológica <sup>17</sup>.

Se cuenta con dos documentos el "Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Leptospirosis" <sup>36</sup> y los "Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de Leptospirosis mediante Aglutinación Microscópica" <sup>37</sup>, que permiten el diagnóstico de leptospirosis en humanos y animales.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través de la Dirección General de Salud Animal (DGSA) cuenta con el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal un conjunto de laboratorio dedicados al diagnóstico de enfermedades virales, bacteriológicas, serológicas y patológicas de los animales, los cuales forman parte de la red nacional de laboratorios de alta especialización que respaldan al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de México. Dentro de estos laboratorios se encuentra el CENID-Microbiología animal en el cual se realiza la técnica de MAT para el diagnóstico serológico de leptospirosis <sup>37</sup>.

La vigilancia epizootiológica en animales se realiza notificando a las autoridades de salud animal la presencia de animales con Leptospirosis, según lo dispuesto en

la NOM-046-ZOO-1995 y al Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica (SIVE) dependiente de SAGARPA.

Para efectos de la vigilancia epizootiológica a nivel nacional e internacional, el Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica está interrelacionado con sistemas de vigilancia internacional como: la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y otras instituciones nacionales e internacionales que estén involucradas, directa o indirectamente, con la sanidad animal del país <sup>38</sup>.

La prevención de la leptospirosis en la población general se lleva a cabo mediante actividades de promoción de la salud, saneamiento básico, protección de grupos en riesgo, así como de animales domésticos y de interés económico. Las medidas de control que se llevan a cabo en la población general; comprenden el diagnóstico y el tratamiento oportuno de los enfermos.

Sin embargo en México existe un sub-registro de casos debido principalmente a:

- Diagnósticos difíciles de confirmar.
- Puede ser confundida con otras enfermedades.
- La enfermedad puede ser leve y no ser investigada en el laboratorio.

### 3. Justificación

En México la leptospirosis en animales es común en áreas con altos índices de precipitación las cuales provocan acumulaciones de agua propiciando un ambiente óptimo para la leptospira, en las áreas marginadas y con falta de conocimiento sobre buenas prácticas de manejo zootécnico, bioseguridad y conservación del medio ambiente se propicia la diseminación hacia otros animales y al humano, los cuales se contagian al entrar en contacto con la orina de animales infectados o un ambiente contaminado <sup>34 39</sup>.

En México, como en el resto del mundo, los perros son mascotas domésticas comunes tanto en zonas urbanas como rurales. Debido a los hábitos de comportamiento de los perros como son el olfateo, el lengüeteo y el cortejo, al reunirse varios animales se favorece la transmisión intraespecie; siendo los perros "callejeros" una fuente de infección importante para los perros "domiciliados". En las zonas marginadas existe una gran cantidad de perros y roedores que son una fuente potencial de diseminación de la *Leptospira* entre estas especies y también al humano <sup>20</sup>.

La información epidemiológica sobre la leptospirosis canina en México es limitada, no se dispone de un análisis real de la situación, los casos se estudian de manera independiente y la existencia de brotes es desconocida <sup>20</sup>.

La importancia de la leptospirosis en humanos radica en las altas tasas de letalidad que puede alcanzar, hasta un 20%<sup>17</sup>, sobre todo cuando no se notifica con oportunidad. Los síntomas en animales como en humanos han sido confundidos con otras patologías febriles, ictéricas y hemorrágicas, por lo cual es importante contar con un panel de pruebas diagnósticas efectivas, rápidas, de alta sensibilidad y especificidad esto con el fin de lograr ofrecer un diagnóstico oportuno, que permita establecer estrategias de prevención y control en los sectores de salud tanto animal como humana.



## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Determinar la presencia de *Leptospira sp* en caninos remitidos al Laboratorio de Patología de la FES Cuautitlán UNAM a través de diferentes técnicas de diagnóstico para contar con un panel de técnicas que permitan establecer un diagnóstico oportuno.

### 4.2. Objetivos específicos

- Detectar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp*. en sueros de caninos con la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT).
- Implementar una prueba de reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR-PF) para el diagnóstico de la leptospirosis en orina y tejidos.
- Determinar la presencia de *Leptospira sp*. en cortes histológicos de hígado y riñón a través de una tinción argéntica. Así como las lesiones compatibles con la enfermedad en tejidos de caninos.
- Realizar el análisis comparativo de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad.

## 5. Hipótesis

Si se cuenta con técnicas de diagnóstico como herramientas para detectar la leptospirosis en caninos con alta sensibilidad y especificidad, entonces se podrá realizar el diagnóstico de la enfermedad de manera eficiente y oportuna.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1. Material biológico

Se tomaron muestras de 54 caninos provenientes del antirrábico de Cuautitlán, Estado de México, provenientes las zonas de: Cuautitlán Izcalli, Cuautitlán de Romero Rubio, Tultitlán y Coacalco. Los cuáles fueron remitidos al Departamento de Patología de la FES Cuautitlán UNAM para las prácticas de Patología General y Patología Sistémica de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Se llevó un registro de las características de los animales como son, raza, sexo y edad las cuales fueron variadas (Anexo A).

A todos los animales se les tomó muestra de sangre con equipo de sistema al vacío, para la obtención de suero. Posteriormente los animales fueron sacrificados de manera humanitaria. Se obtuvo muestra de orina y muestras representativas de hígado y riñón por duplicado para las pruebas de Histopatología y PCR las cuales fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.



Figura 10. Toma de muestra sanguínea y tejidos en caninos, a-b) punción venosa con sistema al vacío en perros, c) Necropsia; obtención de muestras de hígado, riñón y orina, d) hígado textura rugosa, e) riñón corte longitudinal. (García, Romero. 2013).

## 6.2. Técnica de microaglutinación (MAT)

Para el diagnóstico de leptospirosis se utilizó la prueba de Microaglutinación en Placa, descrito por Céspedes M. et al. <sup>40 28</sup>, en la cual se utilizaron 5 diluciones del suero (1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400) contra 5 serovariedades de leptospira (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*, *L. hardjo* y *L. tarassovi*).



Figura 11. Cepario de leptosiras, panel de 5 serovariedades. (García, Romero. 2014)

La microplaca se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y posteriormente se realizó la lectura en el microscopio de campo oscuro.

Los sueros que presentaron aglutinación en 1:400 se titularon para obtener la dilución a la cual presentan aglutinación.

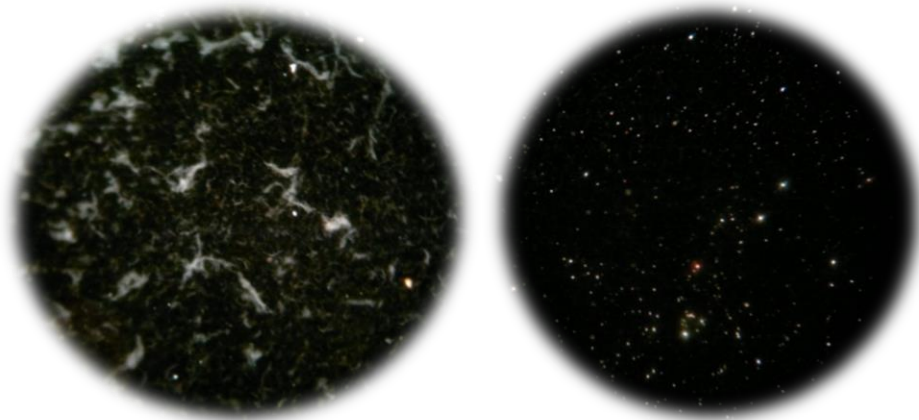


Figura 12. Interpretación de la prueba de MAT. Izquierdo: suero positivo a la prueba MAT con título 1:400, derecha: suero negativo a la prueba MAT. (García, Romero. 2014)

## **6.3. Análisis Histopatológico**

### **6.3.1. Tinción de Hematoxilina – Eosina**

El análisis histopatológico se realizó con secciones representativas de hígado y riñón que se fijaron con formol al 10%, las cuales fueron procesadas a través de su inclusión en parafina, fueron cortadas y teñidas con la técnica de rutina Hematoxilina-Eosina de acuerdo a la NOM-056-ZOO-1995 <sup>41</sup> con el fin de observar las lesiones sugerentes de leptospirosis; Nefritis intersticial crónica no supurativa y/o hepatitis necrótica multifocal.

### **6.3.2. Tinción argéntica (Warthin-Starry)**

Los tejidos que presentaron lesiones sugerentes de Leptospirosis fueron cortadas nuevamente y teñidos con la tinción argéntica de Warthin Starry de acuerdo a A. Putt <sup>42</sup>, la cual permitió la observación de estructuras compatibles con *Leptospira sp.*

## **6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

### **6.4.1. Extracción de DNA**

La extracción de DNA en la orina se llevó acabo de acuerdo al protocolo descrito para un estuche comercial (“Axygen® AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit” de la línea Axxygen Biosciences).

Para la obtención de DNA a partir de tejido se realizó por medio de una técnica a base de CETAB descrito por Casillas I. et al <sup>43 44</sup>, en la cual se maceraron secciones de tejido de aproximadamente 200mg en 500µl de agua grado inyectable, se fraccionaron con lisozima (10mg/ml), proteinasa K (10mg/ml) y SDS al 10%, el DNA se purificó con cloruro de sodio (NaCl) 5M y hexadeciltrimetilbromuro de amonio (CTAB) al 10%. El DNA se extrajo con cloroformo/alcohol

isoamílico y se precipitó con isopropanol absoluto. Se lavó con alcohol etílico al 70%, se resuspendió en 100µl de agua grado inyectable. (Anexo B).

Para los controles positivos se utilizó un lote de 5 cepas de leptospira (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*, *L. hardjo* y *L. tarassovi*). Se utilizó un lote de cultivos bacterianos de *Salmonella suis*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella mellitensis*, como controles negativos.

Todos los controles provienen de un banco de cepas del Laboratorio de Diagnóstico del CENID-Microbiología Animal.

Los controles fueron sometidos a las técnicas de extracción de DNA de acuerdo al protocolo de estuche comercial “Axygen® AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit” de la línea Axxygen Biosciences y a la técnica de extracción a base de CETAB (hexadeciltrimetil-bromuro de amonio).



Figura 13. Extracción de DNA. Izquierda: clasificación e identificación de tubos Eppendorf con muestra de tejido macerado, Derecha: realización del procedimiento de la extracción de DNA a base de CETAB. (García, Romero. 2014)

#### 6.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa – punto final (PCR-PF)

Para detectar la presencia de DNA de *Leptospira* en tejidos y orina, se utilizó la secuencia de iniciadores Lepto F y Lepto R (Eurofins Scientific) descritos por Sánchez E.<sup>5 33</sup>. Los cuales son localizados entre las posiciones 171 y 258 del gen

16S detectando al género *Leptospira sp.* Los iniciadores amplifican un producto de 87pb (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Secuencia de iniciadores Lepto F y Lepto R**

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5' – 3'</b>
Lepto F	CCCGCGTCCGATTAG
Lepto R	TCCATTGTGGCCGAACAC

En la mezcla de reacción de PCR se utilizaron los siguientes componentes:

**Cuadro 2. Componentes de la reacción de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Dream <i>Taq</i> <sup>™</sup> Green DNA Polymerase-Thermo Scientific <sup>™</sup> 2x	12.5µl
Iniciador Lepto F	1µl
Iniciador Lepto R	1µl
Agua libre de DNAsas y RNAsas	7.5µl
Extracción de DNA	3µl
Volumen total	25µl

La concentración de los iniciadores utilizada para el presente trabajo fue de 10µM para las muestras de orina y 2µM para muestras de tejidos.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Thermo Electron Corporation modelo HBPX2110. Con las siguientes condiciones de amplificación

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94	4 min	1
Desnaturalización	90	1 min	40
Alineación	58	1 min	
Elongación	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

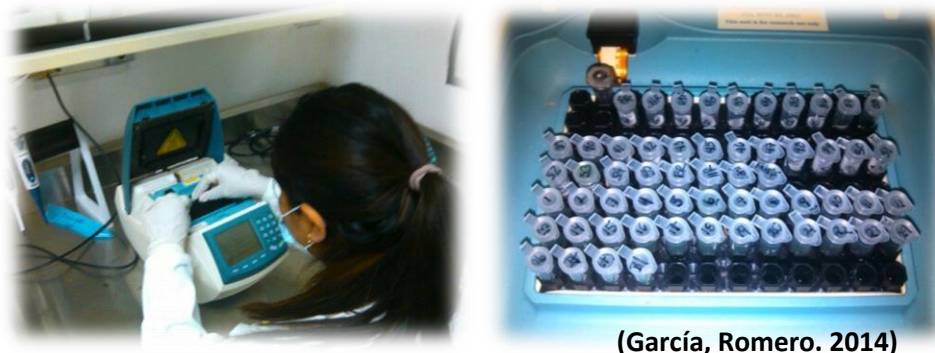


Figura 14. Izquierda: Colocación de microtubos para la reaccion de PCR. Derecha microtubos dentro del termociclador Thermo Electron Corporation modelo HBPX2110.

#### 6.4.3. Electroforesis de los productos de la PCR

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2.5% al cual se agregó una gota de solución de Bromuro de Etidio (0.625mg/ml) como agente intercalante de ácidos nucleicos. Se utilizó el marcador de tamaño; 100bp ladder DNA market-Axygen Biosciences (100-3000bp), para confirmar el tamaño del amplicon. El corrimiento electroforético se realizó en una cámara de electroforesis horizontal a 90 volts durante 35 minutos con solución TAE 1x como solución de corrida. Posteriormente el gel fue visualizado en un transiluminador UV (Anexo C).



