



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Leptospira interrogans* Y *Brucella melitensis* EN REBAÑOS CAPRINOS EN EL ESTADO DE GUANAJUATO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER TITULO

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARÍA DEL PILAR FLORES PUEBLA

ASESORES:

MC. ENRIQUE HERRERA LÓPEZ

MC. JOSÉ LUIS GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

A mis padres adorados Sirenia Puebla de Jesús y José Luis Flores Martínez, ustedes que sin pedir nada a cambio me dieron el regalo más invaluable llamado confianza, sin ellos no encontraría la inspiración y la fuerza necesaria para seguir adelante, ellos que me heredaron esa determinación sin importar las adversidades y el tamaño de las pruebas a superar.

A mi hermana Luisa Fernanda Flores Puebla, por ser la persona más dulce y amorosa, que siempre está ahí para apoyarme en todo, que jamás ha dejado de creer en mí.

A Ernesto Valls Escandel, por ser un gran ángel que en vida, siempre cuidó de mi familia y me enseñó a superarse a sí mismo cada día.

Agradecimientos

A mis asesores MC. Enrique Herrera López y MC. José Luis Gutiérrez Hernández, que me brindaron su confianza, paciencia y tiempo, además de enriquecer este trabajo con su experiencia y conocimiento.

Al CENID-Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, donde me abrieron sus puertas para realizar mi servicio social, y mi tesis.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM que sin saberlo se convertiría en mi segunda casa, que viviría momentos maravillosos por estos años, y que me permitieran estudiar esta grandiosa carrera.

A mis amigos Dianita, Erik, Berenice, Cinthya, Miriam, Pablo, César, Bety, Libertad y Marlen que todo el tiempo estuvieron ahí, que me ayudaron en tantas formas, siempre me apoyaron que la verdad no encontraría la forma de como redituárselos de algún modo más que queriéndolos mucho.

Apoyo financiero

El presente trabajo fue parcialmente financiado por Fundación Guanajuato Produce A.C.
FGP: 604-13 proyecto **“Transferencia de tecnología para la prevención y control de las principales enfermedades, que afectan a caprinos del estado de Guanajuato”**

Índice

RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia y principales características de la caprinocultura en México.....	1
1.2 Características de la producción de la caprinocultura en México ante el mundo....	2
1.3 Caprinocultura en Guanajuato	5
1.4 Zoonosis: Sanidad animal y salud pública.....	6
1.5 Leptospirosis en Caprinos.....	8
1.5.1 Etiología.....	8
1.5.2 Transmisión	9
1.5.3 Signos clínicos	11
1.5.4 Patogenia.....	12
1.5.5 Diagnóstico Serológico.....	13
1.5.6 Diagnóstico bacteriológico	15
1.5.7 Diagnóstico histológico	16
1.5.8 Diagnóstico Molecular.....	16
1.5.9 Tratamiento	17
1.5.10 Control y prevención	18
1.6 Brucelosis en caprinos.	19
1.6.1 Etiología.....	19
1.6.2 Transmisión	20
1.6.3 Signos clínicos	20
1.6.4 Patogenia.....	21
1.6.5 Diagnóstico	23
1.6.6 Pruebas serológicas.....	23
1.6.7 Diagnóstico bacteriológico	27
1.6.8 Diagnóstico molecular	28
1.6.9 Tratamiento	28
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVO GENERAL	33
4.1 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL Y MÉTODOS	34

5.1 Características generales de las unidades de producción pecuaria incluidas en el estudio.....	34
5.2 Muestreo	37
5.3 Determinación de frecuencias.....	38
5.4 Toma de muestras serológicas.	38
5.5 Diagnóstico serológico de Brucelosis.....	39
5.5.1 Prueba de Tarjeta al 3%.....	39
5.5.2 Prueba de Inmunodifusión radial con hapteno nativo.....	39
5.6 Diagnóstico serológico de Leptospirosis.	40
5.6.1 Prueba de aglutinación microscópica (MAT).....	40
6. RESULTADOS	42
6.1 Resultados del diagnóstico serológico de brucelosis.....	42
6.2 Diagnóstico serológico de Leptospirosis por medio de la técnica de aglutinación microscópica (MAT).....	45
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIONES	63
9. RECOMENDACIONES	64
10. REFERENCIAS	65
ANEXOS	81
Anexo 1. Prueba de Tarjeta al 3%, para el diagnóstico de brucelosis	81
Anexo 2. Prueba de Inmunodifusión Radial con Hapteno nativo para la confirmación de animales positivos a PT 3%.....	82
Anexo 3. Preparación del medio de cultivo y del cepario de diagnóstico para leptospirosis	84
Anexo 4. Procedimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT):	85

Índice de figuras y cuadros

Figura 1. Frecuencia de brucelosis mediante la PT al 3% en rebaños caprinos del estado de Guanajuato.	42
Figura 2. Frecuencia de brucelosis por medio de la PT al 3% a nivel regional en Guanajuato.	43
Figura 3. Frecuencia de brucelosis mediante la prueba de IDR en el estado de Guanajuato.	43
Figura 4. Frecuencia de brucelosis mediante la prueba de IDR en las regiones Centro, Sur y Noroeste del estado de Guanajuato.	44
Figura 5. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en rebaños caprinos del estado de Guanajuato.	45
Figura 6. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato.....	46
Figura 7. Serovariedades de <i>Leptospira</i> detectadas en el estado de Guanajuato por medio de MAT.	47
Figura 8. Principales serovariedades de <i>Leptospira</i> detectadas en las tres regiones el estado de Guanajuato.....	48
Figura 9. Frecuencia de sueros que presentaron títulos de anticuerpos aglutinantes contra leptospirosis a una o más serovariedades mediante MAT.	49
Figura 10. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en machos reproductores de rebaños caprinos del estado de Guanajuato.....	53
Figura 11. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en machos reproductores en las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato.....	54
Figura 12. Serovariedades de <i>Leptospira</i> más frecuentes en machos reproductores en el estado de Guanajuato.	54
Cuadro 1. Distribución de muestras de suero caprino.....	37
Cuadro 2. Cepario utilizado para el diagnóstico de <i>Leptospira</i>	41
Cuadro 3. Distribución de las unidades de producción, que presentaron animales positivos a Brucelosis	45
Cuadro 4. Frecuencia de muestras seropositivas a 2 serovariedades de <i>Leptospira</i>	49
Cuadro 5. Frecuencia de muestras seropositivas a 3 serovariedades de <i>Leptospira</i>	50
Cuadro 6. Frecuencia de muestras a 4 o más combinaciones de serovariedades a <i>Leptospira</i>	51
Cuadro 7. Títulos de anticuerpos de las muestras seropositivas a MAT por serovariedad de <i>Leptospira</i>	52

RESUMEN

Flores Puebla María Del Pilar. Diagnóstico serológico de *Leptospira interrogans* y *Brucella melitensis* en rebaños caprinos en el estado de Guanajuato. (Bajo la dirección de: MC. Enrique Herrera López y MC. José Luis Gutiérrez Hernández).

A pesar que en el estado de Guanajuato la caprinocultura tiene el potencial de convertirse en una industria rentable, puntos cruciales como el desconocimiento de enfermedades que las afectan y la carencia de asistencia técnica, son factores principales en los fracasos de mejorar el desempeño del rebaño. *Brucella melitensis* y *Leptospira interrogans* son dos agentes que provocan trastornos reproductivos y representan un riesgo de zoonosis, por lo que existe la necesidad de hacer un diagnóstico oportuno. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia serológica de anticuerpos contra estos agentes en las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato. Se muestrearon a 5,555 caprinos en edad reproductiva de 162 unidades pecuarias distribuidas en las regiones noroeste, centro y sur del estado. Se probó la totalidad de los sueros con la prueba de tarjeta al 3% y como prueba confirmatoria la inmunodifusión radial; para el diagnóstico de leptospirosis se trabajó con 1,438 muestras y se usó la técnica de aglutinación microscópica. Se encontró una frecuencia a brucelosis del 0.49%, distribuidas específicamente en las regiones centro y sur; para leptospirosis se obtuvo una frecuencia del 37.90% (545/1,438), las principales serovariedades encontradas fueron Icterohaemorrhagiae (aislamiento nacional) 71.56% (390/545), Bratislava 22.75% (124/545), Hardjo 15.23% (83/545), Wolffii 11.93% (65/545), Hardjo (aislamiento nacional) 11.01% (60/545), Tarassovi 6.42% (35/545) y Canicola (aislamiento nacional) 5.50% (30/545). Se concluye que la presencia de brucelosis en el estado de Guanajuato es de baja frecuencia, presentándose en la región sur y centro; se demostró también la presencia de anticuerpos contra leptospirosis en las tres regiones estudiadas; la principal serovariedad detectada para esta enfermedad fue Icterohaemorrhagiae.

Palabras clave: Brucelosis, Leptospirosis, Caprinos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia y principales características de la caprinocultura en México

La cabra fue uno de los primeros animales en ser domesticados en el oeste de Asia, se piensa que es descendiente de las cabras salvajes de Pasang o de la Ibex griega encontradas en Asia menor, Persia y otros países cercanos. La cabra fue probablemente el primer rumiante domesticado (Cantú, 2004).

Aunque no se tiene certeza exacta, parece que el ganado caprino fue introducido a la nueva España entre los años de 1554 a 1559 (Cantú, 2004), debido a que su función era proveer de alimento a una tripulación en el viaje durante el siglo XVI, algunos de estos animales lograron sobrevivir y así fueron desembarcados en el lado noroeste de la República Mexicana (Martínez *et al.*, 2013), donde posteriormente comenzó a desarrollarse la caprinocultura (Reveles *et al.*, 2008), estos caprinos pertenecían a las razas: Blanca Celtibérica, Castellana de Extremadura y Murcina-Granadina, cuya función zootécnica principal era la producción de carne. De estas razas se originó la cabra criolla mexicana, a partir de la época de la colonia se aprovechó al ganado caprino con la exportación de cueros y pieles. Regiones como el norte y noroeste del país, comenzaban a presentar un aumento muy marcado en la tasa de crecimiento en la población caprina (González, 1977; Ducoing, 2006; Guerrero, 2010). Hacia el año 1736, comenzaba la cría como tal de esta especie en la zona norte, mientras que a la par en la zona del altiplano mexicano se denotaba el aumento de la población caprina en esa zona (Cantú, 2004).

La distribución final de esta especie en la República Mexicana se desarrolló en los climas secos del norte del país (Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí) y más tarde se difundieron en los estados del centro de la República (Guanajuato y Querétaro), donde la vegetación es abundante en mezquites y huizaches (Miranda, 1988).

Hasta el siglo pasado, en la década de los años sesentas, se fundó el centro de cría caprino de Tlahualilo, Durango, donde se llevó a cabo la importación de las razas Anglo-Nubia, Alpino Francés, Toggenburg y Saanen, provenientes en su mayoría de los Estados Unidos de América (Ducoing, 2006). En la actualidad se pueden distinguir dos tipos de cabras criollas, la primera se ubica en la parte central de México, esta es un tipo de cabra de talla pequeña muy influenciada por las razas españolas, el segundo tipo de cabra criolla se ubica en el norte de la República, esta tiene una variación debido a los cruzamientos con las razas Alpino Francés, Toggenburg y Anglo-Nubia, que tienen una talla más grande y con un rendimiento en canal superior al de las cabras de la parte central (Mason, 1981).

1.2 Características de la producción de la caprinocultura en México ante el mundo

Las estadísticas que mencionan población o número global de caprinos en el mundo no son realmente exactas, se calcula una población aproximada de 996,120,851 cabezas de caprinos, los países líderes en la producción son principalmente asiáticos y africanos, la lista es encabezada por China, India, Nigeria, Pakistán, Bangladesh, Sudán, Irán, Malí, Indonesia y Etiopía (FAO, 2012). De los 35,996,320 de cabras existentes en el continente americano, casi

la mitad se concentra en Brasil y México, nuestro país cuenta con una población de aproximadamente 9,000,000 (SIAP, 2015).

Tradicionalmente los caprinos han estado en manos de los estratos socioeconómicos más bajos de la población, debido a esto, son la especie doméstica que menos aporta al producto interno bruto en México. Actualmente la situación está cambiando, provocando la transformación a una producción pecuaria empresarial muy prometedora (Cuellar *et al.*, 2012).

La producción caprina nacional se ha visto afectada por una serie de barreras que han impedido su crecimiento y le han provocado mantenerse en una posición estática y con niveles importantes de rezago, dentro de los principales problemas que se observan en la caprinocultura nacional, resaltan los siguientes (Ducoing, 2006; Jiménez *et al.*, 2013):

- Escaso o nulo financiamiento para esta actividad dentro del subsector pecuario
- Carencia de personal capacitado técnicamente en el estudio, investigación y extensión en el conocimiento en el área, resultado así en bajos índices productivos.
- Falta de organización por parte de los productores en asociaciones, cooperativas o grupos.
- Mínima integración en la cadena de producción-consumo, lo que ha favorecido la presencia de intermediarios que realizan la comercialización de animales e insumos.
- Limitada rentabilidad, por lo que generalmente se convierte en una actividad económica secundaria.
- Alta incidencia de enfermedades en los animales.

Por estas razones, en la actualidad la caprinocultura nacional sigue sin satisfacer la cada vez más grande demanda en cantidad y calidad de los productos en esta especie; no obstante, en México este tipo de producción es bastante dinámica y contrastante, ya que se diferencia en tres principales formas de producción, de acuerdo a la manera de obtener los recursos de esta especie (Cuellar *et al.*, 2012), clasificando a los sistemas de producción caprinos existentes en:

- 1) **Sistemas extensivos:** Se basan en la utilización de animales en terrenos menos productivos, no aptos para actividades agrícolas y forestales. Es común en ellos la baja tecnificación y el sobrepastoreo, agregando además la escasez de agua en la zona. El ganado criollo es quien se ha adaptado mejor a las condiciones difíciles de este medio.
- 2) **Sistemas semi-intensivos:** Se ubican generalmente en regiones con mayor productividad, las actividades de alimentación que se llevan en el rebaño, generalmente están marcados por el pastoreo combinado con alimento balanceado. El fin de este sistema es la producción de leche y también la venta de animales para pie de cría.
- 3) **Sistemas Intensivos:** Estos sistemas se caracterizan por la estabulación total de los animales, hay inversión de capital en una superficie determinada de terreno, poseen una eficiente administración y alta tecnificación. El proceso productivo se realiza con un manejo adecuado de técnicas avanzadas en cuanto a alimentación, también se lleva a cabo una selección genética para que los animales expresen por completo su potencial de producción, hay una optimización del uso del terreno y los animales.

Existen actualmente 6 zonas caprinas en la República Mexicana: La región noroeste, la región Mixteca, la región Puebla-Veracruz, la región de La Laguna, la región Jalisco-Michoacán, y la región del Bajío (Trejo y Ortega, 2015).

La producción cárnica se desarrolla principalmente en dos zonas, la primera en estados del sur de la República Mexicana como Oaxaca, Puebla y Guerrero, quienes se caracterizan por una crianza de tipo extensivo, con pastoreo trashumante, en contra parte con caprinocultores del norte pertenecientes a los estados de Coahuila y Zacatecas, quienes se caracterizan por su mayor eficiencia en la producción cárnica, a pesar de que sus inventarios caprinos son casi la mitad de los de Oaxaca o Puebla (Jiménez *et al.*, 2013).

En la producción de leche caprina, los estados que más destacan se encuentran en el centro y norte de la República Mexicana, en los estados de Coahuila, Guanajuato, Durango, Michoacán y Querétaro, donde se obtiene alrededor del 82% de la producción láctea caprina nacional.

1.3 Caprinocultura en Guanajuato

En el año 2015, el Estado de Guanajuato ocupó el segundo lugar en producción láctea aportando 43,709,000 litros (25.8%), tan sólo por detrás del estado de Coahuila del total de la producción nacional, mientras que en la producción de carne, tiene el octavo lugar con una producción de 2,987 toneladas por año (SIAP, 2015).

Guanajuato cuenta con distintos tipos de unidades de producción, desde las tecnificadas y semi-tecnificadas que representan la cúspide de la pirámide, localizadas principalmente en la zona del Bajío del estado en los municipios de Apaseo el Grande, Celaya, Salamanca, Irapuato, Pénjamo, Abasolo, Villagrán, Cortázar y Juventino Rosas, hasta las modestas

unidades de producción, las cuales representan a la gran mayoría de los rebaños caprinos presentes en el estado, constituidos por un escaso número de animales, los cuales son manejados en pastoreo y cuidados directamente por el pastor y otros miembros de la familia (Medina y Medina, 2014).

1.4 Zoonosis: Sanidad animal y salud pública.

Una de las herramientas necesarias para una producción ganadera más sostenible es la sanidad animal, ya que los productos de origen animal además de representar una fuente de alimentos, son una fuente de ingresos para los productores. Por ello, los cambios en la producción ganadera aumentan el potencial de que surjan, crezcan y se propaguen agentes patógenos desde los animales a los seres humanos, esto significa que los animales sanos están estrechamente relacionados con las personas sanas y un medio ambiente sano (FAO, 2015).

La circulación de patógenos en las poblaciones animales representa una amenaza para la sanidad animal y la salud pública, ya que existen ciertos patógenos (virus, bacterias o parásitos) que han evolucionado y perfeccionado sus ciclos en un entorno que les es cada vez más favorable, factores que con la poca o nula participación de las personas involucradas a este medio, confabula para la diseminación de estos agentes patógenos, garantizando así su permanencia en algún animal susceptible (Flores, 2010).