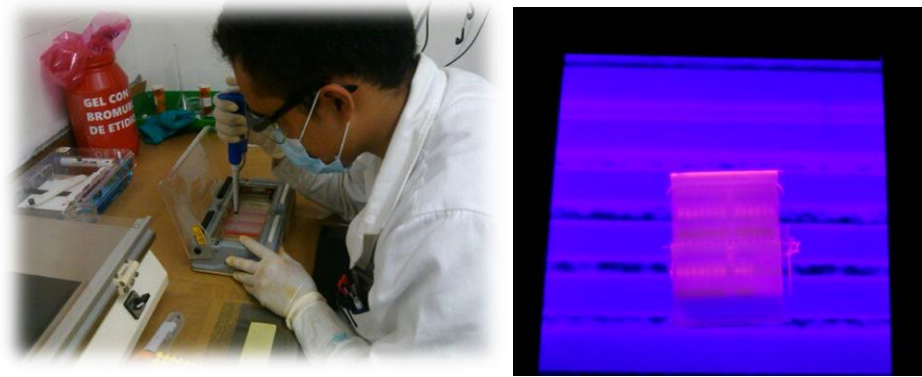


Figura 15. Derecha: Colocación de los productos de PCR en el gel de agarosa en la cámara de electroforesis horizontal. Izquierda: Visualización del corrimiento electroforético en un transiluminador UV. (García, Romero. 2014)

### 6.5. Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de MAT, análisis histopatológico y PCR fueron sometidos al cálculo de índice Kappa ( $k$ )<sup>45</sup> para determinar la concordancia entre las muestras. Se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR con base a la prueba normalizada de MAT.



## 7. Resultados

### 7.1. MAT. Evidencia de anticuerpos

Las 54 muestras de sueros fueron procesadas con la técnica de MAT haciendo uso de un panel de 5 serovariedades de leptospira (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo* y *L. tarassovi*).

De acuerdo a la OIE <sup>46</sup>, WHO <sup>2</sup> y OPS <sup>39</sup>, los suero que presenten aglutinación a una dilución 1:100 se consideran positivos. Obteniendo 18 muestras positivas (Cuadro 4) (Anexo G).

**Cuadro 4. Resultados generales de la prueba microaglutinación en placa de sueros de caninos**

Casos positivos	Casos negativos	Porcentaje de casos positivos	Porcentaje de casos negativos
18	36	33.33%	66.65%
Total de muestras 54		Total:100%	

*L. canícola* y *L. icterohaemorrhagiae* son las serovariedades más frecuentes con un 18.51% cada una (Cuadro 5) (Anexo H).

**Cuadro 5. Frecuencia de serovariedades presente en sueros positivos**

Serovariedad	Números de muestras positivas	Frecuencia (%)
<i>L. canicola</i>	10	18.51
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	10	18.51
<i>L. grippotyphosa</i>	1	1.85
<i>L. hardjo</i>	1	1.85
<i>L. tarassovi</i>	0	0.0

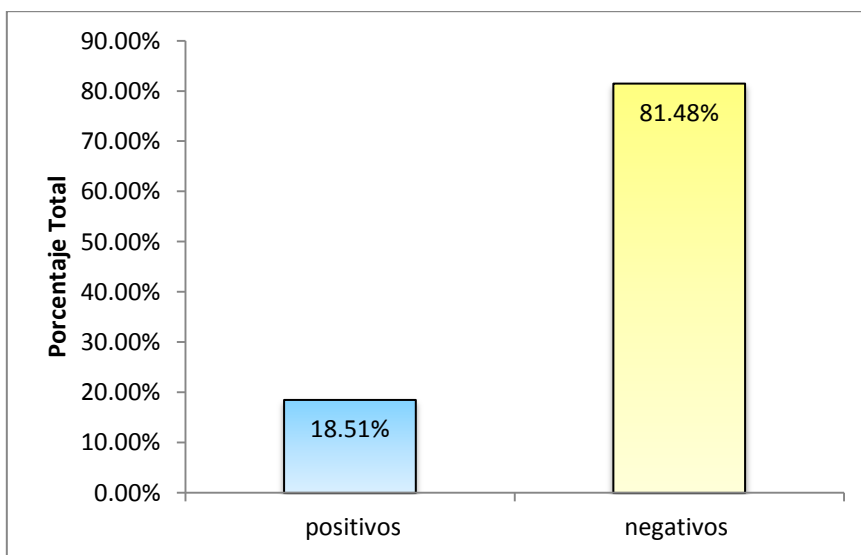
Luna et al. <sup>20</sup> sugiere que títulos de 1:100 a 1:200 son de importancia principalmente en animales no vacunados, títulos mayores a  $\geq 1:800$  son usualmente indicativos de infección.

Para la CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades) un título  $\geq 1:200$  se utiliza para definir un caso probable y en países tropicales incluyendo México se requiere un punto de corte superior a 1:100 necesario para la definición de casos probables de leptospirosis <sup>47</sup>.

Por lo anterior el presente trabajo considero un punto de corte  $\geq 1:200$  como caso positivo a la prueba de MAT. Obteniéndose 18.51% (10/54) de los casos positivos (Cuadro 6) (Figura 16).

**Cuadro 6. Resultados generales de la prueba Microaglutinación en placa de sueros caninos**

Casos positivos	Casos negativos	Porcentaje de casos positivos	Porcentaje de casos negativos
10	44	18.51%	81.48%
Total de muestras 54		Total:100%	

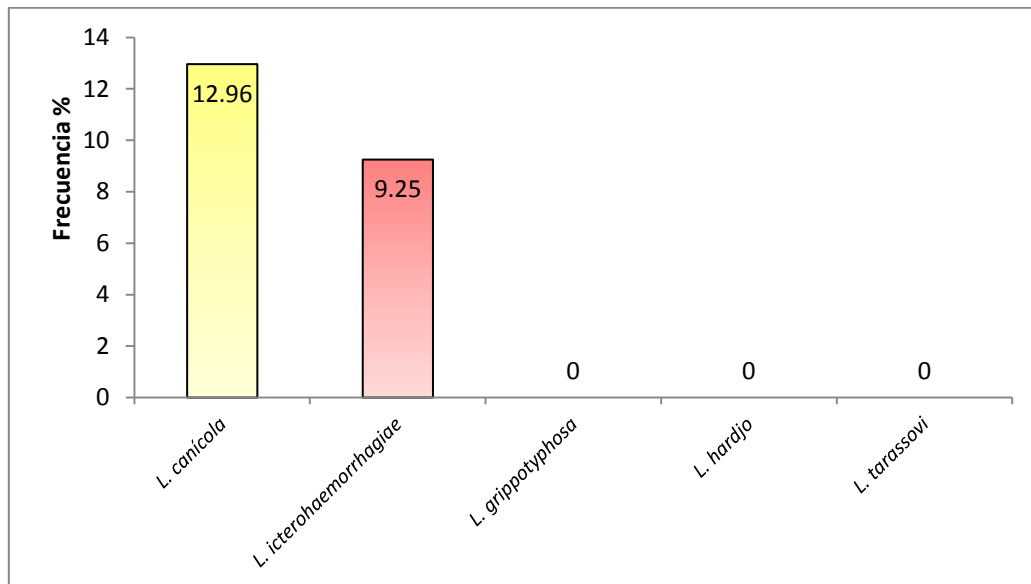


**Figura 16. Resultados generales de la prueba de MAT con punto de corte 1:200, muestras positivas: 10/54, muestras negativas 44/54.**

Para el punto de corte especificado anteriormente, la serovariedad *L. canicola* presenta una frecuencia de 12.96% y *L. icterohaemorrhagiae* de 9.25%.(Cuadro 7) (Figura 17).

**Cuadro 7. Frecuencia de serovariedades presentes en sueros positivos**

Serovariedad	Números de muestras positivas	Frecuencia (%)
<i>L. canicola</i>	7	12.96
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	5	9.25
<i>L. grippotyphosa</i>	0	0.0
<i>L. hardjo</i>	0	0.0
<i>L. tarassovi</i>	0	0.0



**Figura 17. Frecuencia de serovariedad presente en casos positivos a la prueba de MAT, punto de corte 1:200, *L. canicola* 7/54, *L. icterohaemorrhagiae* 5/54, *L. grippotyphosa* 0/54, *L. hardjo* 0/54, *L. tarassovi* 0/54.**

De las 10 muestras positivas, en 8 se encontró presente una serovariedad representando el 14.81%, en 2 casos se encontraron 2 serovariedades diferentes de *L. interrogans* representando el 3.7% (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Frecuencia de las serovariedades de *L. interrogans* presente en sueros positivos**

Número de serovariedades de <i>L. interrogans</i> por caso	Número de animales positivos	Frecuencia (%)
1	8	14.81
2	2	3.70
3	0	0.0

## 7.2. Análisis histopatológico (HP)

### 7.2.1. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Las 54 muestras de hígado y riñón fueron procesadas para la tinción de Hematoxilina-Eosina. Se consideraron positivas aquellas que mostraron lesiones sugerentes de leptospirosis: nefritis intersticial crónica no supurativa (NIC) en riñón y hepatitis necrótica multifocal (HN) en el caso de hígado (Anexo F).

Se determinaron 15 casos positivos en riñón correspondiente al 27.77% del total, en hígado no se encontró lesiones sugerente a Leptospirosis (Cuadro 9) (Anexo I) (Figura 18).

**Cuadro 9. Resultados de la Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)**

	Casos positivos	Casos negativos	Porcentaje de positivos	Porcentaje de negativos
Riñón	15	39	27.77%	72.22%
Hígado *	0	54	0.0%	100%
	Total de muestras 54		Total:100%	

\*50/54 muestras de hígado presentaron congestión hepática aguda por lo que no se logró observar lesiones sugerentes de Leptospirosis. 4/54 muestras no mostraron cambios aparentes.

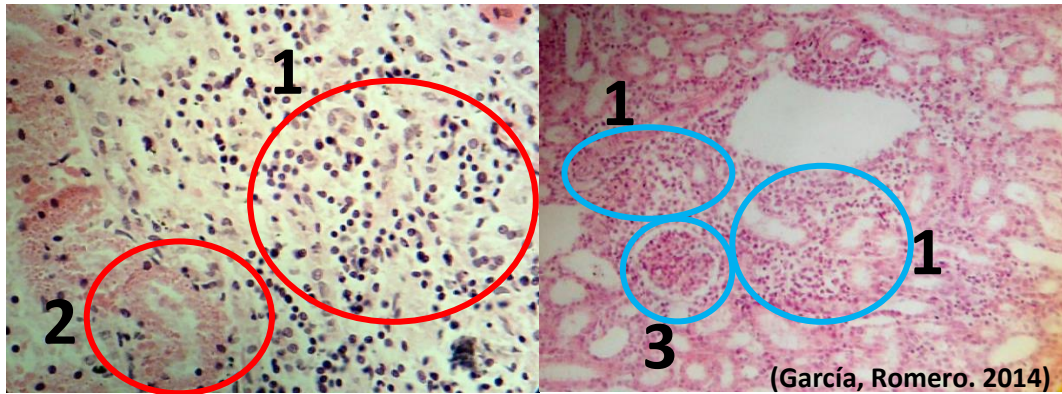


Figura 18. Nefritis intersticial crónica. Corte de riñón, Resultado de la Tinción H-E, 40x. 1) Infiltraciones celulares en el intersticio renal. 2) túbulo nefrosis; daño en túbulo renal. 3) Glomerulitis membrano proliferativa.

Dentro de la observación de laminillas de cortes de riñón se encontraron lesiones no sugerentes de leptospirosis principalmente: Glomerulitis membranosa, Glomerulitis membrano proliferativa, tubulonefrosis (Figura 19). En hígado, el hallazgo más frecuente, fue una congestión hepática generalizada.

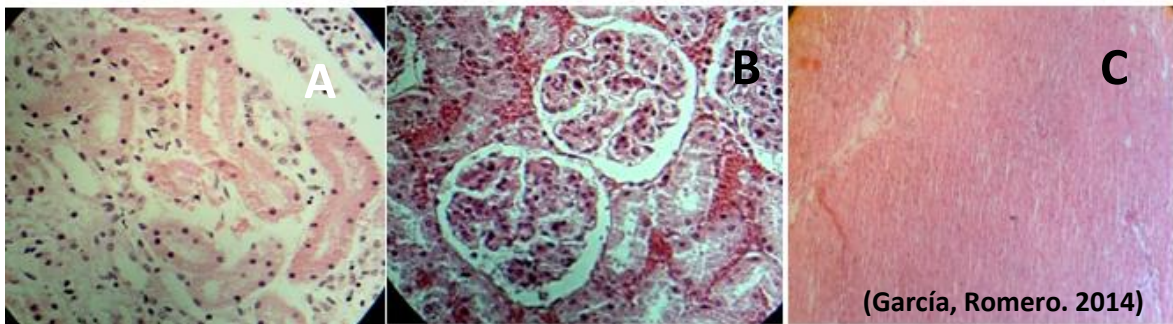


Figura 19. Lesiones encontradas en riñón e hígado no sugerentes a Leptospirosis. A) Tubulonefrosis, B) Glomerulitis membranosa, C) Congestión hepática.

### 7.2.2. Tinción Warthin-Starry (WS)

Las muestras con lesiones sugerentes de leptospirosis fueron procesadas nuevamente mediante la tinción argéntica de Warthin-Starry. Se consideraron positivas aquellas que presentaron estructuras compatibles con *Leptospira sp.*

De un total de 15 muestras que presentaron nefritis intersticial crónica no supurativa (NIC) se encontraron 5 casos positivos a la tinción de Warthin-Starry (Cuadro 10) (Figura 20) (Anexo J).

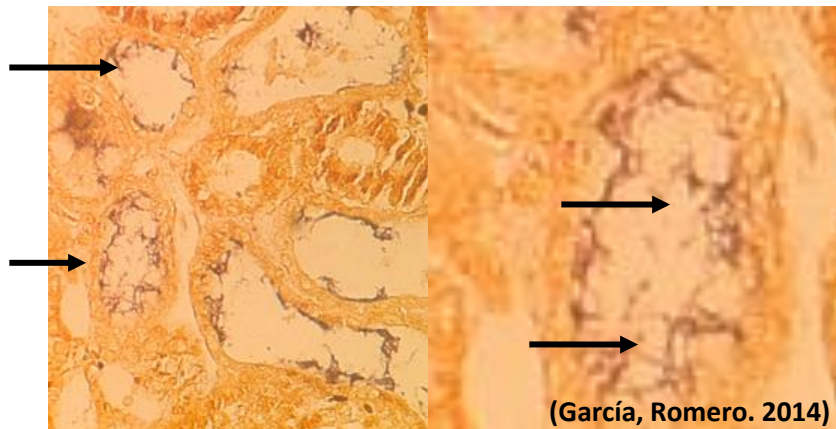


Figura 20. Estructuras compatibles con *Leptospira sp.* Corte de riñón. Resultado de la tinción de Warthin Starry, 40x. Se observan estructuras de leptospiras en forma filamentos de color negro.

Cuadro 10. Resultados de la tinción de Warthin Starry (W-S)

	Casos positivos	Casos negativos	Porcentaje de positivos	Porcentaje de negativos
Riñón	6	9	40%	60%
Hígado	0	0	0	0
	Total de muestras 15		Total:100%	

### 7.3. PCR-PF

Para la reacción de PCR se optimizaron los parámetros, temperatura media y concentración de los iniciadores.

#### 7.3.1. Optimización de parámetros de PCR

##### 7.3.1.1. Temperatura óptima de los iniciadores (*primers*)

La temperatura media óptima de los primers se determinó mediante el corrimiento de PCR a cepas control de *Leptospira* (*L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa*, *L. hardjo* y *L. tarassovi*), control negativo y blanco. La reacción se llevó a cabo en un termociclador marca Thermo Electron Corporation modelo HBPX2110 con un gradiente de temperatura de 45.5 a 59.2°C. Se compararon las bandas de amplificación de acuerdo a cada gradiente, determinando la temperatura óptima de 58°C ya que la banda de amplificación resulto con mayor definición y nitidez en el gel de agarosa (Figura 21).

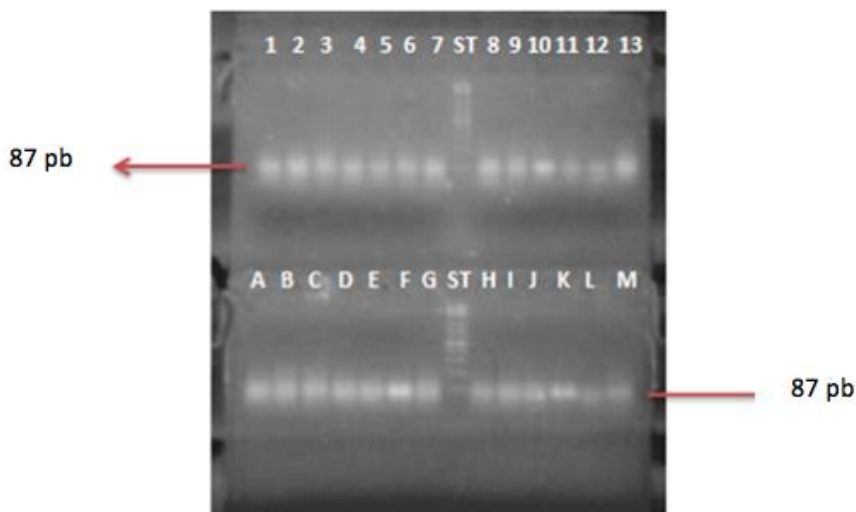


Figura 21. Gel de agarosa al 2.5% teñido con Bromuro de Etidio. Gradiente de temperatura de los productos PCR empleando los iniciadores Lepto F y R en cepas control de *Leptospira*. Gradiente de temperatura: 45.5°C (Carriles 1- 7); 55.9°C (Carriles 8-13); 59.2°C (Carriles A – G); 58.0°C (Carriles H – M); estándar de tamaño 100pb DNA Ladder (ST). Orden empleado para cada gradiente: *L. canicola* (Carriles 1, 8, A, H); *L. icterohaemorrhagiae* (Carriles 2, 9, B, I); *L. grippityphosa* (Carriles 3, 10, C, J); *L. hardjo* (Carriles 4, 11, D, K); *L. tarassovi* (Carriles 5, E), control negativo: *Staphylococcus aureus* (Carriles 6, 12, F, L); blanco (Carriles 7, 13, G, M) (García, Romero. 2014).

### 7.3.1.2. Concentración de los iniciadores (*primers*)

La concentración de los primers se determinó mediante el corrimiento de PCR a cepas control de *Leptospiras*: *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, muestras de riñón y orina de casos positivos a *Leptospira sp* comprobados mediante la prueba de MAT, Histopatología y PCR, controles negativos de *Staphylococcus aureus* y *Brucella mellitensis*. Se determinó la concentración de primer mediante la comparación de las bandas de amplificación a diferentes concentraciones de primer. Concentraciones mayores a 10 $\mu$ M mostraron un exceso de primer, concentraciones menores a 2 $\mu$ M no mostraron banda de amplificación (Figura 22).

Determinando la concentración de iniciadores de 10 $\mu$ M para muestras de orina y de 2 $\mu$ M para muestras de tejidos, al presentar una banda de amplificación definida y nítida.

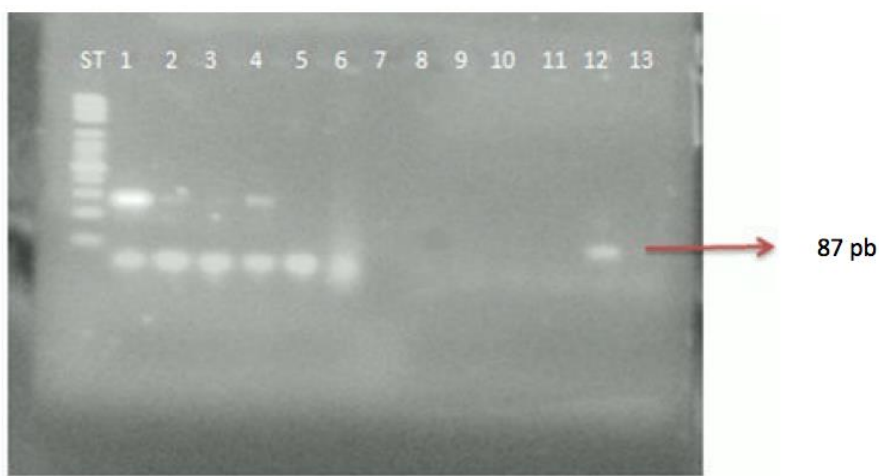


Figura 22. Productos de la PCR-PF en gel de agarosa al 2.5% teñido con Bromuro de Etidio, bandas de amplificación del genero *Leptospira* a diferentes concentraciones de *primers*; carriles 1-4 [15 $\mu$ M]; carriles 5-8 [10 $\mu$ M]; carriles 9-12 [5 $\mu$ M]. Orden empleado: *L. canicola* (carriles 1, 5, 12), muestra de Orina positiva a *Leptospira sp* (carriles 2, 6, 11); Control Negativo *Brucella mellitensis* (carriles 3, 7, 10), blanco (carriles 4, 8, 9); Estándar de tamaño 100pb DNA Ladder (ST).



### 7.3.2. Resultados generales de la prueba de PCR-PF

Optimizados los parámetros, las 54 muestras de hígado, riñón y orina fueron procesadas para la técnica de PCR-PF, se consideró un caso positivo a *Leptospira sp* cuando se presentó amplificación en cualquier muestra (hígado, riñón y orina). Obteniendo 11 muestras positivas lo cual representa el 20.37% del total de las muestras (Cuadro 11) (Anexo K).

Cuadro 11. Resultados generales de la prueba de PCR-PF.

Casos positivos	Casos negativos	Porcentaje de muestras positivas	Porcentaje de muestras negativas
11	43	20.37%	79.62%
Total de muestras 54		Total porcentaje:100%	

### 7.3.3. Resultados de PCR-PF en muestras de hígado, riñón y orina.

De las muestras positivas totales la presencia de *Leptospira* en riñón fue de 18.5% de frecuencia, en orina 3.70%, estando ausente en hígado (Cuadro 12) (Anexo L).

Cuadro 12. Frecuencia de *Leptospira sp* presente en hígado, riñón y orina

	Positivos	Frecuencia (%)
Riñón	10	18.51
Hígado	0	0.0
Orina	2	3.70

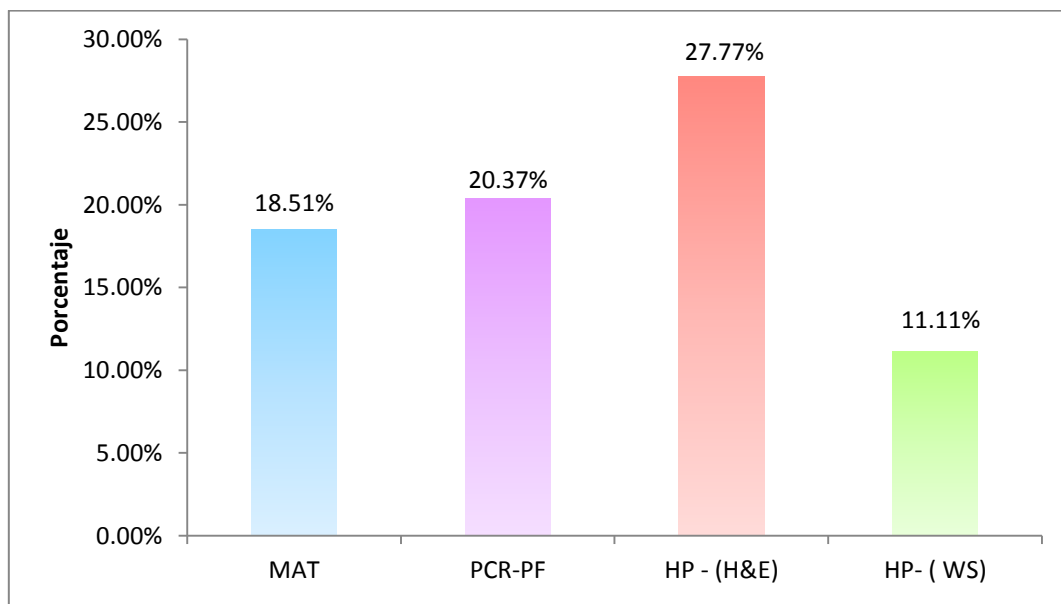
#### 7.4. Resultados generales de las pruebas; MAT, PCR, HP

Los casos positivos encontrados en las diferentes pruebas están agrupados en la siguiente tabla (Cuadro 13) (Anexo E).

**Cuadro 13.- Resultados generales de las pruebas de MAT, PCR, HP-HE, HP-WS**

Técnica	Casos positivos	Porcentaje de positivos
MAT	10	18.51%
PCR	11	20.37%
HP H-E	15	27.77%
HP- Warthin Starry	6	11.11%
Total de muestras 54		

Los resultados generales de las pruebas diagnósticas realizadas: MAT, PCR, HP-HE, HP-WS están representadas en la Figura 23.



**Figura 23: Resultados Generales de las pruebas diagnósticas realizadas: MAT= microaglutinación en placa, PCR=Reacción en Cadena de la Polimerasa, HP-HE= tinción de Hematoxilina-Eosina, HP-WS= tinción de Warthin-Starry.**

## 8. Análisis Estadístico

### 8.1. Prueba de concordancia de Kappa

Los resultados de las pruebas de MAT, HP y PCR-PF fueron sometidos al cálculo de índice Kappa ( $k$ )<sup>45</sup> para determinar la concordancia entre las diferentes pruebas diagnósticas realizadas.

El índice Kappa para la prueba de PCR-PF en referencia a la prueba de MAT resultó de 0.23 y una concordancia de 75.92% (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Índice kappa de la prueba de PCR-PF en base a la técnica de MAT como prueba de referencia.**

	MAT 1:200		Total	Concordancia	75.92%
	Positivo	Negativo			
PCR-PF					
Positivos	4	7	11		
Negativos	6	37	43	Índice Kappa (k)	0.23
Total	10	44	54		

En la prueba de Histopatología con lesiones asociadas a Leptospirosis teñidas con Hematoxilina–Eosina (HP-HE), se determinó una concordancia del 75.92% y un índice de Kappa de 0.33 en comparación con la técnica de MAT como prueba de referencia (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Índice kappa de la prueba de histopatología (Tinción H&E) en base a la técnica de MAT como prueba de referencia.**

	MAT 1:200		Total	Concordancia	75.92%
	Positivo	Negativo			
HP-HE					
Positivos	6	9	15		
Negativos	4	35	39	Índice Kappa (k)	0.33
Total	10	44	54		

El Índice de kappa que se determinó para la prueba de Histopatología con lesiones sugerentes de Leptospirosis positivas a la tinción Argéntica de Warthin-Starry (WS) fue de 0.12 (Cuadro 16).

**Cuadro 16. Índice kappa de la prueba de histopatología (tinción W-S) en comparación con la técnica de MAT como prueba de referencia.**

HP-WS	MAT 1:200		Total	Concordancia	77.77%
	Positivo	Negativo			
Positivos	2	4	6	Índice Kappa (k)	0.12
Negativos	8	40	48		
Total	10	44	54		

## 8.2. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR

Para la prueba de PCR-PF se calculó la sensibilidad y la especificidad de la prueba en referencia a la prueba estandarizada MAT. Determinándose una sensibilidad del 40% y una especificidad del 84.09% (Cuadro 17).