Ya que muchas veces se pasa por alto la bioseguridad que se debe mantener en las unidades pecuarias para evitar la diseminación de enfermedades con potencial zoonótico, lo que propicia un riesgo para la salud pública que emerge de la interface humano – animal y ecosistema, el cual se puede describir como la exposición continua, directa o indirecta de las personas con los animales, sus productos y subproductos, así como el medio ambiente donde se desenvuelven (Flores, 2010). Existen una serie de elementos en común que influyen como

detonantes en la aparición, diseminación y permanencia de las zoonosis, entre los que destacan (Flores, 2010; Vargas y Galindo, 2013):

- Factores demográficos y socioeconómicos, donde la pobreza y el hacinamiento de animales juegan un papel importante.
- La globalización que propicia el comercio de animales, productos y subproductos.
- Falta de promoción y educación para la salud.
- Limitada infraestructura de laboratorios para el diagnóstico de este tipo de enfermedades.

Actualmente la importancia de las zoonosis, tanto por su magnitud como por su impacto, requiere la necesidad de establecer acciones conjuntas de vigilancia epidemiológica y medicina preventiva, así como programas conjuntos para el combate y potencial erradicación en la medida de lo posible (Zinsstag, 2005).

La leptospirosis es considerada como la zoonosis de mayor difusión en el mundo por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la International Leptospirosis Society (ILS). La transmisión de la leptospirosis no tiene barreras y puede ocurrir tanto entre animales de la misma especie como entre especies diferentes (Hartskeerl, 2005). La mayor prevalencia se registra en países en vías de desarrollo, principalmente trópicos y zonas húmedas.

Por otra parte, la brucelosis es considerada una enfermedad desatendida, no siempre notificada, que continúa afectando a las personas y animales, es una zoonosis que necesita la interacción de los sectores de salud pública y veterinaria. Un factor desfavorable importante

para el diagnóstico de esta enfermedad en los humanos es que los signos típicos de la enfermedad no son específicos (Flores, 2010).

1.5 Leptospirosis en Caprinos

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por bacterias pertenecientes al género *Leptospira*, tiene una amplia distribución en todo el mundo tanto en zonas rurales como urbanas que cuentan con características climatológicas y orográficas, redes pluviales naturales, extensas áreas agrícolas y presencia de lluvias estacionales que favorecen la propagación de *Leptospira*, afectado en diferentes formas que van desde la infección asintomática, aguda o crónica, a la mayoría de mamíferos domésticos y silvestres. Este microorganismo se elimina por la orina de los animales infectados de forma continua o intermitente, contaminando así al medio ambiente; por ello, es considerada como una zoonosis y un problema en salud pública de gran importancia. Los seres humanos suelen infectarse tras la exposición a agua o suelo contaminado por la orina de los animales portadores asintomáticos o reservorios, que inevitablemente predispone a la presencia de la enfermedad (García *et al.*, 2013).

1.5.1 Etiología

Este agente bacteriano comprende al género *Leptospira*, que pertenece a la familia Leptospiraceae, orden *Spirochaetales* (Faine *et al.*, 1999). Este género comprende 22 especies agrupadas en tres categorías: patogénica, intermedia y saprófita. Dentro de cada categoría existen nueve especies patógenas, cinco especies intermedias, que son distintos de los agentes patógenos y saprófitos, de acuerdo con su secuencia de ARNr 16S, y seis especies

saprófitas. Actualmente hay más de 260 serovariedades potencialmente patogénicas (Picardeau, 2013).

Las leptospiras son espiroquetas Gram negativas con forma helicoidal que usualmente miden 0.1 μm por 6 – 20 μm de longitud (Levett *et al.*, 2005). La organización estructural de estas espiroquetas está conformada básicamente de una membrana citoplasmática, una delgada capa de peptidoglicano, un espacio periplásmico y una membrana externa (Yanagawa y Faine, 1966). Presenta dos filamentos axiales (flagelos periplásmicos) con inserciones polares que se encuentran en el espacio periplásmico y son responsables de su motilidad (Picardeu *et al.*, 2001; Adler y de la Peña, 2010). La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) altamente inmunogénicos, es responsable de la especificidad de las serovariedades. Cuenta también con varias lipoproteínas (LipL32, LipL41) y porinas (OmpL1, Omp85) las cuales constituyen el sitio de interacción con el hospedero y al parecer, participan en la patogénesis de la nefritis intersticial y en la respuesta inmune innata (Levett *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2008; García *et al.*, 2013).

1.5.2 Transmisión

La transmisión requiere la circulación continua de este patógeno entre el reservorio natural, que incluye una gran variedad de mamíferos (sobre todo ratas y perros) y los huéspedes de mantenimiento (Salman y Steneroden, 2015).

La *Leptospira* de tipo patógeno tiene una preferencia marcada por colonizar y albergarse en los túbulos renales. A partir de los riñones, las leptospiras son excretadas en la orina y pueden contaminar el suelo, estanques de agua y arroyos por largos periodos (Adler y de la Peña, 2010). Las infecciones de animales o seres humanos se producen por el contacto directo con

la orina o indirectamente a partir de agua contaminada, la vía de entrada incluye heridas, cortaduras o abrasiones de la piel, mucosas o conjuntiva; sin embargo, también se sugiere que la piel reblandecida y la exposición al patógeno por tiempo prolongado es una vía de entrada. Las personas con ocupaciones de riesgo potencialmente que pueden estar infectados son los veterinarios, productores, trabajadores expuestos en alguna unidad pecuaria, científicos y técnicos en el manejo de animales de laboratorio (Haake y Levett, 2014; Olmo *et al.*, 2014).

Los caprinos son considerados menos susceptibles a leptospirosis que otras especies domésticas (Leon-Vizcaino *et al.*, 1987), ya que no parecen actuar como principales reservorios naturales, por lo que su infección en gran medida depende de las posibilidades de contacto con este microorganismo en su ambiente (Lilenbaum *et al.*, 2007a). En comparación con el ganado bovino, donde la infección es de tipo venérea, en caprinos solo se ha logrado evidenciar la presencia ADN de *Leptospira* en fluidos vaginales, confirmando la presencia del agente en el tracto genital, mientras que en machos, el hallazgo de ADN de *Leptospira* en el semen es debido a la contaminación de orina en la uretra (Lilenbaum *et al.*, 2008b).

La infección por *Leptospira* se ha clasificado en dos grupos principales: el primero consiste en animales portadores con cepas ya adaptadas como el ganado bovino, un ejemplo, sería la serovariedad Hardjo que es independiente a la región o a las precipitaciones pluviales; el segundo consta de infecciones accidentales, causadas por cepas de otros animales reservorios que conviven con ellos en el mismo medio, además que son dependientes de los factores ambientales y de las prácticas en cuestión de la misma producción agropecuaria (Lilenbaum *et al.*, 2008a).

1.5.3 Signos clínicos

La leptospirosis en caprinos puede presentarse en dos formas. La forma aguda se caracteriza con pirexia, anorexia, depresión, conjuntivitis, ictericia, diarrea y anemia o síndrome hemorrágico, con frecuencia se ven afectados en mayor medida los cabritos, asociado a serovariedades como Pomona, Icterohaemorrhagiae o Grippotyphosa (Little *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1984; Leon-Viscaino *et al.*, 1987). La forma crónica en adultos, generalmente se asocia con la enfermedad renal, enfermedad hepática o disfunción reproductiva como infertilidad, muertes neonatales, abortos, cabritos débiles y disminución de la producción de leche, teniendo esta fase mayor impacto en pérdidas económicas para el productor (Lilenbaum *et al.*, 2007b, 2008a; Martins y Lilenbaum, 2014).

Debido a que las manifestaciones clínicas son confundidas con otro tipo de patógenos, al ser correctamente diagnosticadas no son comúnmente reportadas, y la prevalencia de esta enfermedad varía en cada región o país. En estudios recientes como es el caso de Brasil, donde este agente ha tenido mayor difusión de estudio en la especie caprina denota una frecuencia de positividad 20.9% al 65% (Lilenbaum *et al.*, 2008 y Nunez de Souza *et al.*, 2001). Mientras que a nivel nacional también la frecuencia se comporta de forma diversa como: Aguascalientes con 15%, Distrito Federal 27%, Zacatecas 35% y Coahuila 46.66% (Pérez, 1985), y en años recientes tomando como ejemplo San Luis Potosí con 45.45% (González, 2013) y Guerrero, con una frecuencia de 64.26% (López, 2011).

1.5.4 Patogenia

Después del ingreso del microorganismo en el huésped, las leptospiras alcanzan rápidamente el torrente sanguíneo, conferida por su movilidad al presentar un par de filamentos axiales y su capacidad de liberar hialuronidasa, además de que probablemente facilite su diseminación a diferentes tejidos (Adler y de la Peña, 2010; Wun-Ju *et al.*, 2011), de esta forma el periodo de la leptospiremia puede durar más de una semana, este comienza al primer o segundo día después de la infección, esta fase termina con la aparición de anticuerpos circulantes, que son detectables por lo general a los 10 – 14 días. La fase aguda de la enfermedad coincide a la par con la leptospiremia, que está asociado en animales jóvenes (Hathaway *et al.*, 1983).

La primera lesión es el daño al endotelio vascular seguido de isquemia debido a la difusión y la proliferación de las espiroquetas, teniendo como resultado necrosis tubular en los riñones, daño hepatocelular y pulmonar, meningitis, miositis y placentitis. Las hemorragias y la ictericia aparecen en casos severos. Una vez que los anticuerpos circulantes aparecen, las leptospiras son removidas de la circulación, a excepción del riñón y tracto genital. En la fase crónica la producción de anticuerpos es limitada, el microorganismo sigue persistiendo en el riñón y tracto reproductivo (Adler y de la Peña, 2010).

La *Leptospira* también puede localizarse en el útero de hembras gestantes. El aborto, muerte fetal y neonatal son resultado de infecciones intrauterinas, que ocurren a finales de la gestación, ya que si la competencia inmune se ha desarrollado, los anticuerpos de las leptospiras pueden encontrarse en el feto del animal. La patogénesis de tipo reproductiva es poco conocida, pero se cree que la infección vía trasplacentaria se produce en un tiempo muy

limitado durante la leptospiremia materna. Se asocia también la infección materna a la disminución de la inmunidad uterina que es incapaz de prevenir la infección trasplacentaria por leptospiras presentes en el tracto genital (Ellis, 2014a).

Una característica adicional es la persistencia de las leptospiras en el oviducto, ya que se ha demostrado que este agente infeccioso tiene la capacidad de adherirse y penetrar la zona pelúcida y entrar en las células embrionarias, ello interfiere con la implantación del embrión o con otros eventos de la gestación temprana, así como en los tractos genitales de los machos, mientras que en la fase crónica se ha reportado su presencia en la glándula mamaria y los ganglios linfáticos (Ellis, 2014a; Martins y Lilenbaum, 2014).

1.5.5 Diagnóstico Serológico

La prueba de aglutinación microscópica (MAT por sus siglas en inglés), es una técnica de referencia empleada a nivel mundial y consiste en la evaluación de anticuerpos aglutinantes contenidos en el suero de animales infectados. Los antígenos seleccionados para su utilización en la prueba de MAT, deben incluir cepas representativas de los serogrupos que existen o en una zona geográfica en particular. Normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada con *Leptospira* de manera significativa (OIE, 2014). A pesar de la posibilidad de realizar estudios en animales individuales, la MAT se considera principalmente una prueba de rebaño (Ellis, 1996), agregando que para la obtención de información útil, se deben examinar al menos diez animales o el 10% del rebaño y documentar el historial de vacunación de los mismos, pues animales previamente vacunados contra la enfermedad pueden resultar positivos al momento de realizar la prueba (OIE, 2014).

MAT tiene limitaciones, si bien puede identificar el serogrupo presuntivo, carece de precisión, porque tienden a existir reacciones cruzadas significativas entre serovariedades (Picardeau, 2013). Al detectar por igual a la IgG y la IgM, hace que no pueda diferenciar entre infecciones actuales, recientes o pasadas (Musso y La Scola, 2013), además de no es capaz de diferenciar entre anticuerpos de infección o de vacunación (Adler y de la Peña, 2010).

La forma de interpretar los resultados de esta prueba, tiende a ser variable de acuerdo al título en el que fueron reactivos, un título bajo es apropiado en una población donde la exposición a leptospirosis es poco común, pero si la exposición es frecuente, teniendo como ejemplo la zona tropical, se debe hacer el punto de corte en el título más alto (Musso y La Scola, 2013).

Los ELISA que detectan los anticuerpos antileptospira, están basados en el uso de diferentes tipos de antígenos: el primero de ellos son pruebas de ELISA basados en el uso de OMP recombinantes (preparaciones de la proteína de la membrana externa) como antígenos, los cuales son ampliamente reactivos frente a anticuerpos contra todas las leptospiras patógenas (OIE, 2014), este tipo de pruebas no son adecuadas para la identificación de la serovariedad causal o serogrupo (Musso y La Scola, 2013), por ello no tienen valor en los estudios epidemiológicos. Otro tipo de ELISA son los basados en antígenos lipopolisacáridos, los cuales son específicos de serogrupo y sí tienen utilidad en los estudios epidemiológicos y los programas de control. Se ha reportado que los ELISA que funcionan con IgM son útiles en el diagnóstico de una infección aguda (OIE, 2014).

1.5.6 Diagnóstico bacteriológico

El aislamiento de *Leptospira* es el método definitivo para su diagnóstico, para realizar esta prueba se pueden usar muestras de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo que deben ser colectadas durante los primeros 10 días de la enfermedad, las muestras de orina pueden ser colectadas desde la segunda semana después de haber mostrado los signos clínicos (Picardeau *et al.*, 2014). Siempre y cuando no haya residuos de antibióticos, autólisis avanzada del tejido, y que estos mismos se manejen con rapidez para realizar cultivos, la muestra debe ser conservada entre 2 y 5 °C para impedir el crecimiento excesivo de otras bacterias. Como medios de transporte para el envío de las muestras, deben emplearse un medio de cultivo líquido o una solución al 1% de albúmina sérica bovina (BSA) con 5-fluorouracilo a una concentración de 100–200 µg/ml (OIE, 2014).

El cultivo debe realizarse en un medio líquido o semisólido como el medio líquido EMJH (Korrrthoff, Stuart, Ellinghausen y McCullough, Johnson y Harris) con BSA (albumina sérica bovina) o bien con Tween 80, o una combinación de Tween 80 y Tween 40. El tiempo que se requiere para la detección de un cultivo positivo varía con el serovariedad de *Leptospira* y el número de microorganismos presentes en la muestra, los serovariedades menos exigentes como Pomona y Grippotyphosa pueden dar resultados positivos muy pronto, entre 7–10 días después de la siembra; otras serovariedades como Hardjo y Bratislava pueden tardar mucho más tiempo, los cultivos deben examinarse con un microscopio de campo oscuro cada 1–2 semanas (OIE, 2014). No obstante, a pesar de considerarse el cultivo bacteriológico una herramienta diagnóstica definitiva de forma individual, se ve obstaculizada por el lento crecimiento de algunas cepas de *Leptospira* y largos periodos de incubación que pueden ir

hasta 13 semanas (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001), por esta razón, este tipo de diagnóstico no es factible como prueba de rutina (Adler y de la Peña, 2010).

1.5.7 Diagnóstico histológico

Tradicionalmente la visualización de las leptospiras se hacía con la muestra del tejido fijado en formalina y parafina, con el uso de tinciones de plata (Disbrey y Jensen, 1970), pero debido a que este método no es específico y es poco fiable (Murphy y Jensen, 1969), se han utilizado técnicas como la inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para demostrar la presencia de *Leptospira* en los cortes histológicos (Skilbeck y Chappel, 1987). Estas técnicas son útiles para diagnosticar la infección en material patológico, que es inadecuado para la realización de cultivos o donde se requiere un diagnóstico rápido. Puesto que el éxito de estas técnicas depende del número de microorganismos presentes, son menos apropiadas para diagnosticar el estado de portador crónico, donde el número de microorganismos puede ser muy bajo o localizado. Las leptospiras no se tiñen bien con los colorantes de anilina, y las técnicas de tinción argéntica carecen de sensibilidad y especificidad, aunque constituyen un complemento útil para el diagnóstico histopatológico (Baskerville, 1986).

1.5.8 Diagnóstico Molecular

Los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son un método simple y rápido para la detección de leptospiras en tejidos y fluidos corporales (OIE, 2014), detecta ADN bacteriano en muestras de sangre durante los primeros 5 - 10 días después de haber iniciado los signos clínicos de la enfermedad, ya que la carga bacteriana en suero varía desde 10^5 a 10^9 leptospiras/mL. (Boonsilp *et al.*, 2011).

Su ventaja principal reside en la capacidad de obtener un diagnóstico definitivo durante la etapa aguda de la enfermedad antes de que los anticuerpos sean detectables. A pesar de ser capaz de detectar la presencia de leptospiras patógenas, no permite identificar directamente la serovariedad (Merien *et al.*, 2005; OIE, 2014).

1.5.9 Tratamiento

El tratamiento contra la leptospirosis consiste en primera instancia, en la terapia de fluidos combinada con transfusión de sangre en los animales clínicamente anémicos (Jones *et al.*, 2012). Las leptospiras son sensibles a la mayoría de los antibióticos que incluyen tetraciclinas, penicilina/ampicilina, estreptomina, fluoroquinolonas (Spickler y Leedom, 2013); sin embargo, la mayor limitación de los antibióticos es que no eliminan el estado de portador renal. Varios antibióticos específicos han demostrado disminuir la carga bacteriana en la orina en una sola dosis, la oxitetraciclina (20 mg/kg) aplicada de forma intramuscular, la tilmicosina (10 mg/kg) en aplicación subcutánea y dihidroestreptomina-penicilina G (25 mg/ kg) aplicada en forma intramuscular son algunos ejemplos de estos antibióticos (Hernández 2005; Jones *et al.*, 2012). Se ha reportado también que la combinación de penicilina y estreptomina pueden ser considerados para detener casos de abortos masivos. Cabe de aclarar que ninguno de estos tratamientos evita la re-infección, por lo que también debe considerarse la vacunación en animales en riesgo y debe considerarse el retiro de la leche del bote o tanque, por la eliminación del antibiótico (Ellis, 2014 b).

1.5.10 Control y prevención

El control de leptospirosis en caprinos implica medidas de identificación y tratamiento en los portadores y en las fuentes de infección, se recomienda además poner en cuarentena a los animales recién adquiridos. La vacunación juega un papel importante en el control de la enfermedad, ya que puede reducir significativamente la aparición de los síntomas clínicos en el rebaño; sin embargo, la vacunación debe contener las serovariedades representativas en el rebaño, ya que la inmunización protege contra la enfermedad causada por serovariedades homologas o similares antigénicamente, por ello es parte crucial para el control de la enfermedad (Hernández, 2005; Martins y Lilenbaum, 2014). Se recomienda que el calendario de vacunación se lleve a cabo en condiciones de bajo riesgo en el rebaño cada 6 meses; en cambio, en condiciones de alto riesgo la vacuna debe emplearse cada 3- 4 meses (Bearden, 2002).

Las medidas efectivas para el control de la diseminación de este agente son a través de la limpieza y desinfección de las instalaciones donde el rebaño tiene contacto, con especial énfasis en la limpieza constante de restos de materia orgánica como lo son las excretas de los animales, restos de placentas y abortos. Otro punto crucial es el control de fauna nociva (principalmente roedores y perros) en los diversos sistemas de producción, ya que la orina de estos animales es una importante fuente de diseminación del agente, por ello la realización de pruebas serológicas para la detección de leptospirosis en un rebaño es de vital importancia (Céspedes, 2005; Hernández, 2005).

1.6 Brucelosis en caprinos.

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano que afecta al humano como a diferentes especies animales domésticas. Esta enfermedad tiene una amplia distribución mundial, los animales más comúnmente afectados son los bovinos, cabras y cerdos, el contagio al hombre suele ser accidental. La importancia económica que representa la brucelosis está dada por las pérdidas que ocasiona en la producción animal, ya que este impacto se ve reflejado en abortos, infertilidad, baja en la producción de leche y las restricciones aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos, aunado a los grandes trastornos que ocasiona en humanos infectados (Suárez *et al.*, 2013).

1.6.1 Etiología

La brucelosis es una zoonosis bacteriana causada por un microorganismo perteneciente al género *Brucella*; *B. melitensis* es el principal agente etiológico de la brucelosis en el ganado caprino (Díaz, 2013a), otra especie afectada son los ovinos y es considerado también el principal agente responsable de la brucelosis en los humanos, en donde es conocida como fiebre de Malta (Blasco y Molina 2011); *B. abortus* ocasionalmente se ve implicada en la brucelosis caprina (Santellano *et al.*, 2004). Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, intracelulares facultativos de aproximadamente 0.3x 0.44 µm, *B. melitensis* y *B. abortus* son especies de fenotipo liso (Moriyón y López, 2001; Aguilar *et al.*, 2011).

Los componentes de *Brucella* en su envoltura celular tienen mucho que ver con su resistencia a los factores ambientales, puesto que esta envoltura está formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio. La membrana

externa está en contacto con el medio y presenta un componente principal que es el lipolisacárido (LPS), el cual es un antígeno inmunodominante. El LPS consta de tres unidades estructurales: Un glicolípido (lípidio A), un núcleo oligosacárido y un polisacárido (cadena O). Otros componentes de la membrana externa son una serie de glucanos circulares, el polisacárido B, los fosfolípidos y las proteínas de membrana externa (Suárez *et al.*, 2013).

1.6.2 Transmisión

La principal vía de entrada de *Brucella* es la oral, por la ingestión de alimento o agua contaminados por secreciones, restos de abortos de cabras infectadas, o bien por el lamido de las secreciones vaginales, los genitales, los fetos abortados y los cabritos recién nacidos de cabras infectadas. La leche es una forma natural de eliminación de la *Brucella* y es trascendental en la transmisión al cabrito y al humano. La transmisión también puede ocurrir durante el ordeño a través de pequeñas abrasiones en la piel de la glándula mamaria. La transmisión vertical también es posible, ocurre cuando los cabritos se infectan en el momento de atravesar el canal del parto, o bien al mamar calostro o leche de cabras infectadas (Díaz, 2013a).

1.6.3 Signos clínicos

La principal manifestación clínica es el aborto durante el último tercio de la gestación, este signo generalmente es observado durante la gestación subsecuente a la infección, durante las siguientes gestaciones la probabilidad de aborto disminuye sustancialmente; sin embargo, el animal seguirá eliminando grandes cantidades de bacterias en el exudado vaginal. Como consecuencia de la infección también pueden presentarse mortinatos, partos prematuros con

disminución en la productividad láctea, cabritos débiles, retención de placenta y metritis. En el feto no se presenta ninguna lesión macroscópica específica (Seleem *et al.*, 2010; Díaz, 2013b; Rodolakis, 2014).

En ocasiones puede observarse artritis en los animales, pero las cabras que no están gestantes permanecen generalmente asintomáticas (Garín *et al.*, 2006; Rodolakis, 2014). La infección en los machos puede causar orquitis o epididimitis, teniendo como consecuencia la infertilidad, aunque estas manifestaciones no son frecuentes, tampoco es común la transmisión venérea (Musa *et al.*, 1990 y Chand *et al.*, 2002)

1.6.4 Patogenia

Las brucelas entran en el organismo con mayor frecuencia por la vía oral, posteriormente se dirigen a la mucosa donde son fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos, después de su internalización, la *Brucella* se encuentra dentro de una vacuola que va madurando, pasando de ser un endosoma temprano a un endosoma tardío, y si no es destruida se multiplica en el retículo endoplásmico de los macrófagos, de esa manera se disemina al resto del organismo (Arellano *et al.*, 2005; Díaz, 2013a). Una vez fagocitada es transportada a los linfonodos regionales, allí siguen multiplicándose tras su diseminación hematológica, teniendo un tropismo por los órganos del tracto reproductor (Suárez *et al.*, 2013), especialmente los cotiledones y el corion placentario, donde se multiplican abundantemente, trayendo como consecuencia una endometriosis ulcerosa en los espacios intercotiledonarios y destrucción de las vellosidades (Xavier *et al.*, 2009); mientras que a nivel hormonal induce a un aumento en los niveles de prostaglandina F_{2α}, estrógeno y cortisol a la par de una disminución de progesterona, provocando la muerte y expulsión del feto (Carvalho *et al.*, 2010; Poester *et al.*, 2013).

La principal estrategia de la *Brucella* es pasar desapercibida por el sistema inmune, una vez que ha infectado intracelularmente durante las primeras horas de infección, el aumento de citocinas en sangre es poco evidente, aún así la *Brucella* puede encontrarse en sangre dentro de células fagocíticas como los neutrófilos, que son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con la *Brucella*, la opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Esta bacteria es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares, es necesaria la desgranulación de los gránulos de los neutrófilos de mieloperoxidasa (Teixeira-Gomes *et al.*, 2000).

Las siguientes células blanco en reaccionar frente a este agente son los macrófagos y las células dendríticas que juegan un papel fundamental en la inmunidad innata, así como el reconocimiento e inducción de la inmunidad adaptativa contra las bacterias intracelulares (Skendros y Boura, 2013). Sin embargo, la degranulación de gránulos primarios y secundarios de polimorfonucleares es inhibida por *Brucella* (Riley y Robertson, 1984). El LPS es el primer antígeno frente al cual aparecen anticuerpos (Winter *et al.*, 1989) de tipo IgM e IgG, postinfecciosos, los anticuerpos pueden opsonizar cepas lisas e inmunopotenciar la infección de las células fagocíticas (Hoffmann y Houle, 1983). También se ha demostrado la producción de anticuerpos contra proteínas de membrana (Stevens y Steven, 1996). Esta bacteria es capaz de replicarse en el medio ambiente intracelular se asume que una respuesta inmune celular es de vital importancia para eliminar o proteger el huésped de la infección por este microorganismo. Los linfocitos T, juegan el papel más importante en el control y la resolución de esta infección (Oliveira y Splitter, 1996). La producción rápida de IL-12 durante la infección con la *Brucella*, también es de vital importancia para activar las células

Th1 productoras de interferón gamma (IFN- γ) y de esta manera contribuir a la inducción de la resistencia celular adquirida (Zhan y Cheers, 1995; Zaitseva *et al.*, 1996). De igual manera, el factor de necrosis tumoral (TNF α) producido durante la infección intracelular, participa en el desarrollo de la resistencia a la *Brucella*, además parece contribuir a la formación de granulomas que se observan en tejidos infectados, probablemente mediante una acción directa sobre las células efectoras, y no mediada por el interferón, ya que la selección de esta citoquina no causa una disminución en la producción de IFN- γ (Zhan *et al.*, 1996).

1.6.5 Diagnóstico

1.6.6 Pruebas serológicas

Prueba de tarjeta (PT) o rosa de bengala. Consiste en confrontar el suero problema con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración de 3% en caprinos, la cual es útil para la detección de anticuerpos inducidos tanto por *B. abortus* como por *B. melitensis*, ya que estas especies bacterianas comparten antígenos de superficie y detecta la presencia de anticuerpos circulantes de tipo IgG e IgM de origen vacunal o debido a infecciones naturales. La PT tiene como base que los anticuerpos aglutinan en forma inespecífica con el antígeno de brucelas lisas, es decir el lipopolisacárido. La lectura e interpretación de resultados es con base en los dos tipos de reacciones que pueden haber, se considera un suero como positiva cuando se formen grumos al momento de mezclarse con el antígeno, estas muestras con este tipo de reacción deben someterse a las pruebas confirmatorias, mientras que se considera un resultado negativo cuando la mezcla entre el suero y el antígeno sea una mezcla homogénea y sin grumos. Esta prueba es sencilla, económica y práctica, por lo que es ideal para el

diagnóstico poblacional. Sin embargo, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersenia* y *Pseudomona* (Díaz *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2011).

Prueba de Fijación del complemento (FC). Es la prueba de referencia internacional que sirve para determinar los títulos de anticuerpos fijadores de complemento presentes en el suero de bovinos, caprinos, ovinos y otras especies domésticas o silvestres, contra cepas de *Brucella* spp. Existen muchas variaciones de FC en distintos países (Farina, 1985; Alton, 1990; MacMillan, 1990), la prueba más utilizada se realiza en formato de microtitulación (OIE, 2009a), este método es capaz de detectar concentraciones muy bajas de IgG₁, inmunoglobulina que predomina en la infección de *Brucella* (Nielsen, 2002).

La prueba consta de 2 fases, la primera llamada fase invisible se trabaja con un primer sistema antígeno-anticuerpo, enfrentando el suero sospechoso (elemento desconocido), el antígeno específico (elemento conocido) y el complemento. En la segunda fase llamada visible se agrega un segundo sistema antígeno-anticuerpo o sistema indicador, el sistema hemolítico, formado por los glóbulos y la hemolisina. La prueba consta de varios elementos necesarios para su realización como el antígeno, los glóbulos rojos, la hemolisina, el complemento, los sueros controles positivos y negativos y los sueros problema. Todos ellos, excepto los sueros problemas, requieren ser titulados. La lectura se puede realizar en forma visual y con ayuda de un espectrofotómetro a 540 nm (Hernández, 2011). Este método carece sensibilidad y no puede discriminar como tal los anticuerpos de una infección contra una vacunación con Rev-1 (Blasco *et al.*, 1994a, b; Marín *et al.*, 1999).

Prueba de Inmunodifusión Radial (IDR) con hapteno nativo (HN). Esta prueba tiene la capacidad de detectar a los individuos que tienen anticuerpos vacunales y han resultado positivos a la PT. Tiene como fundamento que en una infección natural se promueve la exposición prolongada de la bacteria al sistema inmune, produciéndose anticuerpos contra el hapteno nativo, que es un antígeno de tipo intracelular, y no solo contra componentes de la membrana externa como ocurre en una exposición temporal o en la vacunación, permitiendo emplear esta prueba para diferenciar animales infectados de vacunados (Berman y Jones, 1979; Díaz *et al.*, 1979;). A pesar de ser considerada una prueba sencilla y económica, ha demostrado su efectividad en bovinos y caprinos (Asarta, 1989) ya que presenta 96% de sensibilidad y entre 80 a 100% de especificidad (Díaz *et al.*, 1993), actualmente no es considerada como una prueba confirmatoria oficial (Hernández y Díaz, 2000).

Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA). Tiene como objetivo detectar anticuerpos específicos contra *Brucella*, permitiendo el diagnóstico de brucelosis en bovinos, caprinos, ovinos, porcinos, bisontes y cérvidos (Nielsen y Gall, 2001). Tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 92% (Nicola *et al.*, 2010). Se trata de una técnica de tipo cuantitativa, ya que de acuerdo a la cantidad de anticuerpos específicos se forman más complejos antígeno-anticuerpo y la intensidad de fluorescencia se incrementa más (Ramírez y Álvarez, 2011).

Debido a que en las pruebas de FPA se utilizan antígenos conjugados con fluorocromos que tienen un tamaño e intensidad de fluorescencia constantes, los anticuerpos específicos, que tienen un tamaño mayor que los antígenos conjugados, se unen al marcador y forman un complejo antígeno-anticuerpo que es de mayor tamaño y por ello, la velocidad de rotación

del marcador es menor y la intensidad de la fluorescencia polarizada se incrementa. Al hacer las pruebas se realizan dos lecturas con los lectores de FPA, una inicial, con el suero en solución, para conocer la intensidad de fluorescencia basal propia de la muestra, y una lectura final después de haber añadido el antígeno marcador. Con la diferencia de las lecturas se conoce la presencia de la unión antígeno-anticuerpo (Lakowitz, 1986), pero si en las pruebas, el suero no tiene anticuerpos, o no son específicos para el antígeno, el marcador queda libre y la intensidad de fluorescencia no cambia, considerando a las muestras sometidas a esta prueba como negativas (Ramírez y Álvarez, 2011).

Immunoensayo enzimático o ensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA). Existen dos tipos de ELISA para el diagnóstico de brucelosis, el ELISA indirecto (i-ELISA) y el ELISA competitivo (c-ELISA). En i-ELISAS el antígeno de interés se fija en la placa y los anticuerpos presentes en la muestra se unen a él, esta unión es evidenciada tras la adición de un segundo anticuerpo o conjugado, específico de la especie, marcado con una enzima, el cual reacciona en presencia del sustrato o cromógeno (Crowther, 2001), ya que permite la identificación y cuantificación de anticuerpos específicos, la mayoría de i-ELISAS utilizados para el diagnóstico de la brucelosis emplean un LPS purificado como antígeno, pero existen una gran cantidad de variantes en preparaciones antigénicas, diversos conjugados de antiglobulinas con enzimas y varios sustratos/cromógenos, la mayoría de i-ELISAS detectan principalmente IgG o subclases de esta, su principal cualidad es su alta sensibilidad, pero también son más vulnerables a las reacciones no específicas, en particular con YO9 (*Yersinia enterocolitica* serotipo O:9) (OIE, 2009a; Godfroid *et al.*, 2010).

Estas reacciones cruzadas fueron motivo para el desarrollo de c-ELISA con antígeno marcado. En esta prueba, se fijan o adsorben anticuerpos específicos en el fondo de las placas sólidas, el antígeno marcado con la enzima compete con el antígeno problema por los sitios de unión a la cantidad limitada de anticuerpos (Crowther, 2001), ya que la cadena O, con el LPS en *Brucella* de tipo liso contiene epítomos específicos que no comparten con el LPS de YO9, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos específicos en el LPS de *Brucella*, fue posible el desarrollo de c-ELISAS más específicos (OIE, 2009a; Godfroid *et al.*, 2010). Se ha mencionado para el diagnóstico en brucelosis caprina, que a pesar de los buenos resultados que se han obtenido con i-ELISA y en menor medida con c-ELISA, estas tienen una sensibilidad similar o mejor que la PT y FC, pero al igual que las pruebas clásicas, ambas son incapaces de diferenciar animales infectados de animales recientemente vacunados con la vacuna Rev-1 (Jiménez *et al.*, 1992; Blasco *et al.*, 1994b; Díaz *et al.*, 1994; Delgado *et al.*, 1995; Ficapal *et al.*, 1995; Marín *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2003).

1.6.7 Diagnóstico bacteriológico

Para el aislamiento bacteriológico de *Brucella* a partir de muestras provenientes de un animal vivo, el momento óptimo de muestreo de las secreciones vaginales y de la leche se sitúa en el momento del parto, aborto o poco después de los mismos. El aislamiento también puede realizarse a partir de otras muestras como la placenta, los fetos abortados o del semen de los machos. *B. melitensis* y la mayoría de biovariedades de *B. abortus* pueden ser aisladas sin dificultad en atmósfera aerobia convencional y en medios ordinarios tales como agar sangre,

agar tripticasa soya, agar *Brucella*, etc. Los medios selectivos más utilizados son el Farrell y el Thayer-Martin modificado (Marín y Blasco, 2001; Garin *et al.*, 2006).