**Cuadro 17. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR-PF en base a la técnica de MAT como prueba de referencia.**

PCR-PF	MAT 1:200		Total	Sensibilidad	40%
	Positivo	Negativo			
Positivos	4	7	11	Especificidad	84.09%
Negativos	6	37	43		
Total	10	44	54		

## 9. Discusión

La leptospirosis es considerada por la OMS, la OIE y la ILS (International Leptospirosis Society) como la zoonosis de mayor diseminación en el mundo <sup>48</sup>. La OIE y OMS refieren a la técnica de MAT como la prueba de referencia para el diagnóstico de leptospirosis en humano y animales, una muestra se considera positiva cuando presenta aglutinación a una dilución de suero  $\geq 1:100$ ; Luna et al.<sup>20</sup> sugiere que títulos de 1:100 a 1:200 son de importancia principalmente en animales no vacunados, títulos mayores con una sola muestra  $\geq 1:800$  son usualmente indicativos de infección y son de valor diagnóstico siempre y cuando existan datos compatibles con el cuadro clínico <sup>20</sup>.

Para la CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades) un título  $\geq 1:200$  se utiliza para definir un caso probable con una enfermedad clínicamente compatible. En los países tropicales incluyendo México se requiere un punto de corte superior a 1:100 necesario para la definición de casos probables de leptospirosis <sup>47</sup>. Los caninos a los que se realizó el presente estudio provenían del antirrábico de Cuautitlán Izcalli los cuales no contaban con registros de vacunación o historia clínica. Un estudio realizado por Sánchez et al. <sup>49</sup> describe la diferencia de anticuerpos entre animales vacunados y no vacunados. Los títulos de 1:50 y 1:100 se presentaron después de empezar el plan de vacunación. Al realizar los análisis de los títulos de los anticuerpos, se determinó títulos de 1:25, 1:50 y 1:100, para animales vacunados.

Por lo anterior el presente trabajo considero un punto de corte  $\geq 1:200$  como caso positivo a la prueba de MAT.

El cuadro 6 muestra los resultados obtenidos de la técnica de MAT con un punto de corte  $\geq 1:200$ ; el 18.51% (10/54) de los casos se consideraron positivos, en 2008 Luna et al.<sup>20</sup>, recopilan la información de diferentes estudios realizados a caninos en el área metropolitana de la ciudad de México con la técnica de MAT, los cuales abarcan de 1963 hasta el 2005, los diferentes estudios presentan positivities variables que van desde 16.1% hasta 81%, el 18.51% de casos

positivos obtenido en este estudio concuerda con los estudios realizados anteriormente.

Dentro del periodo de 1963 a 2005 las serovariedades más frecuentes fueron *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pyrogenes* y *L. bratislava*: otros estudios; uno descrito por Rivera et al.<sup>50</sup> en 1999 reporta un 26.92% de casos positivos para la serovariedad *L. canicola* y un 21.15% para *L. icterohaemorrhagiae* en 135 sueros caninos; mientras que Vado<sup>51</sup> reporta en 2008 a *L. canicola*, *L. hardjo*, *L. pyrogenes*, *L. panama*, *L. pomona*, *L. tarassovi*, *L. icterohaemorrhagiae*, como las serovariedades más comunes encontradas en 400 sueros caninos. Sepulveda<sup>52</sup> en 2002 reporta a las serovariedades *L. tarassovi* (17%), *L. hardjo* (12.3%) y *L. pomona* (12.3%) como los más frecuentes en sueros caninos.

El presente estudio reporta las serovariedades más frecuentes encontradas: *L. canicola* con el 12.96% (7/54) de los casos, seguida de *L. icterohaemorrhagiae* con 9.25% (5/54) de los casos (Cuadro 7). Lo cual sugiere que *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* siguen siendo las serovariedades más frecuente encontradas en caninos en el área conurbana de la ciudad de México como lo son las zonas de Cuautitlán Izcalli, Cuautitlán de Romero Rubio, Tultitlan y Coacalco.

El Cuadro 8 muestra que el 14.81% (8/54) de los casos mostraron anticuerpos contra una sola serovariedad, mientras que el 3.70% (2/54) lo presentó a 2 serovariedades.

Renato<sup>17</sup>. Reporta el panorama epidemiológico de la leptospirosis en México en humanos de 2000 a 2010. En el cual reporta mediante los datos generados por el Sistema Único de Información Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), que las serovariedades más aisladas en México fueron: *L. canicola* 9.6%, *L. hardjo* 4.5%, *L. pomona* 4.2%, *L. bratislava* 3.3% y *L. icterohaemorrhagiae* 1.5%.

Dentro de los reportes de leptospirosis detectada por la prueba de MAT; los anticuerpos contra la serovariedad *L. canicola* son los más frecuentes en caninos y humanos, esto sugiere que los caninos son los principales transmisores de la

leptospira hacia el humano en México. El diagnóstico oportuno de la leptospirosis en caninos permitiría tomar medidas preventivas y de control hacia el humano y otras especies.

De acuerdo al curso de la leptospirosis puede existir una diseminación de leptospiras a diferentes órganos por medio del torrente sanguíneo llegando así a: hígado, riñones, útero, vagina, ovarios, oviductos, membranas fetales, feto y glándula mamaria en la hembra y a los testículos, epidídimo y vesículas seminales en el macho.

Dammert <sup>16</sup> asocia lesiones patológicas en la leptospirosis por una vasculitis con compromiso multisistémico, donde el riñón y el hígado son los órganos que sufren con más frecuencia. Luna <sup>20</sup> describe los hallazgos en necropsia de caninos con leptospirosis los cuales incluyen deshidratación, ictericia en grado variable la cual puede o no manifestarse. El hígado está friable con bordes ligeramente redondeados, colestasis, riñones ligeramente aumentados de tamaño con zonas hemorrágicas o bien de menor tamaño con fibrosis. El estómago se presenta hemorrágico, con gran cantidad de moco y olor amoniacal, diátesis hemorrágica y úlceras en los intestinos delgado y grueso.

Durante la recolección de muestras de tejidos en este trabajo; los riñones de algunos caninos presentaron color pálido, textura rugosa, puntos blancos, tejido adiposo exacerbado; mientras que en hígado se presentaron zonas con fibrosis y congestión hepática. Algunas de estas lesiones son compatibles con un cuadro de leptospirosis, la existencia de las lesiones sugiere daño en hígado y riñón sin embargo, este podría no estar relacionado con la leptospirosis, estas lesiones son de importancia para determinar las zonas de toma de muestras para las pruebas de Histopatología y PCR.

Dammert <sup>16</sup> describe las lesiones en riñón, en las cuales una falla renal es principalmente consecuencia de lesiones tubulares. Este daño parece ser originado en isquemia renal por hipovolemia e hipotensión por pérdida del volumen intravascular, debido al compromiso endotelial o por algún efecto tóxico

directo de la leptospira. En los casos graves hay edema intersticial e infiltrado celular de linfocitos, neutrófilos, histiocitos y células plasmáticas. Las lesiones glomerulares son raras o consisten en hiperplasia mesangial que se asocia con complejos inmunes circulantes y depósitos de componentes del complemento en el glomérulo. McDonough et al.<sup>9</sup> y Carreño et al.<sup>34</sup> asocian la infección por *L. canicola*, la cual se mantienen en los túbulos renales, como la serovariedad responsable de propiciar la nefritis intersticial crónica.

En Brasil Tochetto et al.<sup>53</sup> realizó un estudio más preciso recopilando información de casos positivos de leptospirosis en perros entre 1965 y 2011. Los hallazgos histopatológicos en riñón fueron los siguientes:

- Necrosis del epitelio tubular (nefrosis tubular) 86.8% (46/53).
- Nefritis intersticial no supurativa 60,4% (32/53).
- Nefritis intersticial acompañada por nefrosis tubular 84.4% (27/32).
- Un caso no mostró daño renal 1.9%. (1/53).

Para el caso de hígado Dammert<sup>16</sup> y Acosta<sup>10</sup> describe las lesiones encontradas como una disfunción hepatocelular usualmente sin necrosis o con ataque estructural leve. Además incluyen edema de hepatocitos, disrupción de cordones hepáticos, agrandamiento de las células de Kupffer y estasis biliar canalicular; mientras que Tochetto<sup>53</sup> encuentra las siguientes lesiones: disociación hepatocelular 78,6%, colestasis intracanalicular 33,3%, necrosis hepatocelular 31% y degeneración de hepatocitos vacuolar 21,4%.

Al realizar el estudio histopatológico del riñón mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina se encontraron las siguientes lesiones (Anexo F): Glomerulitis membranosa 20.3% (11/54), glomerulitis membrano proliferativa 35.1% (19/54), túbulonefrosis 46.2% (25/54), nefritis intersticial crónica no supurativa 27.7% (15/54) esta última considerada lesión sugerente de leptospirosis en caninos, en los casos descritos por Tochetto<sup>53</sup> la tubulonefrosis se presentó en la mayoría de los casos y la nefritis intersticial crónica en más de la mitad de ellos lo que hace



suponer que de los 27.7% de los casos que presentan nefritis intersticial esta pueda ser asociada a leptospirosis.

En los cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina se encontró en 95.1% (46/54) de los casos una congestión hepática generalizada, se encontraron otras lesiones (Anexo F) principalmente vacuolizaciones 11.11% (6/54). El 9.2% (5/54) no mostró cambios aparentes.

Ninguna de las lesiones anteriores encontradas en hígado se consideró como sugerente de leptospirosis; la congestión hepática generalizada encontrada en el 92.59% de los casos podrían ser provocadas por el método de eutanasia aplicado a los perros, el método utilizado fue por sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico), la sobre dosis por barbitúricos se asocia al incremento del citocromo P450 el cual aumenta el daño hepatocelular por medio del incremento en metabolitos hepatotóxico <sup>54 55</sup>, de igual modo el incremento del citocromo P450 asociado al estrés oxidativo genera necrosis aguda y falla hepática fulminante en algunos de los casos <sup>56</sup>, sin embargo la relación entre la forma de eutanasia empleada y la congestión hepática generaliza presente en el hígado de los caninos no está bien definida, ya que no se encuentran estudios que comprueben de manera directa esta relación. Por lo que se debe de considerarse el método de eutanasia empleado para la obtención de muestras de hígado y su posible afectación en la realización de los estudios histológicos.

La leptospira ocasiona nefritis intersticial crónica en riñón y hepatitis necrótica multifocal en hígado, la observación de las lesiones anteriores sugiere una alta probabilidad de encontrar de leptospiras en estos órganos, una forma de evidenciar la presencia de leptospiras es mediante la tinción histologica de Warthin Starry (W-S) <sup>42</sup>.

Un estudio realizado por Scanziani et al. <sup>57</sup> en 1995, donde un grupo de 32 perros a los cuales se les induce la leptospirosis se les realizaron diferentes pruebas diagnósticas para su evaluación, el análisis histopatológico revelo que el 59% de

los casos presento nefritis intersticial y tan solo uno de los casos fue positivo a la tinción de W-S, un estudio similar realizado en ovejas descrito por Fornazari et al.<sup>58</sup> en 2002 indica que el 4.5% (21/465) fueron positivos a la prueba de MAT, mientras que solo el 0.86% (4/465) mostró estructuras compatibles con leptospira en la tinción de W-S, otro estudio de Rossetti et al.<sup>59</sup> en 2004 indica que en un lote de 41 ratones inoculados con leptospira, el 31.7% presentó lesiones sugerentes de leptospirosis detectadas por la tinción de H-E, mientras que el 43.9% mostró ser positivo a la tinción de W-S, mientras que un estudio realizado en 2014 por Azizi et al.<sup>60</sup>, mostro el 68.4% de los casos con estructuras compatibles con leptospirosis por la tinción de W-S. Levett<sup>47</sup> considera a la tinción como de baja sensibilidad.

De los 15 casos con nefritis intersticial crónica, el 40% (6/15) de ellos mostraron estructuras compatibles con *Leptospira* sp por medio de la tinción argéntica de Warthin Starry, por lo que la relación entre el daño renal y la leptospirosis es baja y la nefritis intersticial podría estar asociada a otras causas como el uso de fármacos, alteraciones alimetarios y metabólicos, estos últimos comunes en los perros de la calle, los estudios antes mencionados indican una relación entre la nefritis intersticial y la leptospirosis inducida, esto se puede deber a que el riñón e hígado son los principales órganos que se comprometen durante la leptospirosis, sin embargo la baja incidencia de casos positivos reportados por esta técnica podría deberse a varios factores propios del curso de la enfermedad, como la fase en la se encuentra la enfermedad o la infección de otros órganos diferentes al riñón, propias de la técnica como: baja sensibilidad de la técnica, la complejidad de la lectura de la prueba, la degradación de los tejidos. El curso de la leptospirosis es un factor importante, ya que los perros podrían haberse contagiado durante alguna otra etapa de su vida y no necesariamente durante el presente estudio. Las lesiones generadas en riñón e hígado podrían persistir después de la superación de un cuadro clínico o del tratamiento brindado para la leptospirosis y no la leptospira en sí.

En el presente trabajo se implementó la prueba de PCR-PF para la detección de *Leptospira sp* patógena haciendo uso de los *primers* Lepto F y Lepto R descritos por Smythe<sup>33</sup> y Sánchez<sup>5</sup>, localizados entre las posiciones 171 y 258 del gen 16S amplificando un producto de 87pb, estos pares de *primers* son especialmente usados para la detección de *Leptospira* patógena en tejidos, orina y sangre sérica. El cuadro 17 muestra la especificidad de la prueba la cual es del 84% mientras que la sensibilidad es de 40%.