1.6.8 Diagnóstico molecular

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica de biología molecular que tiene una sensibilidad y especificidad cercana al 100%, se basa en la amplificación específica de un segmento de ADN para la detección de *B. melitensis*, las muestras preferentemente usadas en esta prueba son los tejidos y la sangre de cabras infectadas. La PCR permite diferenciar una infección a partir de una cepa vacunal o una de campo. (Gupta *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2011).

1.6.9 Tratamiento

Por implicar razones económicas, epidemiológicas y de salud pública, a excepción de los perros, no se da tratamiento con quimio-terapéuticos a los animales infectados (Moreno, 2014), debido a que *Brucella* habitualmente se aloja en células que confieren protección inmunológica al animal, por lo cual representa una seria dificultad para los quimioterapéuticos, el tratamiento se emplea por periodos largos de tiempo y en grandes cantidades, resultando problemática la recuperación del animal y el costo final para el responsable (Flores y Carmichael, 1981).

Se ha determinado que en México, los rumiantes que son reactores a PT deben ser marcados con una letra "B" a fuego en el masetero derecho de un tamaño de 7 x 2.5 cm para ovinos, caprinos y bovinos, puede ser usado otro tipo de identificación, siempre y cuando lo autorice la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [NOM-041].

1.6.10 Control y prevención

A nivel mundial, el control de la brucelosis animal se ha logrado a través de los programas de vacunación en combinación con las pruebas serológicas, así como la eliminación de los animales reactivos (Minas, 2006); no obstante, en cada región la adecuación de las estrategias de prevención y control de la brucelosis es más complejo (Moreno, 2002), por lo que requiere proporcionársele un enfoque de acuerdo a las condiciones socioeconómicas del lugar (Blasco y Molina, 2011). Entre las primeras medidas se deben orientar a la restricción de la diseminación de la enfermedad, para ello el monitoreo serológico es de vital importancia para conocer la situación actual en la que se encuentra el rebaño e identificar oportunamente a los animales seropositivos y evitar que diseminen el agente infeccioso a otros animales sanos (Suárez *et al.*, 2013), sin olvidar las medidas de limpieza y desinfección de la unidad pecuaria, así como limitar la entrada de animales de otras especies de animales al rebaño (Aguilar *et al.*, 2011). Es importante además la segregación de aquellos animales enfermos con este agente hasta que terminen su ciclo productivo para su eliminación paulatina (Suárez *et al.*, 2013), así como deshacerse de los restos de membranas fetales y fetos abortados ya sea enterrándolos o incinerándolos (Godfroid *et al.*, 2013), también se recomienda eliminar a las cabritas nacidas de cabras seropositivas a la enfermedad, ya que pueden presentar una infección latente e inaparente, la cual se manifestará cuando tengan su primera gestación, momento en el cual se revelará la infección y ocurrirá el aborto (Díaz, 2013b).

Una de las principales herramientas para la prevención de brucelosis caprina es la inmunización con la vacuna Rev-1, este inmunógeno está elaborado a partir de una cepa viva atenuada de *B. melitensis* (Schurig *et al.*, 2002). Las consideraciones para su uso consisten en que debe suministrarse idealmente en cabritas a los 3–6 meses de edad mediante una

inoculación subcutánea o vía conjuntival única. La dosis estándar se encuentra entre $0,5 \times 10^9$ y 2×10^9 microorganismos viables, esta vacunación debe realizarse solo una vez en la vida del animal, así como en zonas endémicas en donde la enfermedad está presente (OIE, 2009b; Rodolakis, 2014).

La vacunación subcutánea de animales jóvenes y la vacunación de adultos con dosis reducidas (dosis) en cabras no gestantes mayores de 6 meses, conduce a una persistencia duradera de anticuerpos vacunales en una gran proporción de los animales vacunados, lo que crea importantes interferencias en el diagnóstico serológico de la brucelosis. Por tanto, el diagnóstico serológico de la brucelosis debe tener en cuenta el estado de vacunación del rebaño y la distribución global de frecuencias de los títulos de anticuerpos detectados en el grupo de animales probados (OIE, 2009b).

2. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de Guanajuato en su gran mayoría no cuentan con asesoría técnica y existe un desconocimiento muy marcado sobre las principales enfermedades que afectan a los caprinos en la región; esto trae como consecuencia, mermas dentro de la economía del productor que invariablemente se vuelven puntos cruciales en el desempeño del rebaño.

La brucelosis y la leptospirosis además de provocar principalmente trastornos de tipo reproductivos, son agentes potencialmente zoonóticos, por ello existe la necesidad del diagnóstico oportuno, para que beneficien al productor en la toma de decisiones, así como en adecuar una serie de medidas preventivas para evitar la entrada de estas enfermedades que afecten a los rebaños.

3. HIPÓTESIS

Los rebaños de las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato, presentan anticuerpos contra *Brucella* y diversas serovariedades de *Leptospira*.

4. OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* y *Brucella* en rebaños de las principales zonas caprinas en el estado de Guanajuato.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de anticuerpos contra *Brucella*, por medio de la prueba de Tarjeta al 3% e inmunodifusión radial con hapteno nativo (IDR).
- Determinar la frecuencia de anticuerpos contra las principales serovariedades de *Leptospira* por medio de la técnica de Aglutinación Microscópica (MAT).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Características generales de las unidades de producción pecuaria incluidas en el estudio.

El estado de Guanajuato tiene una extensión territorial de 30, 607 km², limita al oeste con el estado de Jalisco, al norte con los estados de Zacatecas y San Luis Potosí, al este con el estado de Querétaro, y al sur con el estado de Michoacán. Fisiográficamente se ubica entre la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, al norte forma parte de la Mesa Central y al sur forma parte del eje Neovolcánico, está dividido en cuatro regiones económicas principales: I-Noreste, II-Norte, III-Centro y IV-Sur (Gobierno del estado de Guanajuato, 2014; INEGI, 2015).



División geográfica de las regiones económicas del estado de Guanajuato.

Para el presente estudio, se incluyeron tres de las cuatro regiones económicas del estado de Guanajuato que albergan a los municipios que más destacan dentro de la producción caprina, a continuación se describen algunas características pecuarias de las regiones consideradas:

Región I-Noreste. La región abarca una extensión territorial de aproximadamente 5 mil 682 km², equivalente al 18.6% del territorio estatal. Cerca del 70% del territorio de la región es área verde (bosque, matorral y otro tipo de vegetación), por lo cual es la región del estado con menor uso de suelo para agricultura, áreas urbanas y cuerpos de agua, sólo destina el 38.6% de aprovechamiento de la vegetación natural, el cual se utiliza principalmente para alimentación del ganado caprino (INEGI, 2009). Se conforma por 8 municipios, de los cuales se seleccionó 1 para la realización del siguiente estudio: San Luis de la Paz, dentro del entorno pecuario de este municipio el 75% es de tipo semi-intensivo, cuyo fin zootécnico va enfocada a la producción de carne caprina (Gobierno del estado de Guanajuato, 2014; INEGI, 2015).

Región III-Centro. La región completa abarca una extensión territorial de aproximadamente 7,761 km², equivalente al 25.4% del territorio estatal. El 70.8% de las áreas urbanas de la entidad, se localizan en esta región, lo que se traduce en una concentración de la población. Los principales usos del suelo son la agricultura con 65.5%, vegetación secundaria con 17.8% y pastizal con 9.7%. Se conforma por 16 municipios, de los cuales se seleccionaron 11 para la realización del presente estudio: Apaseo el Alto, Apaseo el Grande, Celaya, Cortázar, Irapuato, Juventino Rosas, León, Salamanca, Silao, Tarimoro y Villagrán. Entre los sistemas de producción presentes en la región el 55.29% se caracteriza por ser de tipo intensivo, 23.53% es semi-intensivo y 21.18% de tipo extensivo. La producción mixta de leche y cabrito es el principal fin zootécnico con el 61.18%, seguida por la producción de leche 37.65% (Gobierno del estado de Guanajuato, 2014; INEGI, 2015).

Región IV- Sur. Tiene una extensión territorial de aproximadamente 7, 888 km², equivalente a una cuarta parte del territorio estatal. Se caracteriza por contar con una aptitud agrícola, destinándose a esta actividad 69.1% del territorio. La región cuenta con el 60% de los cuerpos de agua del estado, dentro de los que destacan la Laguna de Yuriria, el Lago de Cuitzeo, y el acuífero Salvatierra-Acámbaro. Está conformada por 16 municipios, cinco de ellos fueron seleccionados para el estudio: Abasolo, Acámbaro, Huanímaro, Pénjamo y Salvatierra. Con respecto a los sistemas de producción, el 52.05% es de tipo semi-intensiva, 30.14% es producción extensiva y 17.81% es de tipo intensiva. El principal fin zootécnico lo abarca la producción simultanea de leche y cabrito con el 80.82%, seguida por solo producción de leche 16.44% (Gobierno del estado de Guanajuato, 2014; INEGI, 2015).

5.2 Muestreo

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo en la población, se obtuvieron un total de 5,555 muestras de suero de cabras de las regiones I-Noreste, III-Centro y IV-Sur mediante un muestreo por conveniencia de tipo no aleatorio con productores cooperantes, únicamente se consideraron a machos y hembras en edad reproductiva. Las muestras fueron obtenidas en 162 unidades de producción distribuidas en 17 municipios de las 3 regiones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de muestras de suero caprino.

Región	Número de municipios	Unidades de producción	Muestras
Región I- NORESTE	1	4	194
Región III- CENTRO	11	85	2,844
Región IV- SUR	5	73	2,517
Total:	17	162	5,555

Fuente: Elaboración propia

5.3 Determinación de frecuencias

Para conocer la frecuencia de brucelosis se procesaron el 100% de los sueros obtenidos en el muestreo, mientras que para leptospirosis, el muestreo fue polietápico, de tipo aleatorio y se determinó el tamaño mínimo de muestra por medio de la ecuación propuesta por Cannon y Roe mediante la fórmula $n = [1 - (1 - a)^{1/D}] [N - ((D - 1) / 2)]$, donde (Jaramillo y Martínez, 2010):

a= probabilidad de detectar al menos un animal enfermo (nivel de confianza)

D= número de animales enfermos en la población

N= tamaño de la población.

El análisis de datos se hizo por rebaño de cada productor cooperante, para después agruparlos en las tres regiones del Estado ya mencionadas.

5.4 Toma de muestras serológicas.

Para la obtención del suero sanguíneo se realizó una venopunción de la yugular con agujas calibre 21 G y la colecta de sangre con tubos sellados al vacío (VACUTAINER®) sin anticoagulante. Una vez obtenidas las muestras de sangre, se almacenaron en refrigeración a 4°C, para después ser transportadas al CENID-Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). En el laboratorio se centrifugaron a 350 X/g por 5 minutos, el suero obtenido se conservó en alícuotas de 2 ml a -4°C hasta su uso en el diagnóstico de brucelosis y leptospirosis.

5.5 Diagnóstico serológico de Brucelosis.

5.5.1 Prueba de Tarjeta al 3%.

Las 5,555 muestras colectadas, fueron procesadas para el diagnóstico de brucelosis en caprinos, se les realizó la prueba de Tarjeta (PT) con una concentración al 3% usando el antígeno comercial Aba Test Tarjeta al 3% (PRONABIVE, Ciudad de México, México). Esta prueba consiste en confrontar el suero problema con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración al 3%. Para su realización se agregaron 30 µl de suero la placa de vidrio y posteriormente se adicionaron 30 µl del antígeno junto a la gota de suero, inmediatamente después de poner la gota del antígeno se mezclaron ambas hasta formar una zona circular de aproximadamente 2 cm de diámetro, se hace la mezcla y se comprobó la reacción de aglutinación en los primeros cuatro minutos, cualquier reacción de aglutinación se considera positiva.

5.5.2 Prueba de Inmunodifusión radial con hapteno nativo.

A los sueros positivos a PT 3% se les realizó la prueba de inmunodifusión radial, con la finalidad de conocer a aquellos animales con infección natural y poder descartar así a los vacunados, en esta técnica el HN se incluye en el gel y en los pocillos se colocan las muestras de suero a estudiar. En la placa con el gel ya preparado (anexo 2) y una vez perforados los pozos, se llenan los pozos con 10 a 15 µl de suero y se ponen en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas, se consideraron como positivos a los sueros en los que se presentó un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo al momento de visualizar los geles a contraluz.

5.6 Diagnóstico serológico de Leptospirosis.

5.6.1 Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

Se seleccionaron 1,438 muestras mediante la fórmula de Cannon y Roe, los sueros se analizaron bajo la técnica de MAT para conocer la frecuencia de leptospirosis, así como las serovariedades más comunes en cada región. Para este trabajo se utilizaron cepas de referencia como aislamientos nacionales, las serovariedades utilizadas fueron previamente seleccionadas con las serovariedades más frecuentemente obtenidas en trabajos anteriores (García, 2011 y López 2011).

Para la realización de la prueba se realizaron diluciones dobles seriadas a partir de 1:20 hasta 1:640, de acuerdo al manual de laboratorio de leptospirosis, CENID-Microbiología, Animal (INIFAP), en todas las muestras de suero obtenidas para las serovariedades Bratislava, Wolffi, Hardjo, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Hardjo (aislamiento nacional) e Icteroharemorrhagiae (aislamiento nacional) para evaluar la presencia de anticuerpos contra (*Leptospira*), se consideraron como muestras positivas a todas aquellas que tuvieran un título de 1:40 en una escala del 1 al 4 de acuerdo a su grado de aglutinación en relación con el suero (Anexo 3 y 4). El antígeno utilizado fue tomado asépticamente del cepario de diagnóstico en turno en el laboratorio de Leptospirosis del CENID-Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Cuadro 2. Cepario utilizado para el diagnóstico de *Leptospira*.

Especie	Serogrupo	Serovariedad	Cepas
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jes-Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Sejröe	Wolffi	3707
<i>L. interrogans</i>	Sejröe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. interrogans</i>	Sejröe	Hardjo	Hardjoprajitno H-89*
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Palo Alto*
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Portland-vere	Sinaloa ACR *
<i>ND: No determinado</i>			* Aislamientos nacionales

6. Resultados

6.1 Resultados del diagnóstico serológico de brucelosis.

De las 5,555 muestras que fueron trabajadas en las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato, se encontró una frecuencia de brucelosis del 7.60% (422/5,555) mediante PT al 3% (Figura 1).

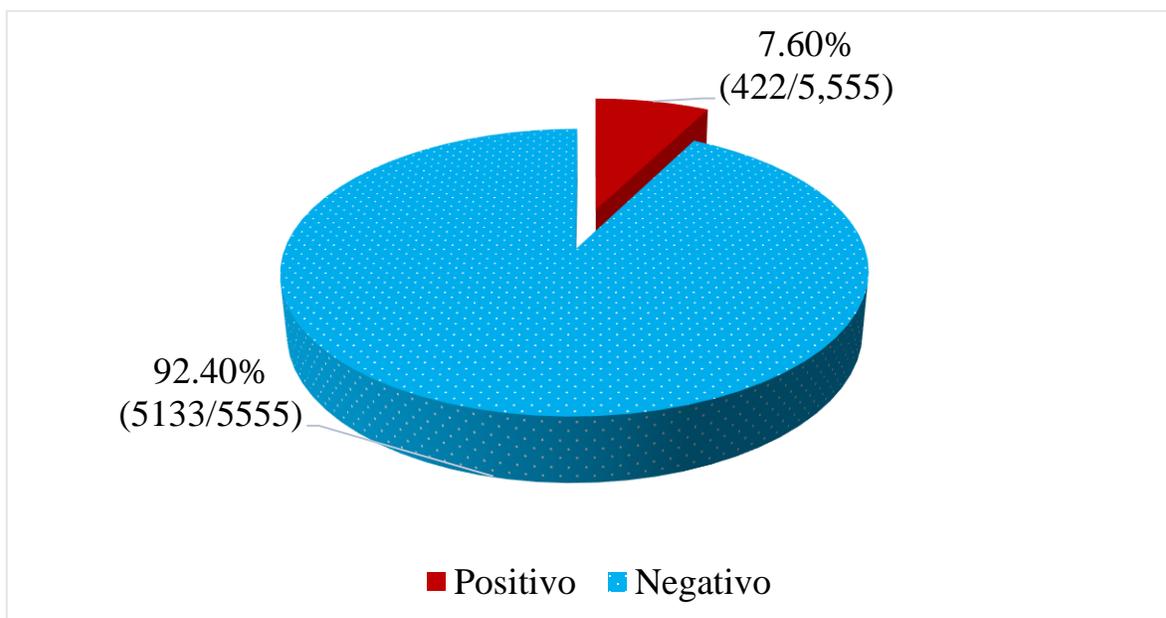


Figura 1. Frecuencia de brucelosis mediante la PT al 3% en rebaños caprinos del estado de Guanajuato.

En cuanto a nivel regional, la distribución de brucelosis fue la siguiente: III-Centro y IV- Sur obtuvieron frecuencias del 7.14% (203/ 2844) y 8.70% (219/2517) respectivamente, la región I-Noreste no presentó ninguna muestra seropositiva a la prueba (Figura 2).

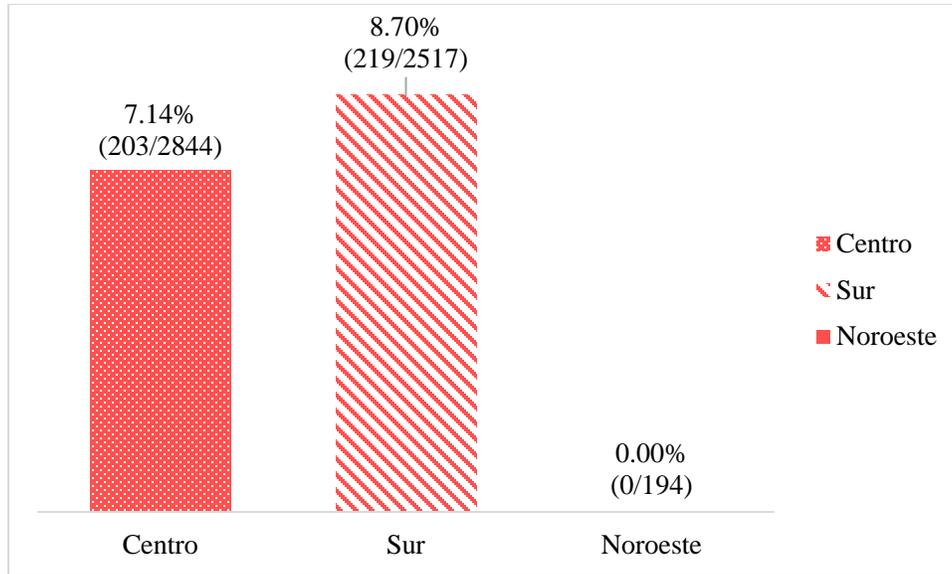


Figura 2. Frecuencia de brucelosis por medio de la PT al 3% a nivel regional en Guanajuato.

Con la finalidad de conocer si las muestras positivas a la PT al 3% pertenecían a animales vacunados con REV-1 o cursaban una infección natural, se realizó la prueba confirmatoria de IDR. El 0.49% (27/5,555) de los animales muestreados fueron positivos a la prueba (Figura 3).

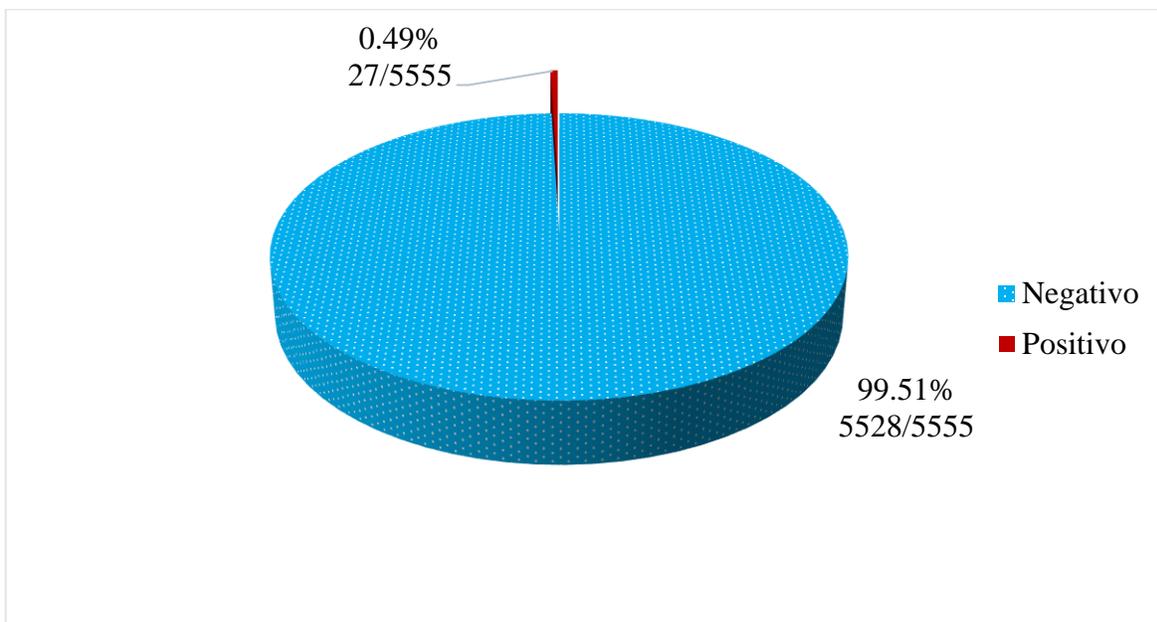


Figura 3. Frecuencia de brucelosis mediante la prueba de IDR en el estado de Guanajuato.

En la región III-Centro se obtuvo una frecuencia a brucelosis de 0.14% (4/2844), distribuidos en los municipios de Celaya, León, Tarimoro y Villagrán, la Región IV-Sur presentó una frecuencia a brucelosis de 0.91% (23/ 2517), las muestras positivas provinieron únicamente del municipio de Pénjamo, la totalidad de ellas pertenecieron a rebaños de tipo semi-intensivo (Figura 4) y (Cuadro 2).

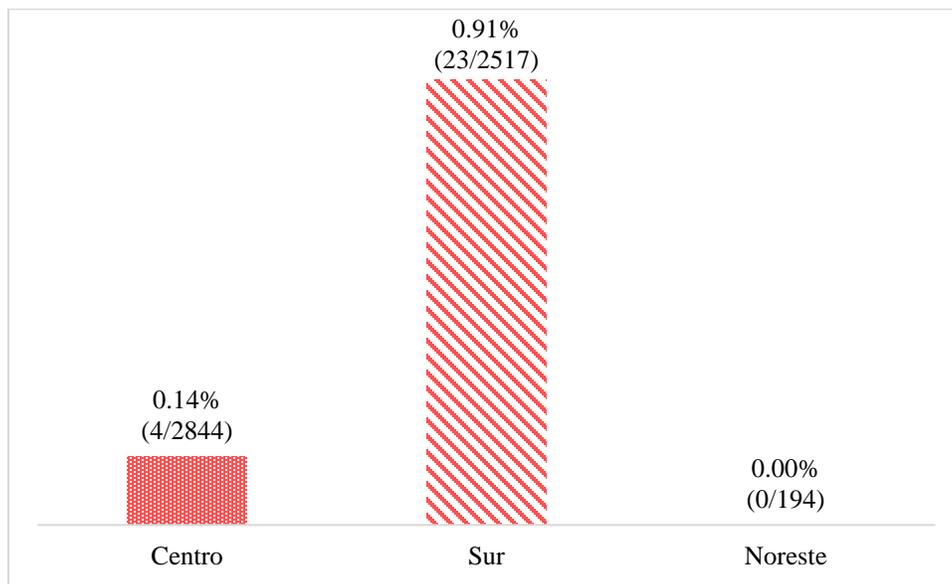


Figura 4. Frecuencia de brucelosis mediante la prueba de IDR en las regiones Centro, Sur y Noroeste del estado de Guanajuato.

Cuadro 3. Distribución de las unidades de producción, que presentaron animales positivos a Brucelosis

Región	Municipio	No. de unidad pecuaria	Tipo de producción	No. de Animales	Sexo
Centro	Celaya	1	Intensivo	1	Hembra
Centro	León	1	Extensivo	1	Hembra
Centro	Tarimoro	1	Intensivo	1	Hembra
Centro	Villagrán	1	Extensivo	1	Hembra
Sur	Pénjamo	7	Semi-intensivo	23	Hembras

6.2 Diagnóstico serológico de Leptospirosis por medio de la técnica de aglutinación microscópica (MAT).

De las 1,438 muestras procesadas, el 37.90% (545/1438) presentó anticuerpos contra leptospirosis (Figura 5).

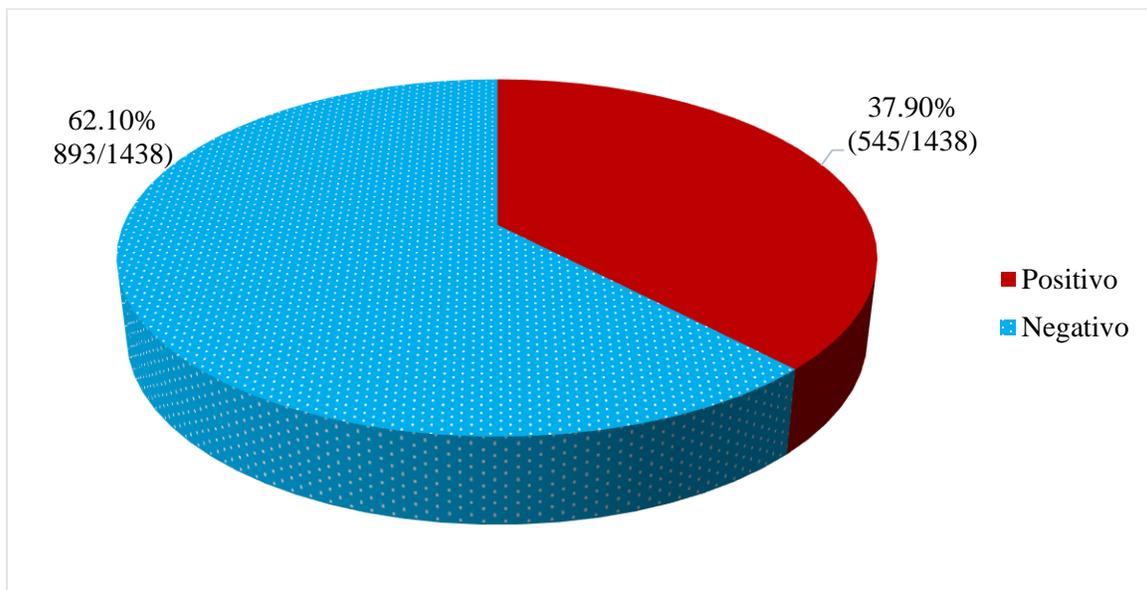


Figura 5. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en rebaños caprinos del estado de Guanajuato.

La frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en las regiones estudiadas se distribuyó con 34.28% (254/ 741) y 40.33% (265/649) de animales seropositivos en las regiones III-Centro y IV-Sur respectivamente, mientras que la región I-Noreste tuvo una frecuencia de seropositividad de 54.17% (26/48) (Figura 6).

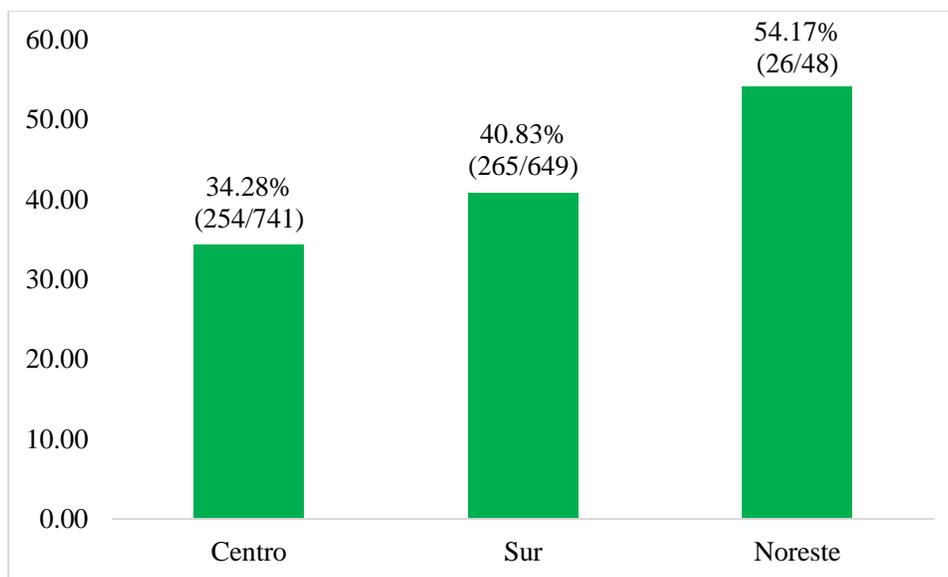


Figura 6. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato.

Se determinaron las serovariedades más frecuentes a *Leptospira* en los rebaños caprinos contemplados para el estudio, se encontró que la más predominante fue la serovariedad Icterohaemorrhagiae (aislamiento nacional) obteniendo una frecuencia del 71.56% (390/545), seguida por Bratislava 22.75% (124/545), Hardjo 15.23% (83/545), Wolffii 11.93% (65/545), Hardjo (aislamiento nacional) 11.01% (60/545), Tarassovi 6.42% (35/545) y por último la serovariedad Canicola (aislamiento nacional) 5.50% (30/545) (Figura 7).

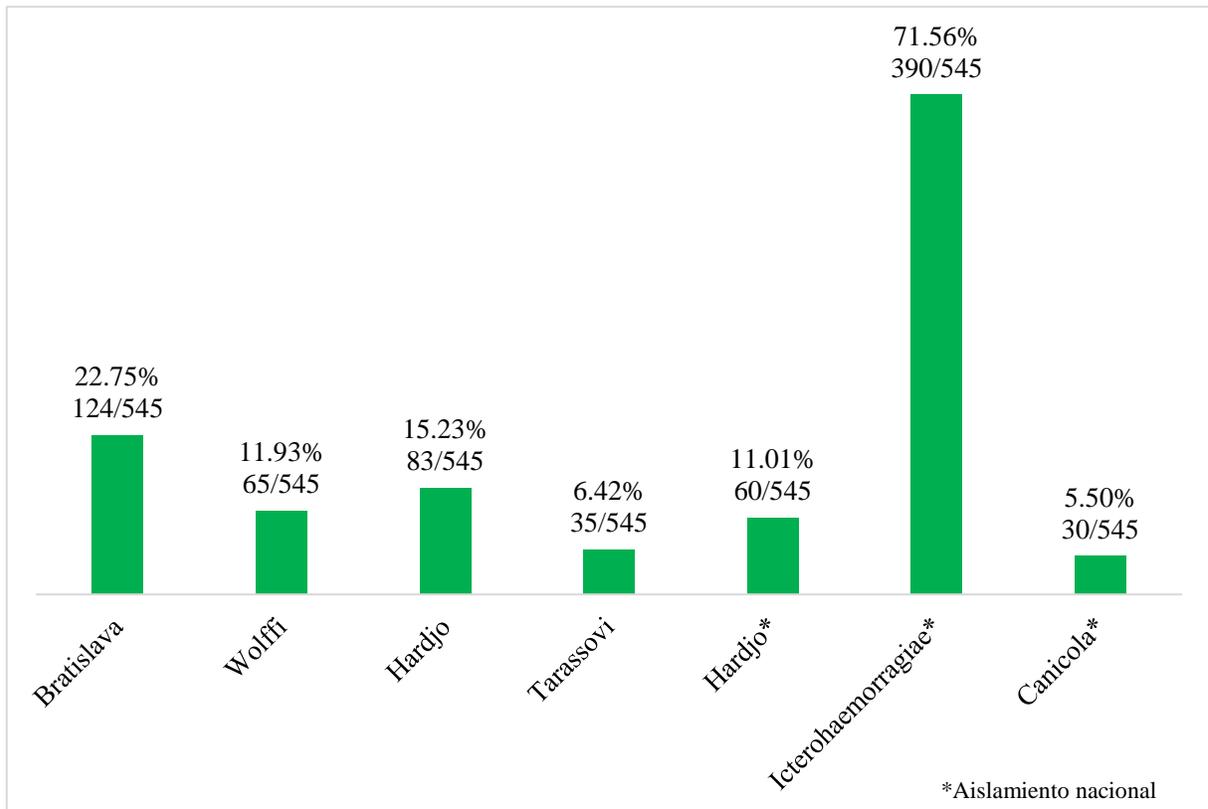


Figura 7. Serovariedades de *Leptospira* detectadas en el estado de Guanajuato por medio de MAT.

En las regiones III-Centro y IV- Sur se detectó la presencia de todas las serovariedades de *Leptospira*, en la región I-Noreste no se determinó la presencia de las serovariedades Hardjo (aislamiento nacional) y Canicola (aislamiento nacional). En todas las regiones estudiadas la serovariedad Icterohaemorrhagiae (aislamiento nacional) fue la que se diagnosticó con mayor frecuencia, seguida por las serovariedades Bratislava y Hardjo (Figuras 8).

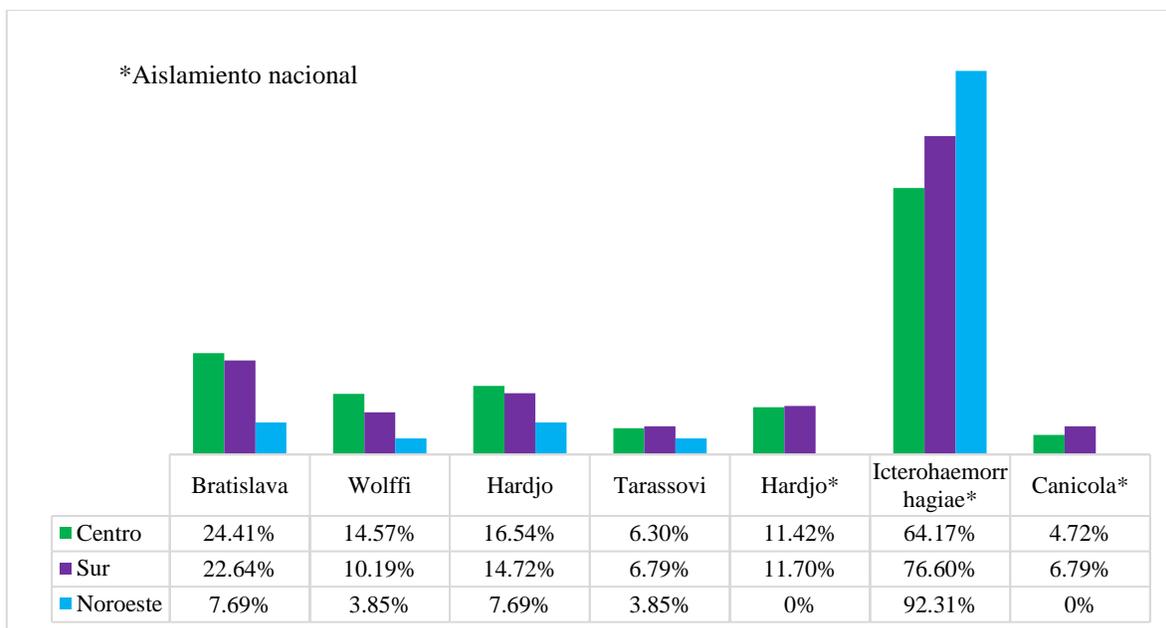


Figura 8. Principales serovariedades de *Leptospira* detectadas en las tres regiones el estado de Guanajuato.