Merien et al.<sup>61</sup> comparó la prueba de PCR con la prueba estandarizada MAT en una muestra de 200 pacientes, el 13% (27/200) fueron positivo a la prueba de PCR de los cuales 13 eran concordante con título altos del MAT mientras que en 14 casos la detección de *Leptospira sp* era con títulos bajos para la prueba de MAT.

Bal et al.<sup>62</sup>, reporta la toma de orina de 15 pacientes diagnosticados con leptospirosis a los cuales se les somete a la prueba de PCR en diferente estadio de la enfermedad teniendo 29 muestras de orina de las cuales el 89.6% (26/29) fueron positivas a la prueba de PCR. Ooteman et al.<sup>63</sup> indica que 125 pacientes con sospecha clínica de leptospirosis se determinaron a 30 como casos probables de estos, 10 mostraron ser positivos a la prueba de PCR. Estudios similares realizados por Paixão et al.<sup>64</sup>, en el cual 13 ratas positivas a MAT, se les realiza la prueba de PCR a muestras de hígado y riñones, en el cual el 69,2% fueron positivos a *Leptospira sp*; mientras Fornazari<sup>58</sup> encuentra a 21 ovinos positivos a MAT de los cuales 6 son positivos a la prueba de PCR. Un análisis comparativo entre cultivo y PCR resulto en el 48% de los casos positivos al cultivo y el 62% de casos positivos a PCR confirmados para leptospirosis pero la serología fue positiva en el 97%<sup>47</sup>. Todos estos estudios demuestran el alcance y la importancia de la prueba de PCR en diferentes muestras para el diagnóstico de la leptospirosis.

En este estudio se consideró que un caso era positivo a PCR cuando presentó amplificación de cualquier muestra (orina, hígado, riñón). El 20.3% (11/54) de los casos resultó positivo a la prueba de PCR-PF, contra 10 de la técnica MAT; el

riñón es el órgano que presentó mayor incidencia con 10 casos (18.51%), 2 casos en orina, y ninguno en hígado. Esta prueba es muy sensible, ya que es capaz de detectar desde 1 sola leptospira y los *primers* utilizados son específicos para la detección de leptospira patógena, sin embargo no es capaz de diferenciar entre serovariedades lo cual es de importancia en el estudio de la epidemiología de la enfermedad.

El estar presente o no la leptospira, en muestras de orina, hígado riñón depende del curso de la enfermedad ya que Levett et al <sup>47</sup>, ilustra las fases de la leptospirosis indicando que en las fases tempranas (semana 1) la leptospira podría encontrarse en sangre y LCR (Líquido cefalorraquídeo) ideales para la prueba de PCR y MAT, en lo que esta migra a su órgano blanco, en las semanas 2 y 3 se llega a la fase de leptospiruria en la cual el individuo presenta respuesta inmune, la prueba de MAT es de suma importancia en esta fase aunque en esta etapa la prueba de PCR ayudaría a determinar a la leptospira en muestras de orina, cuando la leptospirase adentrada en órganos principalmente hígado, riñón y ojo, una biopsia podría ayudar al diagnóstico de la leptospirosis sin embargo este procedimiento es muy peligroso ya que se requiere cirugía y no se realizaría debido a la alta eficacia del tratamiento . Después de la semana 4 los títulos bajan y el individuo se recupera de la leptospirosis o bien se convierte en portador en el cual se puede encontrar a la leptospira en orina y en órganos en este momento la prueba de MAT no determina como positivo a un portador por lo que el PCR se convierte en una herramienta capaz de identificar a la leptospira en orina.

Debido al curso de la leptospirosis es importante determinar el tipo de muestra y prueba de diagnóstico más sensible y específico para la detección directa o indirecta de la enfermedad.

La serología es la primera y principal herramienta de diagnóstico para la detección de leptospirosis es una prueba estandarizada e implementada por la OIE, OMS e ILS, existen múltiples estudios que registran la eficacia de la prueba detectando hasta el 100% de los casos de leptospirosis <sup>47 65 66 7 67 9 64 26</sup>.

Esta técnica se convirtió en la prueba de referencia para las demás pruebas que requieran validar los resultados obtenidos como la prueba de PCR en el presente estudio.

### **9.1. Análisis comparativo de las pruebas de MAT, HP, PCR**

El presente estudio realizó un panel de 4 pruebas de diagnóstico de leptospirosis (MAT, PCR, HP H-E, HP W-S) para su análisis comparativo, teniendo como prueba de referencia la Microaglutinación.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes (cuadro 13): La prueba de MAT detectó el 18.51% (10/54) con un punto de corte de 1:200, el análisis histopatológico mostró el 27.77% (15/54) con lesiones sugerentes de leptospirosis, de estos el 11.11% (6/54) fueron positivos a la tinción Warthin Starry y la prueba de PCR 20.37% (11/54) de casos positivos.

El cuadro 15 muestra que de los 15 casos que presentaron lesiones sugerentes de leptospirosis y realizando una comparación con la prueba de MAT, 6 se consideraron verdaderos positivos, 35 verdaderos negativos, mientras que 4 se consideraron falsos negativos y 9 falsos positivos. De este modo el 60% (6/10) de los casos positivos al MAT presentaron nefritis intersticial crónica no supurativa y el 40% no la presentó. Lo que hace suponer que el daño directo al riñón se debe principalmente a la leptospira, también se sugiere que el riñón no siempre presenta daño y que en algunos casos no es el órgano en el que se aloja la leptospira, también podría sugerir la fase en la que se encuentra la enfermedad, así el 60% podría estar en la semana 2 o 3 de la leptospirosis aguda, mientras que el 40% en una etapa más temprana de la enfermedad.

El cuadro 16 muestra que de los 10 casos que se evidenció a la leptospiras por medio de la tinción de Warthin Starry y realizando una comparación con la prueba de MAT, 2 se consideraron verdaderos positivos, 40 verdaderos negativos,

mientras que 8 se consideraron falsos negativos y 4 falsos positivos. De este modo el 20% (2/10) de los casos positivos al MAT presentaron estructuras compatibles con leptospira en el riñón y mientras el 80% no la presentó. Esto sugiere que el 20% de los casos el riñón fue el órgano donde se alojó la leptospira; mientras que en 4 casos se detectó la presencia de leptospira mediante la tinción de W-S estos no presentaron respuesta inmune a ésta, esto podría indicar a los casos como portadores de la leptospira.

El Cuadro 14 muestra que, de los 11 casos positivos a PCR y realizando una comparación con la prueba de MAT, 4 se consideraron verdaderos positivos, 37 verdaderos negativos, mientras que 6 se consideraron falsos negativos y 7 falsos positivos. De este modo el 40% (4/10) de los casos positivos al MAT también lo fueron para PCR y el 60% fue positivo a MAT y negativo a PCR. Esto sugiere que en el 40% de los casos positivos a MAT es posible realizar la prueba de PCR con resultados satisfactorios y de igual modo en el 12.96% (7/54) se puede diagnosticar la leptospirosis en aquellos que no presentar respuesta inmune esto es de suma importancia para determinar las medidas de prevención y control contra la diseminación de la leptospira.

La prueba de PCR es una prueba con alta sensibilidad y especificidad, y es capaz de detectar la leptospirosis desde etapas tempranas de la enfermedad hasta condiciones crónicas que por otro tipo de pruebas no se puede diagnosticar, la implementación de ella en el diagnóstico de la leptospirosis sería de gran importancia para generar un panel de pruebas que permitan diagnosticar la leptospirosis en cualquier fase.

## 9.2. Índice de concordancia Kappa

A las pruebas realizadas en el presente estudio se les sometió al cálculo de índice kappa tomando de referencia la técnica de MAT:

La prueba de histopatología por medio de la tinción de Hematoxilina-Eosina obtuvo una concordancia de 75.92% y un índice de kappa de 0.33, mientras que en la tinción de Warthin Starry se obtuviera una concordancia del 77% y un índice kappa de 0.12; la prueba de PCR obtuvo una concordancia de 75% y un índice kappa de 0.23.

Utilizando la clasificación de Landis Koch 1977 y Altman 1991 los índices de  $k$  de PCR=0.23 y HP H-E=0.33, esto indica una relación *aceptable* entre las pruebas en relación con el MAT. La misma clasificación se utilizó para evaluar el índice kappa de la tinción de Warthin Starry el cual fue de 0.12 lo que indicaría una relación *reducida* con la prueba de MAT.

## 10. Conclusiones

- El presente trabajo evidencio la presencia de leptospira en caninos del antirrábico de Cuautitlán Izcalli mediante diferente pruebas diagnósticas.
- Se detectó por medio de la técnica de MAT la presencia de anticuerpos contra *Leptospira sp*, reportando el 18.5% de los casos como positivos. Se determinó a *L. canícola* con 12.9% y a *L. icterohaemorrhagiae* con 9.2% como las serovariedades más frecuentes en la población canina.
- Se encontró seropositividad a *L. canícola* y *L. icterohaemorrhagiae* ambas en 2 casos por lo que sugiere que los caninos pueden ser infectados por una o más serovariedades al mismo tiempo.
- El análisis histopatológico en riñón mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina reportó que el 27.7% de los casos presento nefritis intersticial crónica no supurativa como lesión sugerente de leptospirosis y en el 40% de estos se logró evidenciar a la leptospira mediante la tinción de Warthin Starry. En el análisis histopatológico en hígado mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina no se encontraron lesiones sugerentes de leptospirosis, sin embargo si se encontró una congestión hepática generalizada en el 92.5% de los casos.
- Se implementó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (PCR-PF) para las muestra de orina, riñón e hígado, obteniendo una sensibilidad de 40% y una especificidad de 84%, el 20.3% de las muestras fueron positivas por esta prueba.
- Se realizó una comparación de las pruebas mediante el cálculo del índice kappa en base a la prueba de MAT, obteniéndose para PCR=0.23, HP-HE=0.33 considerando la concordancia de las pruebas como *acceptable*,



para la prueba de Warthin Starry el índice kappa es de 0.12 lo que se considera como una concordancia *reducida*.

- El panel de pruebas diagnósticas empleadas podría ayudar a diferenciar entre caninos infectados y portadores.
- Ya que la leptospirosis es considerada una de las zoonosis más importante en el mundo, es importante contar con un panel de pruebas diagnósticas que permitan realizar un diagnóstico oportuno, la implementación de las pruebas de HP-HE, HP-WS, MAT y PCR ayuda a poder determinar la leptospirosis en un casi cualquier estadio de la enfermedad, y amplía las opciones de las muestras empleadas para el diagnóstico de la leptospirosis.

## 11. Recomendaciones

El primo aislamiento de la leptospira es la prueba determinante de la leptospirosis, esta prueba debe incluirse dentro del panel de pruebas diagnósticas siempre y cuando las muestras obtenidas de los casos lo permitan.

Se debe evaluar y relacionar el cuadro clínico presente en los individuos sospechosos de leptospirosis para determinar el tipo de muestra y prueba a emplear que permita la detección directa o indirecta de leptospirosis.

Incluir dentro del panel de serovariedades utilizadas en la prueba de MAT, aquellas serovariedades más prevalentes en la zona.

En las pruebas histopatológicas realizar cortes de diferentes zonas de los tejidos a fin de aumentar la probabilidad de encontrar a la leptospira y las lesiones asociadas a esta.

La tinción de Warthin Starry no es un método totalmente estable, por lo que es recomendable realizar la lectura en el menor tiempo posible.

Elegir el método de extracción de DNA de acuerdo al tipo de muestra, el cual permita garantizar la cantidad y calidad de DNA obtenido.

Mantener las condiciones de almacenamiento de la extracción de material genético para evitar la degradación de DNA. De ser posible realizar todo el proceso de DNA en el mismo día.

Utilizar material libre de DNAsas y RNAsas para la prueba de PCR-PF.

Acoplar las condiciones de reacción de PCR (temperatura media, concentración de primer, programa de amplificación, etc.) al método empleado y al equipo disponible en el área de trabajo.

En la prueba de PCR-PF elegir aquellos pares de primers que permitan una mayor nitidez y definición de la banda de amplificación, que no interaccionen entre ellos y no generen reacción cruzada con el DNA de otras bacterias.