De la totalidad de muestras positivas a MAT, el 71.01% (387/545) fueron positivas a una sola serovariedad, el 19.63% (107/545) fueron positivas a dos serovariedades y el 6.24% (34/545) fueron positivas a tres serovariedades (Figura 9).

Las combinaciones más frecuentes con dos serovariedades fueron Bratislava-Icterohaemorrhagiae (aislamiento nacional) (Cuadro 3), y con tres serovariedades fue Wolffi-Hardjo-Icterohaemorrhagiae (Cuadro 4), mientras que para 4 o más combinaciones fueron muy variadas (Cuadro 5).

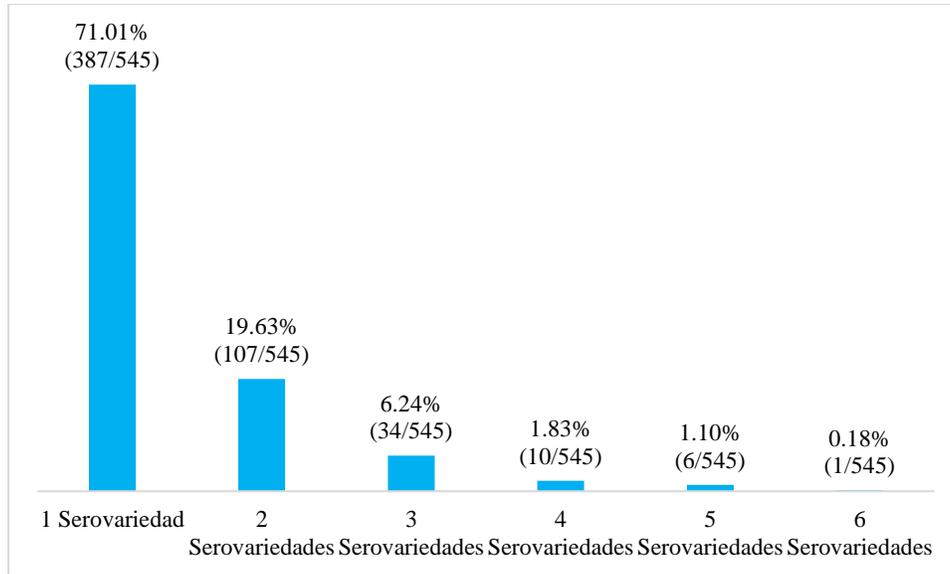


Figura 9. Frecuencia de sueros que presentaron títulos de anticuerpos aglutinantes contra leptospirosis a una o más serovariedades mediante MAT.

Cuadro 4. Frecuencia de muestras seropositivas a 2 serovariedades de *Leptospira*.

2 serovariedades	No. de Muestras positivas
Bratislava + Icterohaemorrhagiae*	36
Hardjo* + Icterohaemorrhagiae*	15
Hardjo + Icterohaemorrhagiae*	14
Wolffi + Icterohaemorrhagiae*	7
Tarassovi + Icterohaemorrhagiae*	7
Bratislava + Canicola*	5
Bratislava + Hardjo	4
Bratislava + Hardjo*	4
Hardjo + Hardjo*	4
Bratislava + Wolffi	3
Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	3
Wolffi + Hardjo	2
Hardjo + Canicola*	1
Tarassovi + Hardjo*	1
Hardjo* + Canicola*	1
TOTAL:	107

(*Aislamiento Nacional)

Cuadro 5. Frecuencia de muestras seropositivas a 3 serovariedades de *Leptospira*.

3 serovariedades	No. de Muestras
Wolffi + Hardjo + Icterohaemorrhagiae*	8
Bratislava + Wolffi + Icterohaemorrhagiae*	6
Bratislava + Hardjo + Icterohaemorrhagiae*	4
Bratislava + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	4
Bratislava + Tarassovi + Icterohaemorrhagiae*	2
Wolffi + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae*	2
Bratislava + Hardjo* + Canicola*	1
Bratislava + Tarassovi + Hardjo*	1
Bratislava + Wolffi + Hardjo	1
Bratislava + Wolffi + Canicola*	1
Hardjo + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae*	1
Hardjo + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	1
Tarassovi + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae	1
Hardjo* + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	1
TOTAL:	34
<i>Aislamiento Nacional*</i>	

Cuadro 6. Frecuencia de muestras a 4 o más combinaciones de serovariedades a *Leptospira*.

	No. de Muestras
4 serovariedades	
Bratislava + Hardjo + Tarassovi + Icterohaemorrhagiae	1
Bratislava + Hardjo + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	1
Bratislava + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	1
Bratislava + Tarassovi + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae*	2
Bratislava + Wolffi + Tarassovi + Icterohaemorrhagiae*	1
Bratislava + Wolffi + Hardjo + Icterohaemorrhagiae*	1
Bratislava + Wolffi + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	1
Wolffi + Hardjo + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae*	2
TOTAL:	10
5 serovariedades	
Wolffi + Hardjo + Tarassovi + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae*	3
Bratislava + Hardjo + Tarassovi + Hardjo* Icterohaemorrhagiae*	1
Bratislava + Wolffi + Hardjo + Tarassovi + Icterohaemorrhagiae*	1
Bratislava + Hardjo + Tarassovi + Icterohaemorrhagiae* + Canicola*	1
TOTAL:	6
6 serovariedades	
Bratislava + Wolffi + Hardjo + Tarassovi + Hardjo* + Icterohaemorrhagiae <i>Aislamiento Nacional*</i>	1

De las muestras que fueron seropositivas a leptospirosis mediante la técnica de MAT, todas presentaron títulos aglutinantes por lo menos a una de las serovariedades seleccionadas. Además, se observó que Icterohaemorrhagiae (aislamiento nacional), Bratislava y Hardjo presentaron títulos aglutinantes hasta 1:640 (Cuadro 6).

Cuadro 7. Títulos de anticuerpos de las muestras seropositivas a MAT por serovariedad de *Leptospira*.

Serovariedad	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Bratislava	70	38	8	4	1
Wolffi	31	20	9	1	0
Hardjo	26	17	20	10	5
Tarassovi	18	6	3	1	1
Hardjo*	41	10	4	7	0
Icterohaemorrhagiae*	126	119	80	53	17
Canicola*	13	3	4	4	1
Total:	325	213	128	80	25

Aislamiento Nacional*

Debido a la selección de forma aleatoria de los sueros usados para el diagnóstico de leptospirosis, no fue posible que todas las muestras de los machos fueran analizadas, sólo el 49.48% (48/97) de ellos presentó títulos de anticuerpos contra al menos una de las serovariedades de *Leptospira* en las tres regiones estudiadas (Figura 10).

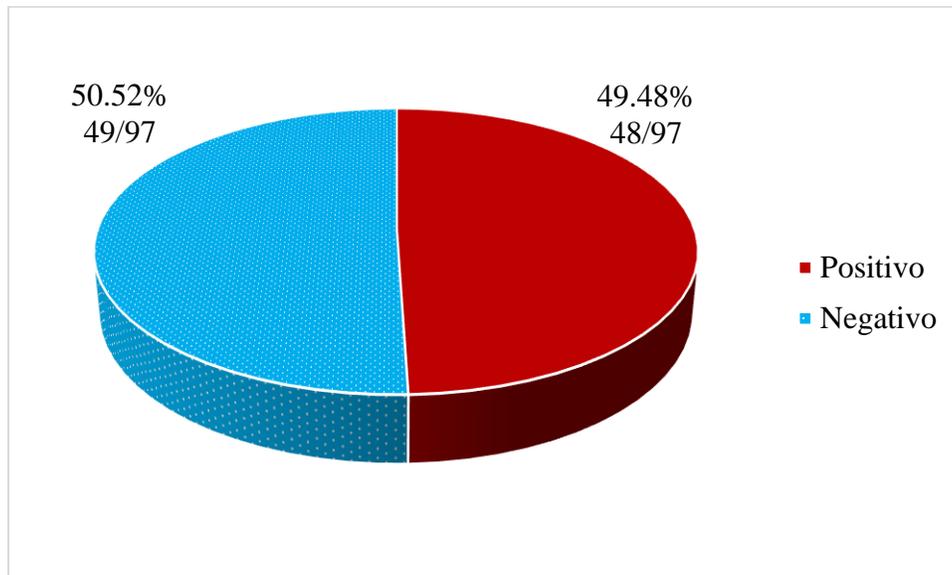


Figura 10. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en machos reproductores de rebaños caprinos del estado de Guanajuato.

Del total de machos seleccionados, el 47.83% (22/46) pertenecían a la región III-Centro, mientras que en la región IV-Sur se obtuvo una frecuencia del 48.94% (23/47), y un 75.00% (3/4) para la región II- Noreste (Figura 11).

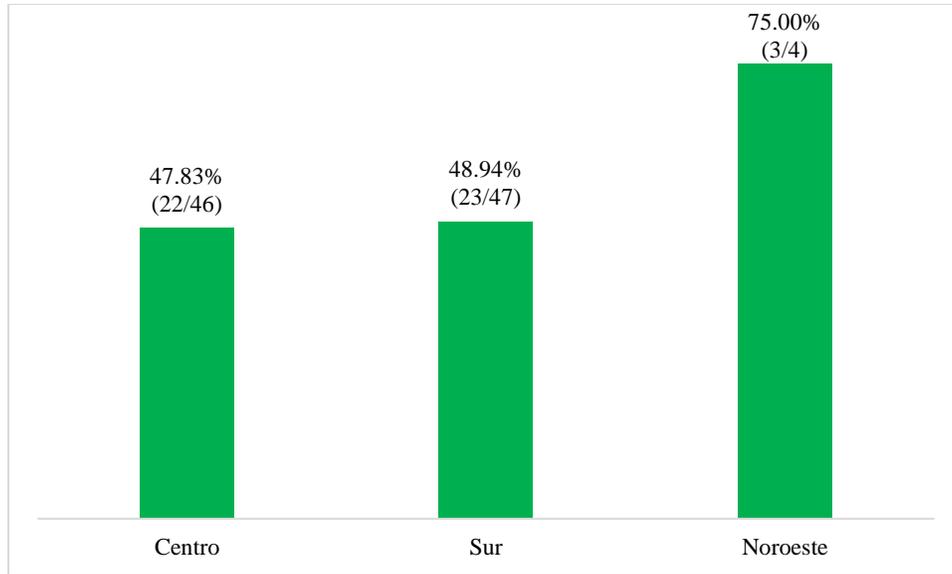


Figura 11. Frecuencia de anticuerpos contra leptospirosis en machos reproductores en las principales zonas caprinas del estado de Guanajuato.

La serovariedad Icterohaemorrhagiae fue la más frecuentemente diagnosticada con el 75% (36/48) en los machos reproductores, seguida por Bratislava 43.75% (21/48), Wolffi 18.75% (9/48), Hardjo 10.42% (5/48), Hardjo (aislamiento nacional) 8.33% (4/48), Tarassovi 6.25% (3/48) y Canicola (aislamiento nacional) 4.17% (2/48) (Figura 12).

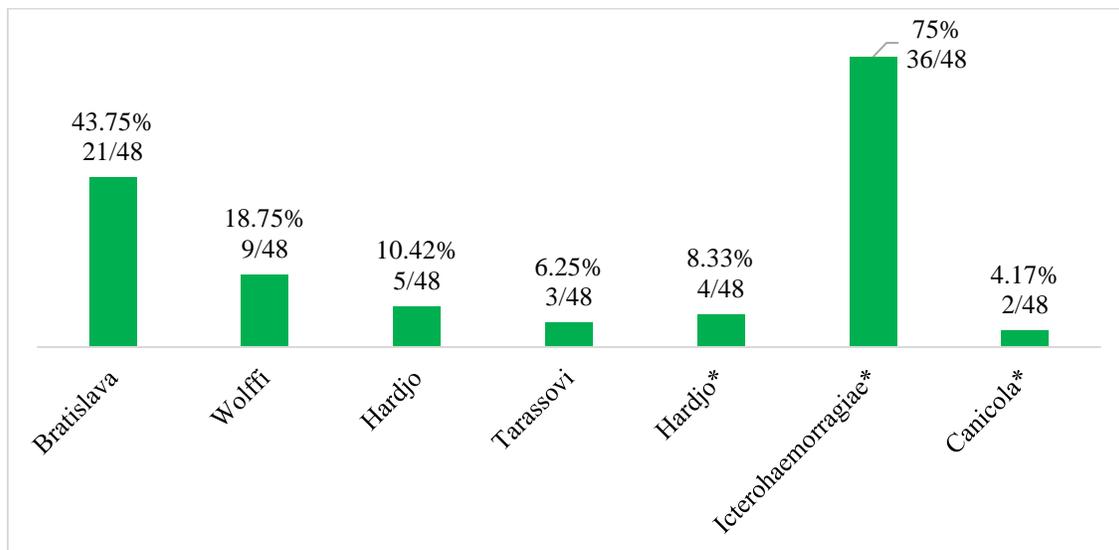


Figura 12. Serovariedades de *Leptospira* más frecuentes en machos reproductores en el estado de Guanajuato.

7. DISCUSIÓN

A pesar del repunte de la caprinocultura en el estado de Guanajuato, factores clave como la sanidad animal tienen una estrecha relación para una producción adecuada proveniente de los caprinos, facilitar su comercio así como sus productos. Por eso las pruebas de diagnóstico son herramientas esenciales para la confirmación de la situación sanitaria de los animales. Bricker, 2002, señala que existen diversas pruebas serológicas para la detección de la brucelosis caprina, pero no todas se pueden emplear indistintamente, indica que en caso de rebaños la herramienta de diagnóstico ideal es PT al 3%, por ser de bajo costo, fácil de realizar, se obtiene un resultado rápido y es altamente sensible.

Se encontraron diferencias al comparar las frecuencias de brucelosis reportadas en distintos estados de la República Mexicana, utilizando la PT al 3% se obtuvo una frecuencia de 7.60% en el presente estudio, en contraste Ortega *et al.* (2005) con la misma prueba diagnóstica, reportó una frecuencia mayor del 15.61% en el estado de Durango, en comparación con otros estados de la República Mexicana, donde sus frecuencias fueron menores; como en Tamaulipas, por Acosta *et al.* (2009) quienes reportaron una frecuencia del 6.79%; y en el estado de San Luis Potosí por Ortega y Ortega, 2007 encontraron una frecuencia del 3.49%.

Cabe destacar que dichos trabajos a diferencia de la población bajo estudio en el presente trabajo, no se habían inmunizado previamente a los animales con la cepa Rev-1, razón por la cual sólo se enfocaron en la PT como única prueba diagnóstica. Además, el conocimiento de la vacunación contra *Brucella* tiene mayor cobertura entre los caprinocultores del estado de Guanajuato, al ser un requisito indispensable para la obtención de apoyos, así como por las restricciones de comercialización impuestas, y la aplicación de la NOM-041-ZOO-1995.

La práctica constante de vacunación contra la enfermedad en los rebaños del estado, podría ser una explicación de la baja prevalencia de brucelosis encontrada en los rebaños considerados para este estudio. Cabe de resaltar que no fue posible encontrar algún trabajo disponible en el estado de Guanajuato sobre brucelosis en caprinos con las mismas características al presente estudio, por ello se comparó con otros estados en. con condiciones parecidas a la metodología empleada.

En un estudio realizado por Román (2012) en el estado de Veracruz, se reportó una frecuencia de anticuerpos contra *Brucella* del 18.18% usando la PT al 3%, pero al utilizar como prueba confirmatoria la IDR en las muestras seropositivas, la prevalencia se redujo en 0.52%, este comportamiento fue muy similar en el presente estudio en el estado de Guanajuato, ya que usando también IDR en las muestras seropositivas a la PT 3%, la frecuencia se redujo a 0.49%. La disminución en el número de animales que presentan anticuerpos contra *Brucella* luego de usar la prueba de IDR en comparación con los resultados obtenidos utilizando la PT al 3%, se debe a la inmunización con la cepa Rev-1, ya que induce seroconversión en animales vacunados, haciendo que los títulos séricos persistan por más de 8 meses (Díaz *et al.*, 1994), permitiendo que estos sean detectados mediante la PT al 3%, así como FC, debido a que ambas pruebas demuestran la presencia de anticuerpos dirigidos a los lipopolisacáridos de la pared de *Brucella* en cepas lisas (Schurig *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1996). Sin embargo, la cepa vacunal Rev.1 de *B. melitensis* también comparte el LPS que conduce a reacciones falsas positivas (Bundle *et al.*, 1984; Corbell y Cullen, 1970). La prueba de IDR, en la que el hapteno nativo es usado como antígeno, únicamente es procesado y reconocido por el sistema inmune de los animales durante una infección natural (Ramírez *et al.*, 2008).

Al delimitar los resultados obtenidos por regiones, es importante señalar que la región I-Noreste está dedicada mayoritariamente a la producción de carne de tipo semi-intensivo, en ella ningún animal fue positivo a brucelosis, en otras investigaciones que coinciden con este trabajo, Omer *et al.* (2000) y Light-Pereira (2001) informan que la brucelosis tiende a ser más frecuente en aquellos rebaños enfocados en la producción de leche que a la de carne. Sin embargo, Coehlo *et al.* (2013) contradice lo antes mencionado, e indica que en rebaños de tipo intensivo dedicado a la producción de leche se tiene de manera general, mejor gestión sanitaria debido a que los subproductos son destinados al consumo humano y que en realidad depende del manejo que se le dé a los animales en cada producción.