## 12. ANEXOS

### Anexo A. Registro de características generales de perros y toma de muestras.

Numero de caso	Edad (años)	Sexo	Peso (Kg)	Señas particulares	Muestra obtenida			
					Sangre	Orina	Riñón	Hígado
01	5 meses	Macho	10	Tipo PASTOR ALEMÁN color negro	x	x	x	x
02	10	Macho	6	Tipo MALTES	x	x	x	x
03	2	Hembra	12	Negro/pardo-pelo de alambre	x	x	x	x
04	1	Hembra	10	Mestizo, color sable	x	x	x	x
05	2	Macho	25	BULL TERRIER-color miel	x	x	x	x
06	1.5	Macho	8	Blanco chino/ FRENCH POODLE	x	x	x	x
07	2	Macho	10	Café / tipo MALTES	x	x	x	x
08	6	Macho	14	Tipo PASTOR ALEMÁN /negro con café	x	x	x	x
09	7	Hembra	12	Blanco con manchas cafés	x	x	x	x
10	3	Macho	5	Negro / mestizo	x	x	x	x
11	2	Hembra	20	Criollo-café tostado	x	x	X	X
12	10	Hembra	3.5	POODLE-rastas	x	x	X	X
13	4	Macho	7	MALTES-color hueso	x	x	X	X
14	1	Hembra	5	COCKER-color café tostado	x	x	X	X
15	2	Macho	20	CHAW-CHAW-color café tostado	x	x	X	X
16	1	Hembra	10	Mestizo-café claro	x	x	X	X
17	5 meses	Hembra	9	Mestizo- negro con mancha blanca	x	x	X	X
18	4	Macho	15	Mestizo-café miel con mancha negra	x	x	X	X
19	7	Macho	13	SCHNAUZER	x	x	X	X
20	2	Macho	30	Mestizo- blanco con mancha café claro	x	x	X	X
21	2	Hembra	18	Mestizo-negro con manchas	x	x	X	X
22	1	Hembra	10	Mestizo-negro	x	x	X	X
23	1.5	Hembra	11	Mestizo negro con café claro	x	x	X	X
24	2	Hembra	13	ALASKA-BEIGE con negro	x	x	X	X
25	8 meses	Hembra	10	Tipo PASTOR ALEMÁN	x	x	x	x

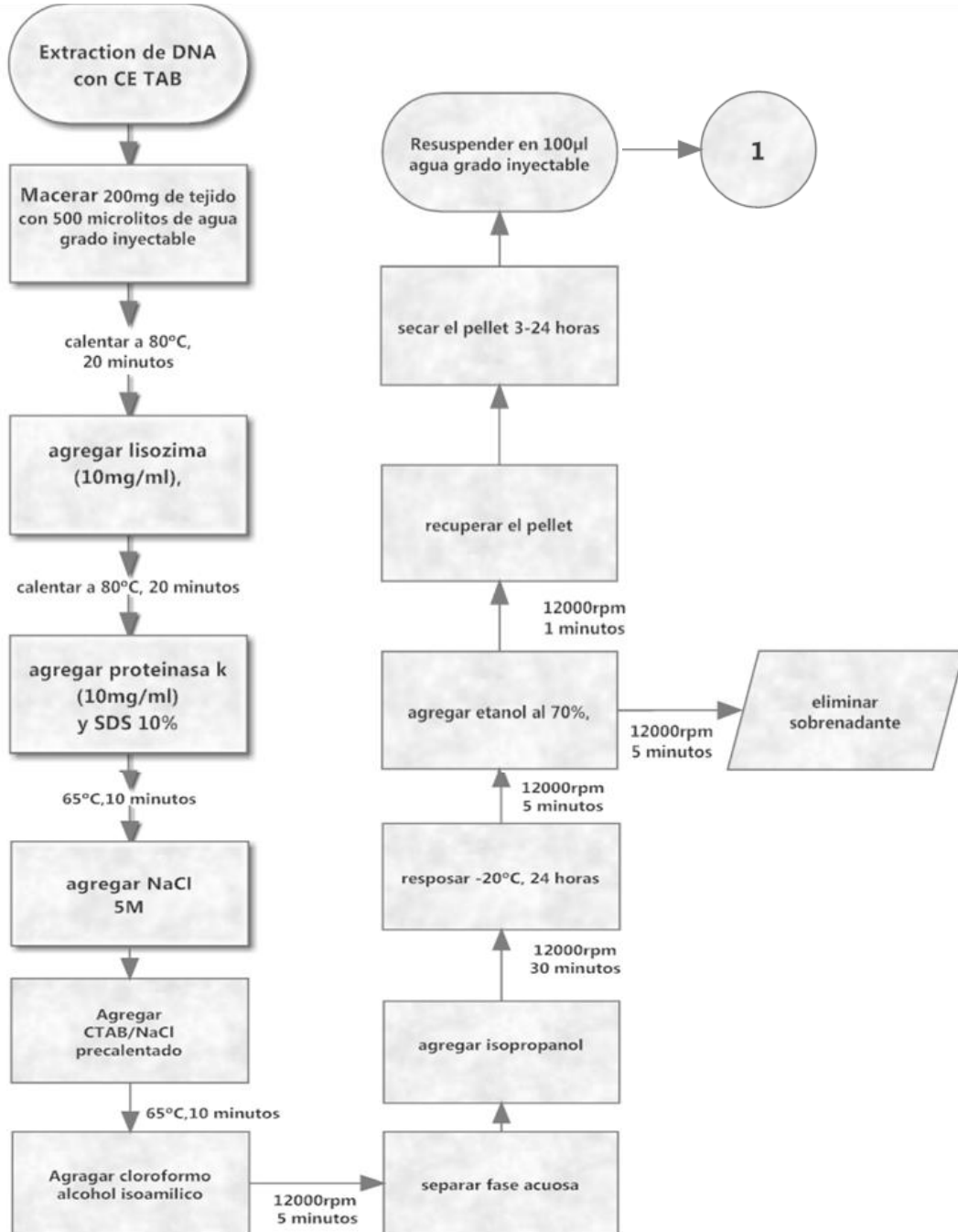
Numero de caso	Edad (años)	Sexo	Peso (Kg)	Señas particulares	Muestra obtenida			
					Sangre	Orina	Riñón	Hígado
26	8 meses	Hembra	12	Mestizo-color beige	x	x	X	X
27	2	Hembra	18	Mestizo-color miel	x	x	X	X
28	7	Hembra	23	Tipo PASTOR BELGA- negro/paja	x	x	X	X
29	6	Macho	5	MALTES	x	x	X	X
30	1	Hembra	12	Criollo negro	X	x	X	X
31	1.5	Macho	19	Criollo amarillo	X	x	X	X
32	2	Macho	20	Mestizo	X	x	X	X
33	2	Hembra	28	LABRADOR	X	x	X	X
34	4	Macho	18	Negro	X	x	X	X
35	3	Macho	12	Tipo SCHNAUZER	X	x	X	x
36	2.5	Macho	24	Criollo negro con café	X	x	X	X
37	1.5	Macho	25	Naranja	X	x	X	X
38	1	Hembra	12	Criollo negro	X	x	X	X
39	1	Hembra	10	Mestizo- negro con amarillo	X	x	X	X
40	2	Hembra	7	Mestizo-negro	X	x	X	X
41	4	Hembra	24	Mestizo-café	X	x	X	X
42	3	Hembra	16	Mestizo-blanco con café	X	x	X	X
43	4	Hembra	12	Mestizo- café con negro	X	x	X	X
44	1.5	Macho	11	Tipo COCKER	X	x	X	X
45	1	Macho	14	Tipo PASTOR ALEMÁN	X	x	X	X
46	4	Macho	20	Color chocolate	X	x	X	X
47	1	Macho	12	Tipo PASTOR ALEMÁN	X	x	X	X
48	2	Hembra	21	Color negro con amarillo	X	x	X	X
49	1	Macho	12	Mestizo tipo COCKER amarillo	X	x	X	X
50	1	Hembra	8	COCKER color miel	X	x	X	X
51	2	Hembra	4	COCKER color miel	X	x	X	X
52	2	Hembra	20	LABRADOR color miel	X	x	X	X
53	2	Hembra	20	Tipo PASTOR ALEMÁN	X	x	X	X
54	4	Macho	14	Tipo PASTOR ALEMÁN negro	x	x	x	x

## **ANEXO B. Protocolo de extracción de DNA para tejidos a base de CETAB.**

Procedimiento:

1. Obtener la muestra de tejido (200mg) en condiciones de esterilidad.
2. Macerar el tejido con 500µl de agua grado inyectable.
3. Calentar en baño María a 80°C durante 20 minutos.
4. Adicionar 5µl de lisozima (10 mg/ml) mezclar e incubar a 37°C/24 horas.
5. Adicionar 70µl de SDS 10% y 5µl de proteinasa *K* (10 mg/ml).
6. Incubar a 65°C durante 10 minutos
7. Colocar 100µl de NaCl 5M
8. Colocar 750µl de CTAB/NaCl precalentado a 65°C.
9. Incubar a 65°C durante 10 minutos.
10. Colocar 750µl de cloroformo-alcohol isoamilico y mezclar.
11. Centrifugar a 12000rpm durante 5 minutos.
12. Separar la fase acuosa.
13. Agregar a la fase acuosa 450µl de isopropanol.
14. Centrifugar a 12000rpm durante 30 minutos.
15. Reposarlos a -20°C durante 24 horas.
16. Centrifugar a 12000rpm durante 15 minutos
17. Agregar 1ml de etanol al 70%, mezclar por inversión.
18. Centrifugar a 12000rpm durante 5 minutos
19. Eliminar el sobrenadante.
20. Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.
21. Secar el pellet (3-24 horas).
22. Resuspender el pellet en 100µl agua grado inyectable.

## Diagrama de flujo del proceso de extracción de DNA



## Reactivos:

- Solución SDS 10%
- NaCl 5M
- Solución CETAB/NaCl
- Cloroformo-alcohol isoamilico 24 : 1
- Etanol 70%.
- Agua grado inyectable.
- Agua destilada estéril.

## Preparación de soluciones

### Lisozima y Proteinasa K

- 10mg lisozima o proteinasa *K*
- 1ml de agua destilada estéril.

Mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### SDS 10 %

- SDS.....10gr.
- Agua destilada.....100ml.

Disolver calentándolo a  $65^{\circ}\text{C}$

### NaCl 5 M

- NaCl..... 29.2gr
- Agua destilada.....100ml

\*Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}/15\text{lb}$

### CTAB / NaCl

- NaCl..... 4.1gr.
- CTAB.....10gr.
- Agua destilada.....100ml.

Calentar a  $65^{\circ}\text{C}$



### **Cloroformo-alcohol isoamilico 24:1**

- 20 volúmenes de cloroformo
- 1 volumen de alcohol isoamilico

### **Etanol 70%**

- Etanol 96%.....72.91 gr.
- Agua destilada..... 27.08 gr.

Se puede preparar haciendo uso del densitómetro.

## **ANEXO C. Protocolo de la reacción de PCR- PF**

### **Componentes de la reacción de PCR**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Dream <i>Taq</i> <sup>™</sup> Green DNA Polymerase-Thermo Scientific <sup>™</sup> 2x	12.5µl
Iniciador Lepto F	1µl
Iniciador Lepto R	1µl
Agua libre de DNAsas y RNAsas	7.5µl
Extracción de DNA	3µl
Volumen total	25µl

### **Preparación del gel de agarosa al 2.5%**

Reactivos:

- Agarosa
- TAE 1 x
- Bromuro de Etidio 1%

## Preparación de Soluciones

### Agarosa 2.5 %

- Agarosa .....2.5gr
- Agua destilada.....100ml

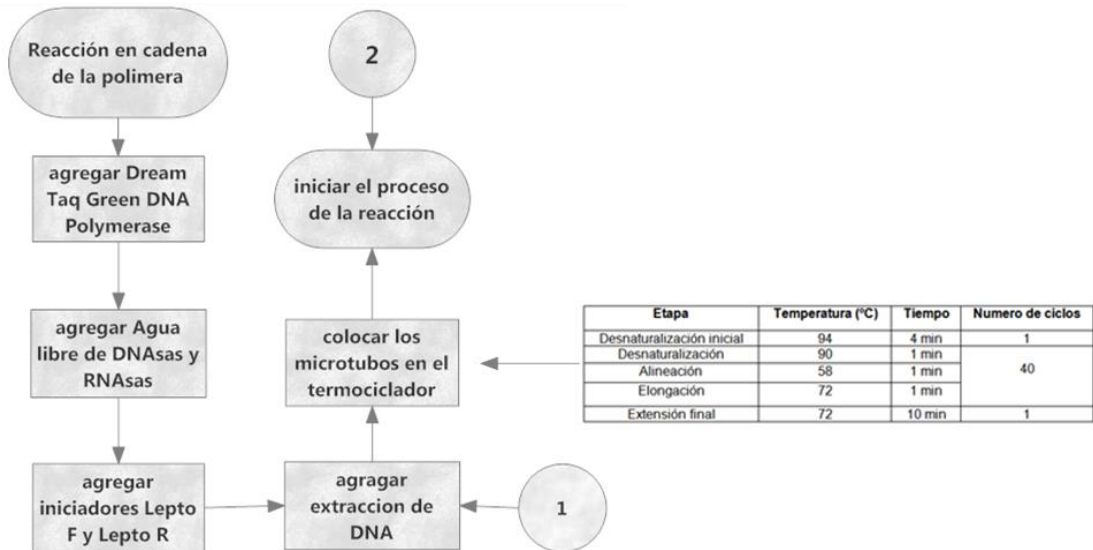
### TAE 50x

- Tris base.....242gr
- Ácido acético glacial....57.1ml
- EDTA 0.5M.....100ml
- Agua destilada cbp.....1000ml

Ajustar pH a 8

**TAE 1x:** Disolver 20ml de la solución preparada en 980ml de agua destilada.

### Diagrama de flujo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)



## Diagrama de flujo de la electroforesis de la PCR



## Anexo D. Foto PCR-PF para la detección de *Leptospira sp.*

Positivo: 87 pb.



PCR-PF para la detección de *Leptospira sp* en muestra de hígado y riñón positivas. Carriles: 1) muestra de riñón caso 5; 2) muestra de orina caso 5; 3) muestra de riñón caso 11; 4) muestra de orina caso 11; 5) muestra de riñón caso 18; 6) muestra de orina caso 18; 7) muestra de riñón caso 24; 8) muestra de orina caso 24; ST estándar de tamaño DNA ladder 100pb; 10) muestra de riñón caso 14; 11) muestra de orina caso 14; 12) Control negativo: *Salmonella suis*; 13) Control negativo: *Staphylococcus aureus*, blanco: agua, 15) Control positivo: *L. canicola*.