En la región IV- Sur se encontraron la mayoría de los animales seropositivos a brucelosis mediante la prueba de IDR, la convivencia de los caprinos de esta región con otros rebaños con animales seropositivos a brucelosis, puede ser una explicación de la presencia de la enfermedad en la zona. Solorio *et al.* (2007) reportaron que la frecuencia de brucelosis caprina era relativamente alta (9.2%) en la región bajo del estado de Michoacán, la cual es colindante con el municipio de Pénjamo. La caprinocultura de este municipio se caracteriza por tener una producción de tipo extensiva y semi-intensiva, que presumiblemente podría ser un factor de riesgo como punto de origen en la diseminación de la enfermedad, debido a la convivencia de los animales de ambos estados durante el pastoreo (Riviriego *et al.*, 2000). En estudios realizados por Kabagambe *et al.* (2001) y Ashagrie *et al.* (2011) se menciona que *B. melitensis* está principalmente involucrada con caprinos bajo sistemas de tipo extensivo. Aunque existe una contradicción, ya que Oseguera (2013) demostró que las cabras en pastoreo en el estado de Michoacán tienen mayor probabilidad de adquirir brucelosis en comparación a los rebaños que están en estabulación. Sin embargo, Rentería *et al.* (2003)

enfatan que el grado de hacinamiento y la densidad de población animal, son factores que también favorecen la transmisión de la enfermedad al propiciar una mayor probabilidad de exposición a la infección en los animales susceptibles.

Todos los animales seropositivos a brucelosis en este estudio fueron hembras. Solorio *et al.* (2007) en el estado de Michoacán, Acosta *et al.* (2009) en Tamaulipas y Román (2012) en Veracruz, describen que existe una prevalencia de la enfermedad más alta en hembras que en machos, esto puede deberse a que el manejo que se le da a ambos sexos es diferente, pues generalmente las hembras conviven en poblaciones grandes y raramente se les aísla, a diferencia de los machos que siempre están en distintos corrales y solamente cuando es época de empadre conviven con las hembras (Falcón *et al.*, 1993).

Por otro lado, existen varios estudios enfocados a la leptospirosis caprina en México, que se han determinado la presencia de anticuerpos y el posible impacto que tienen en los rebaños (López 2011 y González, 2013); a pesar de que se piensa que las cabras son menos susceptibles a la leptospirosis y que no parecen actuar como reservorios primarios a la bacteria (Leon-Vizcaino *et al.*, 1987, Faine *et al.*, 2000). Chávez (2006) menciona que tanto la infección aguda como el estado de portador no son comúnmente reportados en México, ya que la semiología común de la enfermedad como los abortos y mortinatos tienen una baja incidencia, de ahí que las pérdidas económicas en éstas especies no se comparen con las pérdidas reportadas en bovinos y cerdos. En el presente estudio, se demostró la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *Leptospira* en el estado de Guanajuato con una frecuencia general del 37.9%. La mayoría de las muestras seropositivas trabajadas con MAT pertenecían a producciones de tipo semi-intensivo e intensivo. Diversos estudios han demostrado una seroprevalencia variable contra *Leptospira*, empezando por la zona centro

del estado de Veracruz, donde se reportan frecuencias del 25.5% (Peña, 2012) y 13.74% (Santos, 2010), en Guerrero, López (2011) reportó una frecuencia de 64.26%, en la zona de la Comarca Lagunera, García (2011) demostró una frecuencia del 62% en Durango y un 60% en Coahuila, en San Luis Potosí se reportó un 45.45% (González, 2013). Estas variaciones de frecuencias descritas en distintos estados del país, probablemente se asocian a la zona geográfica donde se crían a los animales y al efecto de la humedad ambiental, el hacinamiento y convivencia con otras especies e inclusive, a las prácticas de higiene que se tiene en cada uno de los rebaños.

Al delimitar los resultados por las tres regiones estudiadas en Guanajuato se confirmó la presencia de anticuerpos contra leptospirosis, la región Noroeste mostró una seroprevalencia del 54.17%, seguida por la región Sur con 40.83% y Centro con 34.28%. En todas las regiones, las condiciones climáticas varían, en la zona Noroeste predomina un clima seco y semi seco, mientras que en las regiones Centro y Sur, va desde el cálido subhúmedo al templado subhúmedo (INEGI, 2015). Aunque *Leptospira* se desenvuelve mejor en ambientes húmedos, el clima predominante en ambas regiones puede favorecer su desarrollo (González, 2013). Dobigny *et al.*, (2015) mencionaron que a pesar de que *Leptospira* generalmente está asociada a climas tropicales, la presencia de los reservorios de mantenimiento, junto con un pobre saneamiento y áreas húmedas, favorece a la circulación de la bacteria por las zonas áridas, enfatizando también que el cambio climático acentúa todavía más la viabilidad de este agente infeccioso.

Santos, (2010) reportó que producciones de tipo intensivo y semi-intensivo que no tengan condiciones de higiene idóneas tendrán mayor predominancia a la leptospirosis, por otro lado, López (2011) mencionó que la presencia de *Leptospira* es común en las unidades de

producción de tipo extensivo, y que su presencia está relacionada con las practicas realizadas por los caprinocultures. Caso contrario ocurre en el presente estudio, ya que sin importar el tipo de producción en los que se encontraba la población bajo estudio, ya fuese intensivo, semi-intensivo y extensivo, se demostró la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en cada una de las tres regiones del estado de Guanajuato, dando pauta a que en realidad depende de las condiciones relacionadas con la higiene y el manejo en las unidades de producción. Así Thayaparan *et al.*, (2013) y Cortizo *et al.*, (2015) asociaron la presencia de tomas de agua dentro de las instalaciones, la producción de tipo semi-intensiva y la presencia de roedores con la presentación de la enfermedad.

En cuanto al orden de distribución de serovariedades reportadas en el presente estudio, fueron Icterohaemorrhagiae aislamiento nacional, Bratislava, y Hardjo las más frecuentemente diagnosticadas, la asociación más común fue Bratislava-Icterohaemorrhagiae. Estos resultados coincidieron con López (2011), que reportó las mismas serovariedades en caprinos en el Estado de Guerrero (Icterohaemorrhagiae aislamiento nacional, Bratislava, y Hardjo), inclusive el mismo patrón de asociación (Bratislava- Icterohaemorrhagiae), además señaló que uno de los principales factores de riesgo se asocian a la nula atención en el control de roedores, así como a la convivencia del rebaño con otras especies animales como perros, bovinos y ovinos; durante la realización del presente estudio, se observó la misma relación de convivencia de los rebaños caprinos de Guanajuato con las especies animales ya mencionadas, razón por la cual coincidieron con las serovariedades más frecuentes asociados a estos reservorios en común.

Debido a que la serovariedad *Icterohaemorrhagiae* fue la serovariedad más diagnosticada en este trabajo, coincidiendo con otros estudios (García, 2011; Peña, 2012 y González, 2013), reafirman el impacto negativo de la falta de control de roedores, que es un factor clave en las unidades de producción caprinas y está ligada con la diseminación de la serovariedad *Icterohaemorrhagiae*. Martins *et al.* (2012) y Dos Santos *et al.* (2012) demostraron que la serovariedad más frecuente entre los rebaños caprinos de Brasil es *Icterohaemorrhagiae*, siendo reconocido como el principal agente infeccioso. Suepaul *et al.* (2011) reafirmaron la importancia de las medidas preventivas, recomendando que estas tienen que ir encaminadas a un amplio programa de control de roedores, pues son los huéspedes de mantenimiento reconocidos para esta serovariedad, además de reducir el mínimo el acceso donde se resguardan los alimentos, la constante limpieza en los corrales y la constante eliminación de humedad acumulada dentro de las instalaciones.

La OIE (2014) considera como dilución final 1:100 para dar como positivo a la prueba de MAT, sin embargo muchos laboratorios en sus interpretaciones difieren en el título final haciéndolo mayor al establecido, en el presente estudio esto no sucedió debido a que en el estado de Guanajuato no se tiene registro de algún estudio parecido con la presencia de anticuerpos a *Leptospira*, y por ende no existe algún programa de inmunización contra este agente en caprinos, por ello el título final es menor a lo generalmente establecido. Los títulos de anticuerpos en las serovariedades diagnosticadas en el presente trabajo fueron desde 1:40-1:80, hasta 1:160, en menor grado se encontraron títulos de 1:320 y 1:640. Musso y La Scola (2013) mencionan que un título bajo es apropiado en una población donde la exposición a *Leptospira* es poco común, solamente si la exposición es frecuente como ocurre en zonas tropicales, un título alto se debe tomar en cuenta para correlacionarlos con la enfermedad.

En el estado de Guanajuato, no se practica la inmunización contra leptospirosis en caprinos, ya que la prueba de MAT no es capaz de distinguir los tipos de inmunoglobulinas (IgM o IgG) que pudiera indicar infección temprana o tardía, o si estas son generadas por la exposición al agente o por la aplicación de la vacuna (Levett, 2001; Petrakovsky *et al.*, 2014), las serovariedades diagnosticadas y los títulos de anticuerpos encontrados durante la realización de este estudio, pueden ser considerados como el resultado de la exposición del agente causal hacia los caprinos. Otros trabajos donde los animales estudiados no habían sido inmunizados previamente (García, 2011; López, 2011 y González, 2013) también reportan títulos altos al momento de realizar la prueba de MAT. En Brasil es considerada a la vacunación como la mejor herramienta de control de la enfermedad, pero no debe olvidarse que la convivencia con otras especies domesticas como los perros y bovinos dentro de los rebaños caprinos representan también un factor de riesgo para la transmisión de la leptospirosis (Peña, 2012).

En los machos reproductores se encontró que las serovariedades más frecuentemente diagnosticadas fueron Icterohaemorrhagiae, Bratislava y Wolffi. Lilenbaum *et al.* (2008a) ha demostrado que la leptospirosis puede transmitirse de forma venérea en el ganado bovino, aunque no existe evidencia de esta forma de contagio en los caprinos, puede ser considerada como una posibilidad si se toma en cuenta la jerarquización y comportamiento social que se da entre los sementales caprinos, poniendo énfasis durante el cortejo a la hembra, donde tiene como costumbre la micción frecuente en las patas, en la cara y las barbas para automarcarse, así como el olfateo hacia la orina de las hembras durante el signo de flehmen (Róman *et al.*, 2013), como un medio de transmisión de la leptospirosis.

8. CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de *Brucella melitensis*. en el estado de Guanajuato con una frecuencia baja, observándose principalmente en la zona Sur y Centro del estado.
- Se confirmó la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* en el estado de Guanajuato con una frecuencia alta, la cual se distribuye de forma homogénea en las tres regiones estudiadas, sin importar el tipo de producción, sexo y condiciones medioambientales.
- La serovariedad de *Leptospira* detectada con mayor frecuencia fue Icterohaemorrhagiae, observando que probablemente la principal fuente de diseminación son los roedores.

9. RECOMENDACIONES

- A pesar de que la frecuencia de brucelosis es baja en este estudio, no se debe dejar a un lado la vacunación en tiempo y forma, administrándose idealmente en cabritas a los 3–4 meses de edad, así como también en los rebaños que resultaron positivos, se debe contemplar la eliminación de reactores y el seguimiento de nuevos casos a través de muestreos serológicos.
- Se recomienda también para el control de leptospirosis y brucelosis, la limpieza y desinfección de forma habitual en las unidades pecuarias, con el objetivo de eliminar humedad en los corrales, eliminación de excretas de los animales infectados, así como abortos y restos de placenta.
- Evitar también el hacinamiento y contacto directo entre diferentes especies.
- Para conocer el estado inmunológico del animal, el diagnóstico en laboratorio es una herramienta clave, por eso es de vital importancia para utilizar vacunas que contengan las serovariedades específicas de *Leptospira* que afecten en la zona y/o rebaños.

10. REFERENCIAS

1. [NOM-041] Norma Oficial Mexicana [20 Ago 1996]. NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
2. Acosta GRI, Infante F, Flores GGH. 2009. Epidemiological patterns of caprine brucellosis in an unvaccinated area, México. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 160 (3):145-148.
3. Adler B, de la Peña MA. 2010. *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary microbiology* 140:287-296.
4. Aguilar RF, Cantú AC, Díaz AE, Favila GLC, Herrera LE, Morales AJF, Palomares REG, Santillán FMA. 2011. Prevención de Brucelosis en rumiantes, manual de capacitación. [ebook]. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Delegación Coyoacán, Distrito Federal, México.
http://utep.inifap.gob.mx/pdf_s/MANUAL%20BRUCELOSIS.pdf [27 de septiembre 2015].
5. Alton G. 1987. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats—a review. *Tropical Animal Health and Production*, 19: 65–74.
6. Alton GG. 1990. *Brucella melitensis*, in: Nielsen K, Duncan JR. *Animal brucellosis*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL. 383-409.
7. Aparicio BA, Díaz AE, Hernández AL, Pérez GR, Alfonseca SE, Suárez GF. 2003. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* . 41 (2):129-140.
8. Arellano RB, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini E, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I. & Gorvel J.P. 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*. 6: 618–625.
9. Asarta A. 1989. Erradicación de la brucelosis en el ganado vacuno de Navarra. *Actas del XI: Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología*. 1: 371-375.
10. Ashagrie T, Deneke Y, Tolosa T. 2011. Seroprevalence of caprine brucellosis and associated risk factors in South Omo Zone of Southern Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*. 13:1682-1685.

11. Baskerville A. 1986. Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. 36:33–43.
12. Bearden JH. 2002. Infectious diseases: Leptospirosis. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2:774-777.
13. Berman DT, Jones LM. 1979. Radial Immunodiffusion a confirmatory test for bovine brucellosis. [abstract] 83rd Annual Meeting of United States Animal Health Association. Department of Veterinary Science University of Wisconsin Madison.
14. Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marín CM, Gerbier G, Fanlo J, Jiménez BMP, Cau C, 1994a. Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* in sheep and goats. *Veterinary Record*.134:415–420.
15. Blasco JM, Marín C, Jiménez BMP, Barberán M, Hernández A, Molina L, Velasco J, Díaz, R, Moriyón I. 1994b. Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:1835–1840.
16. Blasco MJ, Molina FB. 2011. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 27: 95–104.
17. Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D. 2011. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infectious Diseases*.11:338.
18. Bricker JB. 2002. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Veterinary Microbiology* 90:433-434.
19. Bundle DR, Gidney MAJ, Perry MB, Duncan JR., Cherwonogrodzky JW. 1984. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*. 46:389–393.
20. Cantú BJE. 2004. Zootecnia de ganado caprino. [Libro en línea]. Torreón, Coahuila, México. (4 Ed). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, unidad laguna, coordinación de la división regional de ciencia animal.
<http://www.rumela.gob.mx/modules/Downloads/down/zootecnia%20caprina.pdf>. [Consulta:19 de septiembre 2015].
21. Carvalho NAV, Mol JPS, Xavier NM, Paixão AT, Lage PA, Santos LR. 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal* 184: 146–155.

22. Céspedes ZM. 2005. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 4:292-307.
23. Chand P, Sadana JR, Malhotra AK. 2002. Epididymo-orchitis caused by *Brucella melitensis* in breeding rams in India. *Veterinary Record*. 150 (3):84–85.
24. Chávez TR. 2006. Análisis de los resultados obtenidos en el diagnóstico serológico de leptospirosis en animales, de 1989 a 2004 en el departamento de microbiología e inmunología, FMVZ – UNAM México [Tesis de Licenciatura]. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
25. Corbell, M.J., Cullen, G.A., 1970. Differentiation of serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle. *The Journal of Hygiene*. 68: 519–530.
26. Cortizo P, Loureiro AP, Martins G, Do Rodrigues PR, Pego FB, Lilenbaum W, Borges DB. 2015. Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* . 47:231–235
27. Crowther. 2001. *Methods in molecular biology: The ELISA guidebook*. Volume: 149. Totowa, New Jersey: Human press.
28. Cuéllar OJA, Tórtora PJ, Trejo GA, Román RP. 2012. La producción caprina mexicana, Particularidades y complejidades. Introducción y objetivo caprinos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. 14-22.
29. Delgado S, Fernández M, Cármenes P. 1995. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 7:206–209.
30. Díaz AE, Blasco MJM, Suárez GF. 1999. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* . 30 (4): 307-311.
31. Díaz AE, Marín C, Alonso B, Aragón V, Pérez S, Pardo M, Blasco JM, Díaz R, Moriyón I. 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *B. melitensis* infection of goats. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:1159–1165.
32. Díaz AE, Moriyón UI, Blasco MJM, Marín AC, Díaz GR. 1993. Diagnóstico de *Brucella melitensis* en ovinos usando inmunodifusión radial con hapteno nativo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 34:99-103.