**Anexo E. Tabla de comparación con resultados generales de las pruebas de diagnóstico realizadas.**

# de caso	Prueba empleada.							# de caso	Prueba empleada.							
	MAT	PCR			H-E		W-S		MAT	Orina	PCR			H-E		W-S
		Orina	Riñón	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón				Orina	Riñón	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
1	N	N	N	N	GM	CH		28	N	N	N	N	TN	CH		
2	N	N	N	N	GM	CH V		29	N	N	N	N	TN	CH		
3	N	N	N	N	GM	CH V		30	N	N	N	N	GMP TN	ICM NCL HMS		
4	N	N	P	N	GM +++	CH		31	N	N	N	N	GMP NIC+	CH HMS	P	
5	N	N	N	N	GMP TN ++	CH		32	N	N	N	N	HS GMP	CH +++		
6	C -1:200	N	N	N	TN NIC +	CH V	N	33	I-1:200 C-1:200	N	N	N	TN Posible SN	CH		
7	N	N	P	N	GMP	CH +++		34	I-1:200	N	N	N	GMP NIC + TN	CH	P	
8	G-1:100	N	N	N	NIC + GMP	CH	N	35	I-1:100	N	N	N	GMP	CH		
9	N	N	P	N	SC	CH		36	I-1:200	N	N	N	GM TN	CH		
10	N	N	P	N	SC	SC		37	C-1:100	N	N	N	TN	CH		
11	C-1:1600	N	P	N	SC	SC		38	N	N	N	N	TN	SC		
12	N	N	N	N	NIC ++	CH	N	39	N	N	N	N	TN	CH		
13	N	N	N	N	TN +++ GMP	CH		40	N	N	N	N	GMP	CH		
14	C-1:400	P	P	N	NIC + GMP	CH	N	41	I-1:200 C-1:200	N	N	N	NIC +	CH	N	
15	N	N	N	N	GMP	CH V		42	I-1:100	N	N	N	TN CG	CH		

16	I-1:100 C-1:100	N	N	N	TN NIC +	CH	N	43	I-1:100 H-1:100	N	P	N	TE, TN GMP NIC+	CH	N
17	C-1:100	N	N	N	NIC ++ GMP	CH V	P	44	N	N	N	N	TN NIC +	CH	P
18	N	N	P	N	TN +++ GMP CR	CH		45	N	N	N	N	SC	CH	
19	N	N	N	N	NIC + GM TN	CH	N	46	N	N	N	N	TN +++	CH	
20	N	N	N	N	GM	CH		47	C-1:800	N	N	N	TN	CH	
21	I-1:200	N	P	N	TN NIC + GMP	CH	N	48	I-1:100	N	N	N	SC	SC	
22	N	N	N	N	GMP	CH		49	N	N	N	N	TN GMP	CH	
23	N	N	N	N	TN GM	V CH INF		50	N	N	N	N	SC	CH	
24	C-1:1600	P	N	N	NIC +++ HS GM	CH	P	51	N	N	N	N	SC	CH	
25	N	N	N	N	TN	FP CH		52	N	N	N	N	GM	CH	
26	N	N	N	N	GMP PN	CH ++		53	N	N	N	N	SC	NP	
27	N	N	N	N	NS	INF		54	N	N	P	N	NIC +++ GM TN	SC	P

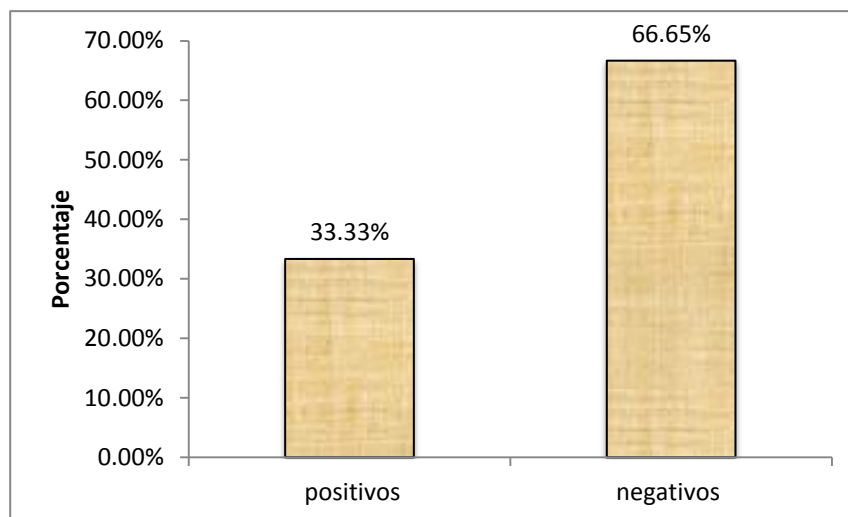
**P**= Positivo; **N**= Negativo, **C**=*L. canicola*, **I**=*L. icterohaemorrhagiae*, **G**=*L. grippotyphosa*, **H**=*L. hardjo*, **T**= *L. tarassovi*, **NIC**=Nefritis Intersticial Crónica no Supurativa, **GM**=Glomerulitis Membranosa, **TN**= Túbulonefrosis, **GMP**=Glomerulitis Membrano Proliferativa, **CR**=Congestión Renal, **HS**=Hemosiderosis, **PN**=Pielonefritis, **SN**=Síndrome Nefrótico, **CG**=Congestión Glomerular, **TE**=Tromboembolismo, **INF**=Inflamación, **FP**=Fibrosis Periportal, **CH**=Congestión Hepática, **V**=Vacuolización, **NCL**=Necrosis Centro Lobulillar, **ICM**=Infiltración Celular Mononuclear, **HMS**=Hepatitis Multifocal no Supurativa, **NP**=Necrosis Periportal, **SC**= Sin Cambios, **+** leve, **++** moderada, **+++** grave.

**Anexo F. Principales lesiones encontradas en tejidos en la prueba de histopatología con la tinción de H-E en muestras de riñón e hígado.**

Lesión en riñón	Número de casos
Glomerulitis membranosa	11
Glomerulitis membrano proliferativa	19
Tubulonefrosis	25
Sin lesión	8

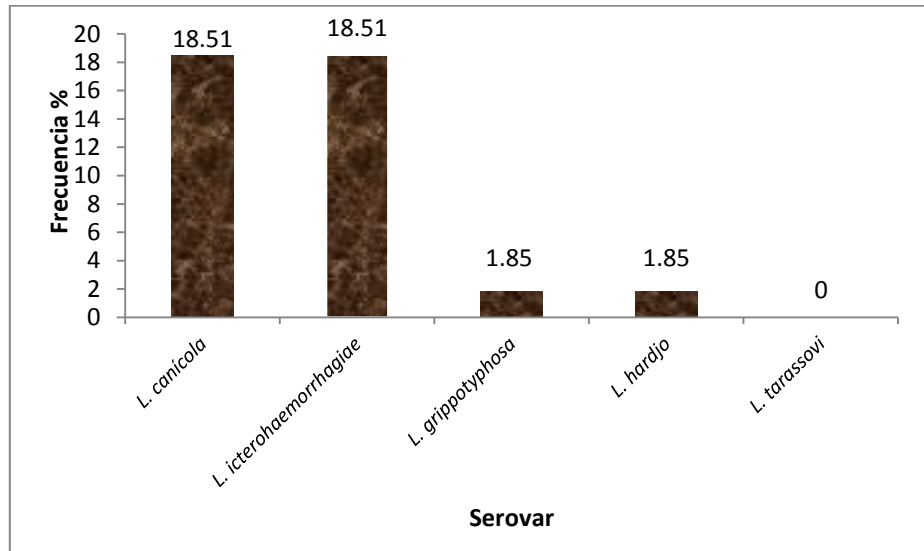
Lesión en hígado	Número de casos
Congestión Hepática	46
Vacualización	6
Sin lesión	5

**Anexo G. Gráfico: Resultados generales de la prueba Microaglutinación en placa de sueros caninos ( $\geq 1:100$ )**



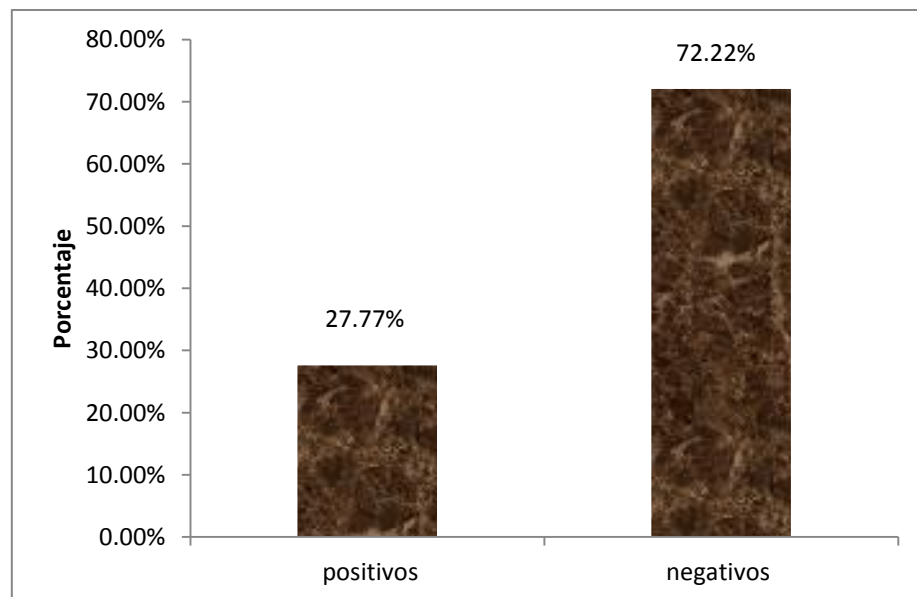
\*Resultados generales de la prueba de MAT con punto de corte 1:100, muestras positivas: 18/54, muestras negativas 36/54.

**Anexo H. Gráfico: Frecuencia de la serovariedad presente en sueros positivos a la prueba de MAT ( $\geq 1:100$ )**



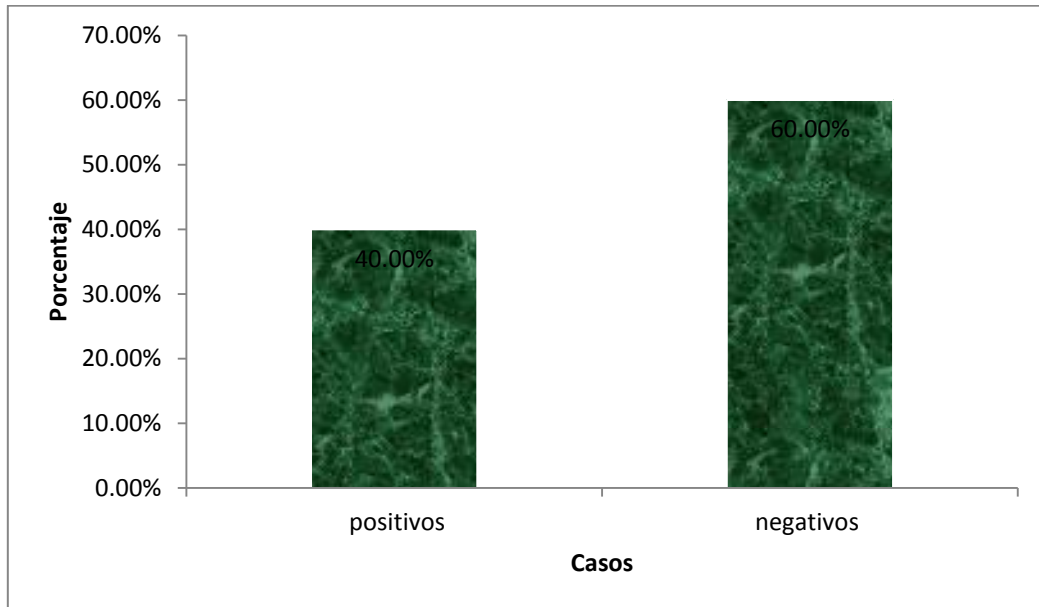
\*Frecuencia de serovariedades presente en casos positivos a la prueba de MAT, punto de corte 1:100, *L. canicola* 10/54, *L. icterohaemorrhagiae* 10/54, *L. grippotyphosa* 1/54, *L. hardjo* 1/54, *L. tarassovi* 0/54

**Anexo I. Gráfico de resultados de la técnica de Histopatología Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) en muestras de riñón.**



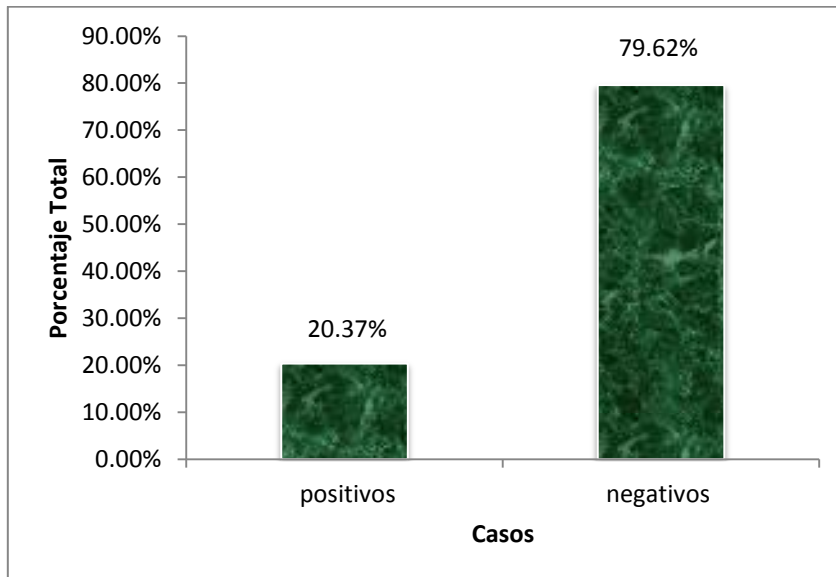
\*Resultados generales de la prueba de histopatología Tinción H-E, muestras positivas (nefritis intersticial crónica): 15/54, muestras negativas 39/54.

**Anexo J. Gráfico de Resultados de la técnica de histopatología tinción de Warthin Starry (W-S), en muestras de riñón.**



\*Resultados generales de la prueba de histopatología Tinción W-S, muestras positivas 6/15, muestras negativas 9/15.

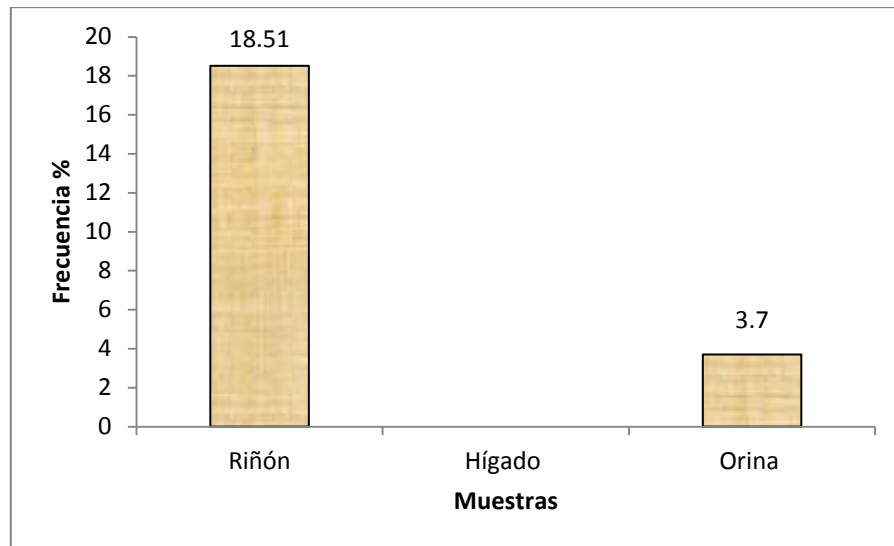
**Anexo K. Gráfico de resultados generales de la prueba de PCR-PF.**



\*Resultados generales de la prueba de PCR-PF, muestras positivas: 11/54, muestras negativas 43/54.



**Anexo L. Gráfico de frecuencia de *Leptospira sp* presente en hígado, riñón y orina detectados mediante la prueba de PCR -PF.**



\*Frecuencia de *Leptospira sp* presente en orina 2/54, hígado 0/54, riñón 10/54.

### 13. Referencias

- 1 Bharti A, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Díaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, and Vinetz JM, 2003, Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance, *Lancet. Infect. Dis.*, 3 (12), pp. 757–71.
- 2 WHO, 1982, Guidelines for the control of leptospirosis., *WHO Offset Publ.*, (67), pp. 1–171.
- 3 Faine S, Adler C, and Perolat P, 1999, *Leptospira and leptospirosis*, 2, ilustra. (September 1999). Melbourne, Australia.
- 4 Blood DC and Radostits OM, 1992, *Médecina Veterinaria*, 7th ed. México.
- 5 Sánchez Arturo E, 2011, Detección de *Leptospira* patógena en orina de pacientes crónicos y perros mediante PCR en el Valle de Cauca, Universidad del Valle.
- 6 Bonilla JAS, 2010, Seroprevalencia y factores de riesgo asociados con la presencia de leptospirosis caprina en los municipios ubicados en la zona centro del estado de Veracruz, Universidad Veracruzana.
- 7 Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, and Weyant RS, 2003, Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis, *J. Clin. Microbiol.*, 41 (2), pp. 803–809.
- 8 Laguna V and Aguinaga A, 2000, Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos N°2 Lima 2000, *Módulos técnicos Serie Documentos Monográficos N 2*. Ministerio de Salud de Perú, Perú, pp. 1–56, 2000.
- 9 Mcdonough PL, 2001, Leptospirosis en caninos - estado actual, *international veterinary information service*, pp. 1–4, 2001.
- 10 Acosta H, Moreno C, and Viáfara D, 1994, Leptospirosis. Revisión de tema, *Col med*, 25, pp. 36–42.
- 11 Hoeprich PD, 1980, Leptospirosis, in *Tatado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, Editorial Médica Panamericana, Ed. España, pp. 634–641.
- 12 Macedo A. S, 2005, Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido, *Rev. Perú. Méd. Exp. Salud Publica*, 22 (4), pp. 281–289.

- 13 Cespedes M, 2005, Leptospirosis: Enfermedades zoonotica reemergente, *Rev Perú Méd Exp Salud Pública*, 22 (4), pp. 290–307.
- 14 Alfaro C, Aranguren Y, and Clavijo A, 2004, Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis como fundamento para el diseño de estrategias de control, *Rev. Digit. CENIAP*, (6).
- 15 Dutta TK and Christopher M, 2005, Leptospirosis an overview., *J. Assoc. Physicians India*, 53, pp. 545–51.
- 16 Dammert N, 2005, *Leptospira una revisión bibliográfica*, 2005.
- 17 Renato Z and Janett C, 2013, Panorama epidemiológico de la leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos 2000-2010, *Enfermedades Infecc. y Microbiol.*, 33 (2), pp. 71–76.
- 18 Carneiro M, Giacomini M de L, and Costa JM, 2004, Leptospirosis asociada a la exposición ocupacional: Estudio clínico y epidemiológico, *Rev. Chil. infectología*, 21 (4), pp. 339–344.
- 19 Rodríguez Martínez G, 2000, Estado actual de la leptospirosis, *MVZ-Córdoba*, 5 (1), pp. 61–63.
- 20 Luna AMA, Moles CLP, Gavaldón RD, Nava VC, and Salazar GF, 2008, La leptospirosis canina y su problemática en México, *Rev. Salud Anim.*, 30 (1), pp. 1–11.
- 21 Haake DA, 2000, Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis, *Microbiology*, 146 (7), pp. 1491–1504.
- 22 Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis M, Levett PN, Ko AI, and Haake DA, 2001, Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans., *Infect. Immun.*, 69 (8), pp. 4958–68.
- 23 Haake D, Mazel M, and McCoy A, 1999, Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection, *Infect. Immun.*, 67 (12), pp. 6572–6582.
- 24 Aroca G, Accini JL, Pérez R, Rodelo E, and Dau H, 2004, Leptospirosis icterica: Síndrome de Weil's, *Salud Uninorte Barraquilla col.*, 19, pp. 31–40.
- 25 Tatiana Cedola M, 2014, Estudio de mecanismo de la inmunidad innata en la patogénesis de la leptospirosis, Universidad Nacional de la Plata.

- 26 Bal A, 2005, Unusual clinical manifestations of leptospirosis, *J. Postgrad. Med.*, 51 (3), pp. 179–183.
- 27 Gómez RG, 2008, Enciclopedia Bovina, *Enciclopedia bovina*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pp. 168–172, 2008.
- 28 González Montes E, 2010, Nefropatías intersticiales, in *Nefrología al día*, 2nd ed., Sociedad Española de Nefrología/plusmedical, Ed. barcelona, pp. 81–96.
- 29 Institute International Coopertion in Animal Biologics, 2005, Leptospirosis, pp. 1–8, 2005.
- 30 Arora K, 2014, pathologyoutlines, *Liver and intrahepatic bile ducts-nontumor. Patterns of hepatic injury*, 2014. [Online]. Available: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/liverpatternshepaticinjury.html>.
- 31 Ginebra O, 2001, Microorganismos espirilares, in *Microbiología y parasitología médica*, 1st ed., editorial Ciencias Médicas, Ed. la habana, pp. 387–417.
- 32 Tamay de Dios L, Ibarra C, and Velasquillo C, 2013, Fundamentos de la reacción en cadena de la de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, *Investig. en Discapac.*, 2 (2), pp. 70–78.
- 33 Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, and McKay DB, 2002, A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp., *BMC Infect. Dis.*, 2, p. 13.
- 34 Carreño Arteaga AM and Bravo Cedeño GM, 2013, Determinar la infección por *Leptospira* spp en perros de la parroquia Calderón de la provincia de manabi en el año 2013, Universidad Técnica de Manabi.
- 35 Estrada Aplicano PM, 2004, Diagnóstico diferencial de leptospirosis humana y dengue de pacientes con enfermedad febril referidos al laboratorio de vigilancia epidemiológica del área de Escuintla, Universidad de San Carlos Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- 36 DGE, 2012, Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Leptospirosis. Secretaría de salud, México, p. 52, 2012.
- 37 Dge-InDRE-RNLSP, 2014, Lineamientos para la vigilancia epidemiológica de Leptospirosis mediante Aglutinación Microscópica., 1st ed. México: secretaria de salud.

- 38 2001, NORMA Oficial Mexicana NOM-029-SSA2-1999, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano., *salud.gob.mx*. Secretaría de salud, México, p. 10, 2001.
- 39 OPS/OMS/ILP, 2008, Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control, *Serie de Manuales Técnicos*. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, p. 127, 2008.
- 40 Céspedes Zambrano M and Araujo Gienny M, 2002, Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la Leptospirosis, *Ministerio de Salud del Perú. Instituto*. Ministerio de Salud de Perú, Lima, p. 61, 2002.
- 41 SAGARPA, 1995, NOM-056-ZOO-1995 Pruebas Laboratorios. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, México, p. 111, 1995.
- 42 A. Putt F, 1972, Manual of Histopathological Staining Methods, Ilustrada. New York.
- 43 Ramírez Casillas IC, Santillán Flores MA, Arriaga Díaz C, and Morales Álvarez JF, 2004, Empleo de una PCR-multiplex para diferenciar caprinos vacunados con M . bovis BCG de infectados con M. bovis de campo, *Téc. Pecu. Méx.*, 42 (3), pp. 419–428.
- 44 Woo THS, Patel BKC, Smythe LD, Symonds ML, Norris M a., and Dohnt MF, 1997, Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 35 (12), pp. 3140–3146.
- 45 Cortés-Reyes E, Rubio-Romero JA, and Gaitán-Duarte H, 2010, Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas, *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*, 61 (3), pp. 247–255.
- 46 OIE, 2014, World Organisation for Animal Health, 2014. .
- 47 Levett PN, 2001, Leptospirosis., *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 (2), pp. 296–326.
- 48 Castro R, 2010, La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo, *Gac. Med. Mex.*, 146, pp. 423–429.
- 49 Sánchez CE, Gutierrez B, Fernandez LC, and Arias PJ, 2007, Producción y evaluación serológica de una bacterina contra la leptospirosis bovina, *rev. MVA Cordoba*, 12 (2), pp. 967–977.

- 50 Rivera Flores A, De la Peña Moctezuma A, Roa Riol M de los A, and Ordoñez Badillo ML, 1999, Seroprevalencia del leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México, *Vet. Méx.*, 30 (1), pp. 105–107.
- 51 Vado-Solis I, 2002, Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatan, Mexico, *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 44 (6), pp. 335–340.
- 52 Sepúlveda MA, 2002, La rata y el perro, importantes vectores de la leptospirosis en explotaciones pecuarias de Cd. Guzmán, Jalisco, *Rev. Cuba. med trop*, 54 (1), pp. 21–23.
- 53 Tochetto C, Flores MM, Kommers GD, Barros CSL, and Figuera RA, 2012, Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011), *Pesqui. Veterinária Bras.*, 32 (5), pp. 430–443.
- 54 Nesnow S, Grindstaff RD, Lambert G, Padgett WT, Bruno M, Ge Y, Chen P-J, Wood CE, and Murphy L, 2011, Propiconazole increases reactive oxygen species levels in mouse hepatic cells in culture and in mouse liver by a cytochrome P450 enzyme mediated process., *Chem. Biol. Interact.*, 194 (1), pp. 79–89.
- 55 Murayama N, Shimada M, Yamazoe Y, Sogawa K, Nakayama K, Fujii-Kuriyama Y, and Kato R, 1996, Distinct effects of phenobarbital and its N-methylated derivative on liver cytochrome P450 induction., *Arch. Biochem. Biophys.*, 328 (1), pp. 184–92.
- 56 Chilo NH, 1999, El citocromo P450 y su rol en la hepatotoxicidad inducida por drogas, *Enfermedades del Apar. Dig.*, 2 (2), pp. 34–37.
- 57 Scanziani E, Crippa L, Giusti a M, Luini M, Pacciarini ML, Tagliabue S, and Cavalletti E, 1995, *Leptospira interrogans* serovar sejroe infection in a group of laboratory dogs., *Lab. Anim.*, 29, pp. 300–306.
- 58 Fornazari F, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HEO, Luvizotto MCR, and Langoni H, 2012, Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil, *J. Microbiol. Methods*, 90 (3), pp. 321–6.
- 59 Rossetti CA, Vanasco BN, Pini N, and Carfagnini JC, 2004, Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*), *Pesqui. Veterinária Bras.*, 24 (1), pp. 6–10.

- 60 Azizi S, Kheirandish R, and Rahimi E, 2014, Comparison of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect *Leptospira* spp . in kidneys of slaughtered cattle, *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 81 (1), pp. 1–6.
- 61 Merien F, Baranton G, and Perolat P, 1995, Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis., *J. Infect. Dis.*, 172 (1), pp. 281–285.
- 62 Bal A, Gravekamp C, Hartskeerl R, De Meza-brewster J, Korver H, and Terpstra WJ, 1994, Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis., *J. Clin. Microbiol.*, 32 (8), pp. 1894–1898.
- 63 Ooteman MC, Vago AR, and Koury MC, 2006, Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis, *J. Microbiol. Methods*, 65 (2), pp. 247–257.
- 64 Paixão M dos S, Alves-Martin MF, Tenório M da S, Starke-Buzetti WA, Alves ML, da Silva DT, Ferreira AG, Floró e Silva M, Sousa LO, and Lucheis SB, 2014, Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil., *Prev. Vet. Med.*, 115 (1)–(2), pp. 69–73.
- 65 Jimenez-Coello M, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo MF, Rodríguez-Buenfil JC, and Ortega-Pacheco A, 2008, Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests., *Acta Trop.*, 106 (1), pp. 22–6.
- 66 Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, and Quintero GM, 2011, A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines., *J. Microbiol. Methods*, 84 (1), pp. 1–7.
- 67 Joel NE, Maribel MM, Beatriz RS, and Oscar VC, 2011, Leptospirosis prevalence in a population of Yucatán, México., *J. Pathog.*, 2011, pp. 1–5.