33. Díaz AE. 2013 a. **Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 32: 43-51.**
34. Díaz AE. 2013 b. Aplicación del diagnóstico, la vacunación y el control para disminuir la presencia de la brucelosis en caprinos. En: SAGARPA. Tecnologías en apoyo a la caprinocultura, Vol 1. Distrito Federal, México.
35. Díaz R, Garatea P, Jones LM, Moriyón I. 1979. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 10:37-41.
36. Disbrey BD, Rack JH. 1970. *Histological laboratory methods*. E & S. Livingstone, Edinburgh. 220-223.
37. Dobigny G, Garba M, Tatard C, Loiseau A, Galan M, Kadaouré I, Rossi JP, Picardeau M, Bertherat E. 2015. Urban Market Gardening and Rodent-Borne Pathogenic *Leptospira* in Arid Zones: A Case Study in Niamey, Niger. *PLOS Neglected Tropical Diseases* | DOI:10.1371/journal.pntd.0004097.
38. Dong H, Hu Y, Xue F, Sun D, Oicius DM, Mao Y. 2008. Characterization on the ompL1 gene pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity on the ompL 1 protein. *BMC Microbiology*. 8:223-234.
39. Dos Santos JP, Lima-Ribeiro AM, Oliveira PR, Dos Santos MP, Júnior AF, Medeiros, A.A., Tavares, T.C., 2012. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 44:101–106.
40. Ducoing WAE.2006. Introducción a la caprinocultura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México: 1-8. Disponible en: <http://amaltea.fmvz.unam.mx/textos/Introduccion%20a%20la%20caprinocultura%20PAPI ME.pdf>. [Consultado el 18 de septiembre 2015].
41. Ellis AW.2014 a. Animal leptospirosis: Pathogenesis. En: Adler B. *Leptospira and Leptospirosis*. Australian research council centre of excellence in structural and functional microbial genomics. Monash University. Clayton, Australia.
42. Ellis AW.2014 b. Animal leptospirosis: Treatment and control. En: Adler B. *Leptospira and Leptospirosis*. Australian research council centre of excellence in structural and functional microbial genomics. Monash University. Clayton, Australia

43. Ellis TM, Hustas L, Robertson GM, Mayberry C. 1984. Kidney disease of sheep, associated with infection by leptospiras of the Sejroe serogroup. *Australian Veterinary Journal*. 61:304-306.
44. Ellis WA. 1996. Leptospirosis. OIE. Manual: Amenment I. 1-8.
45. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Medisci Press, Melbourne, Australia.
46. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 2000. *Leptospira* and Leptospirosis. Second edition. Medisci Press, Melbourne, Australia.
47. Falcón NA, Rosales AJ, García CL. 1993. Prevalencia de brucelosis en tres municipios del sur de Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* .31 (2):97-101.
48. Farina R.1985. Current serological methods in *B. melitensis* diagnosis, in: Plommet M, Verger JM. *Brucella melitensis*, Martinus Nijhoff Publ, Dordrecht. PP. 139-146.
49. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos Dias I, Mariano I, Belo A, Rolao PI, Manteigas A, Pina Fonseca A, Correa SMI. 2003. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Veterinary Record*. 34:297–305.
50. Ficapal A, Alonso B, Velasco J, Moriyón I, Blasco JM. 1995. Diagnosis of *B. ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* . 137: 145–147.
51. Flores CR. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. *Gaceta Médica de México*. 146: 423-29.
52. Flores CR. Carmichael L.E. 1981. *Ciencia Veterinaria*. PP 192.
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c06.pdf> [15 de febrero 2016].
53. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012.
<http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e03a.pdf> [Consulta: 4 de Marzo 2016].
54. García GN.2011. Estudio epidemiológico de leptospirosis en la región lagunera del estado de Coahuila [Tesis de Licenciatura]. Torreón, Coahuila, México: Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".
55. García GR, Reyes TA, Basilio HD, Ramírez PM, Rivas SB. 2013. Leptospirosis: un problema de salud pública. *Revista Latinoamericana Patología Clínica*. 60:57-70.

56. Garin BB, Blasco JM, Marín C, Albert D. 2006. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*. 62: 63–70.
57. Gobierno del estado de Guanajuato. 2014. Programas regionales del estado de Guanajuato. http://iplaneg.guanajuato.gob.mx/contactanos/biblioteca-digital/doc_view/117-programas-regionales-vision2018-preliminar.
58. Godfroid J, Al Dahouk S, Pappas G, Rothf F, Matope G, Muma J, Marcotty T, Pfeiffer D, Skjerve E. 2013. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 36:241–248.
59. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. 2010. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* . 51: 296-305.
60. González AE. 2013. Estudio epidemiológico y factores de riesgo de leptospirosis caprina en el estado de San Luis Potosí [Tesis de maestría]. Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía.
61. González CA. 1977. El ganado caprino en México. Distribución, utilización e importancia económica. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A.C. México: 177.
62. Guerrero CMM. 2010. La Caprinocultura en México, una estrategia de desarrollo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. *Revista universitaria digital de ciencias sociales (RUDICS)*. México. 1: 1-8.
63. Gupta VK, Verma DK, Singh K, Kumari R, Singh SV, Vihan V.S. 2006. Single-step PCR for detection of *Brucella melitensis* from tissue and blood of goats. *Small Ruminant Research*. 66: 169–174.
64. Haake DA, Levett PN. 2014. Transmission. En: Adler B. *Leptospira* and Leptospirosis. Australian research council centre of excellence in structural and functional microbial genomics. Monash University. Clayton, Australia.
65. Hartskeerl RA. 2005. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. *Revista cubana de medicina tropical*. 57:7-10.
66. Hathaway SC, Ellis WA, Little TW, Stevens AE, Ferguson HW. 1983. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in pigs: a new host-parasite relationship in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 113:153–15.

67. Hernández AL.2005. Leptospirosis. En: Díaz AE, Aguilar RF, Vázquez NJ. Manual para el diagnóstico de enfermedades en ovinos y caprinos en México. Consejo técnico consultivo nacional de sanidad animal (CONASA), Comité de salud y producción ovina y caprina. [Consulta: 3 de octubre 2015].
68. Hernández AL.2011. Diagnóstico oficial de brucelosis. Memorias del tercer curso- taller nacional, diagnostico de brucelosis por medio de fluorescencia polarizada y otras técnicas modernas. Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). PP:34.
69. Hernández L, Díaz E. 2000. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para el diagnóstico de la brucelosis. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. SAGARPA, INIFAP, IICA, OMS-OPS. México. 92-97.
70. Hoffmann EM, and Houle JJ. 1983. Failure of *Brucella abortus* lipopolisaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement, Veterinary Immunology and Immunopathology. 5: 65-76.
71. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, San Luis de la Paz, Guanajuato. Clave geoestadística 11033. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/11/11033.pdf> [18 de diciembre 2015].
72. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).2015.Cuentame: Información por entidad Guanajuato. <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/gto/territorio/clima.aspx?tema=me&e=11>.
73. Jaramillo ACJ, Martínez MJJ. 2010. Búsqueda de información en la investigación epidemiológica. En: Martínez MJJ. Epidemiología veterinaria. Distrito Federal. México: Manual Moderno. PP:115-116.
74. Jiménez BMP, Marín CM, Blasco JM, Moriyón I, Gamazo C.1992. An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* Rev 1 vaccination. Veterinary Microbiology. 30: 233–241.

75. Jiménez BMR, Braña VD, Partida DPJA, Alfaro RRH, Soto SS, Torres CMG. 2013. Evaluación de la calidad en la canal caprina. Ajuchitlán, Colón, Querétaro: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). [Libro en línea]. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20Calidad%20en%20la%20Canal%20Caprina.pdf>. [Consulta: 4 de Septiembre 2015].
76. Jones M, Miesner MD, Baird AN, Pugh DG. 2012. Diseases of the urinary system: *Leptospira*. En Pugh DG, Baird AN. Sheep and goat medicine (2). Maryland Heingt, Missouri. USA.
77. Kabagambe EK, Elzer PH, Geaghan JP, Opuda-Asibo J, Scholl DT, Miller JE. 2001. Risk factors for *Brucella* seropositivity in goat herds in eastern and western Uganda. Preventive Veterinary Medicine. 52:91-108.
78. Lakowitz JR. 1986. Principles of fluorescence spectroscopy. New York. Plenum.
79. Leon-Vizcaino L, Mendoza MH, Garrido F. 1987. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. Compendium of immunology and microbiology and infectious diseases .10:149–153.
80. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Journal of medical Microbiology. 54: 45–49.
81. Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews. 14 (2):296-326.
82. Lilenbaum W, Morais MZ, Paldes GA, de Souza OG, Richtzenhain L, Vasconcellos AS. 2007b. First isolation of leptospires from dairy goats in Brazil. Brazilian Journal Microbiology 38:507-510.
83. Lilenbaum W, Nunes SG, Ristow P, Cortez MM, Fráguas S, Silva CV, Roland OWM. 2007a. A serological study on *Brucella abortus*, Caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. The Veterinary Journal. 173:408-412.
84. Lilenbaum W, Vargas R, Brandão FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. 2008b. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. Theriogenology. 69: 837-842.

85. Lilenbaum W, Vargas R, Medeiros L, Cordeiro AG, Cavalcanti A, Souza GN, Richtzenhain L, Vasconcellos SA. 2008a. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Research in Veterinary Science* 84:14-17.
86. Lithg-Pereira PL. 2001. Epidemiología de brucelosis ovina y caprina en la Provincia de León. Tesis de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, España.
87. Little TWA, Parker BNJ, Stevens AE, Hathaway SC, Markson LM. 1981. In apparent infection of sheep in Britain by leptospiras of the Australis serogroup. *Research in Veterinary Science*. 31: 386-387.
88. López HA. 2011. Diagnóstico serológico de *Leptospira* spp y de *Chlamydophila abortus* en las principales zonas de producción caprina del estado de Guerrero, México [Tesis de Licenciatura]. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
89. MacMillan A. 1990. Conventional Serological Tests, in: Nielsen K, Duncan LR, *Animal Brucellosis*, CRC Press Inc., Boca Raton. FL. PP. 153-198.
90. Marín ACM, Blasco MJM 2001. Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis animal. En: Díaz E.A, Hernández L, Valero G, Arellano B. *Brucelosis*. Delegación Cuajimalpa, Distrito Federal, México. PP. 28-29.
91. Marín C, Moren E, Moriyón I, Díaz R, Blasco JM. 1999. Performance of competitive and indirect ELISAs, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 6: 269–272.
92. Martínez RRD, Torres HG y Martínez HS. 2013. Caracterización fenotípica, productiva y reproductiva de la cabra blanca criolla del “Filo Mayor” de la Sierra Madre del Sur en el estado de Guerrero. *Revista Electrónica Nova Scientia*. 11 (6): 25 – 44.
93. Martins G, Brandão FZ, Hamond C, Medeiros M, Lilenbaum W. 2012. Diagnosis and control of an outbreak of leptospirosis in goats with reproductive failure. *The Veterinary Journal* 193: 600-601.
94. Martins G, Lilenbaum W. 2014. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. *Tropical Animal Health Production*. 46: 11–17.
95. Mason I.L. 1981. Razas indígenas de ovinos y caprinos en América Latina. Estudio FAO: Producción y sanidad animal 22: Recursos genéticos animales en América Latina. FAO y PNUMA. Roma.

96. Medina RG, Medina FE. 2014. La caprinocultura en México. Memorias del III curso nacional sobre caprinocultura. Septiembre; México (Guanajuato) Universidad Politécnica de Guanajuato, Asociación Mexicana de Profesionistas en Caprinos: 19-22.
97. Merien F, Partnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiology Letters. 249:139–147.
98. Minas A. 2006. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. Small Ruminant Research 62: 101–107.
99. Miranda G, Saravia M. 1988. Cuadernos de trabajo número 7: Manual de caprinocultura.[Ebook]. Querétaro. México. CEFRAL. PP:47. Disponible en: http://www.crefal.edu.mx/crefal25/images/publicaciones/cuadernos_trabajo/cuaderno_de_trabajo_7.pdf [Consulta 21 de septiembre 2015].
100. Moreno E. 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Frontiers in Microbiology. 5: 213.
101. Moreno E.2002. Brucellosis en Central America. Veterinary Microbiology.90:31-38
102. Moriyón I, López GI. 2001. Estructura, genética y fisiología del género *Brucella*. En: Díaz E.A, Hernández L, Valero G, Arellano B. Brucelosis. Delegación Cuajimalpa, Distrito Federal, México. PP. 17-19.
103. Murphy JC, Jensen R. 1969. Experimental pathogenesis of leptospiral abortion in cattle. American Journal of Veterinary Research. 30: 703-713.
104. Musa MT, Jahans KL. 1990. The isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a testicular hygroma of a ram in a nomadic flock of sheep and goats in Western Sudan. Journal of Comparative Pathology. 103 (4): 467–470.
105. Musso D, La Scola B. 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 46: 245-252.
106. Nicola AM, Elena S, Alonso B, Esteves MJ. 2010. Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats in Argentina.
107. Nielsen K, Gall D, Jolley M, Leishman G, Balsevicus S, Smith P, Nicoletti P, Thomas F. 1996. A homogeneous fluorescence polarization antibody assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. Journal of Immunological Methods . 195: 161–168.

108. Nielsen K, Gall D. 2001. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 22: 183-201.
109. Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 90:447-459.
110. Nunez S.G, Moreira E.C, Ristow P, Fraguas S, Lilenbaum W. 2001. Frequencia de aglutininas anti-*leptospira interrogans* em caprinos de aptidão leiteira do estado do rio de Janeiro, Brasil. *Research in Veterinary Science*. 5: 1-8.
111. Oliveira SC, Splitter GA. 1996. CD8+ type 1CD44hiCD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II deficient mice. *European Journal of Immunology*. 25: 2551-2557.
112. Olmo MFJ, Peñas EC, Sojo DJ, Muniáin EMA. 2014. Leptospirosis. *Medicine* 11. 51:3003-3008.
113. Omer MK, Skjerve E, Holstad G, Woldehiwet Z, MacMillan AP. 2000. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. *Epidemiology & Infection*. 125: 447-453.
114. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). 2015. Sanidad animal. Disponible en: <http://www.fao.org/animal-health/es/> [Consulta 18 de diciembre 2015].
115. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2009a. Código sanitario de los animales terrestres. Capítulo 2.4.3. BOVINE BRUCELLOSIS. [En línea]. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCEL L.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCEL_L.pdf). [Citado el 27 de septiembre 2015].
116. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2009b. Código sanitario de los animales terrestres. Capítulo 2.7.2. CAPRINE AND OVINE BRUCELLOSIS. [En línea]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pdf [Citado el 27 de septiembre 2015].
117. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2014. Código sanitario de los animales terrestres. capítulo 2.1.9. Leptospirosis. [en línea]. disponible

en:http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.09_Leptospirosis.pdf. [citado el 17 de septiembre 2015].

118. Ortega SE, Ortega SJL. 2007. Seroprevalencia de brucelosis caprina en tres municipios del estado de San Luís Potosí. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 6: 141-146.
119. Ortega SJL, Castrellón PFJ, Gutiérrez CJ. 2005. Seroprevalencia de brucelosis en cabras en 8 ejidos de los municipios de Tlahualilo, Mapimí, y Gómez Palacio, Durango. *Revista Chapingo. Serie: zonas áridas. UACH-URUZA*. 4 (2):81-86.
120. Oseguera MD, Frankena K, Henk Udo, Nicola MKB, Akke Z. 2013. Prevalence and risk factors for brucellosis in goats in areas of Mexico with and without brucellosis control campaign. *Tropical Animal Health Production*.45:1383–1389.
121. Peña RJA. 2012. Estudio epidemiológico de leptospirosis caprina en la zona centro del estado de Veracruz [Tesis de maestría]. Veracruz, Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
122. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. 2014. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: Reported outbreaks and literature review (2002–2014). *Internacional Journal of Environmental Reseach and public Health* 11: 10770-10789. <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/10/10770/htm>. [Consulta: 12 de septiembre 2015].
123. Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis NA, Durski K, Hartskeerl AR. 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 78:1–8.
124. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses* 43:1-9. Traducido por Elsevier Masson SAS.
125. Poester FP, Samartino LE, Santos RL. 2013. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 32: 105-115.
126. Ramírez PC, Díaz AE, Rodríguez PA, Morales LA, Álvarez OG, Gomez FR. 2008. Improved performance of *Brucella melitensis* native hapten over *Brucella abortus* OPS tracer on goat antibody detection by the fluorescence polarization assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123: 223–229.

127. Ramírez PC, Álvarez OG. 2011. Teoría de la prueba de fluorescencia polarizada. Memorias del tercer curso- taller nacional, diagnóstico de brucelosis por medio de fluorescencia polarizada y otras técnicas modernas. Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). PP: 45-48.
128. Rentería ETB, Nielsen K, Licea NAF, Montaña GMF, Moreno RJF. 2003. Evaluación de un programa de control de la brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 41 (3): 275-282.
129. Reveles TLR, Echavarría CF, Bañuelos VR, Salinas GH y Cabral AF. 2008. Empleo de marcadores moleculares en la diferenciación de razas caprinas del estado de Zacatecas, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 9: 15 – 27.
130. Reviriego FJ, Moreno MA, Domínguez L. 2000. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 44:167–173.
131. Riley LK, Robertson DC. 1984. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*. 46: 224-230.
132. Rodolakis A. 2014. Zoonoses in goats: How to control them. *Small Ruminant Research*. 121: 12–20.
133. Róman EC, Córdova IA, Soto RG. 2013. Comportamiento sexual en ovinos y caprinos. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Sociedades rurales, producción y medio ambiente. 13 (25):106-107. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, Disponible en: http://148.206.107.15/biblioteca_digital/articulos/5-666-9624maj.pdf. [Consulta 17 de Mayo 2016].
134. Román RDL. 2012. Estudio epidemiológico de la brucelosis caprina en la zona centro del estado de Veracruz. [Tesis de Licenciatura]. Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
135. Salman MD, Steneroden K. 2015. Leptospirosis. En: Sing A. Zoonoses-Infections affecting humans and animal, Focus on public health aspects. New York. USA- London. UK.

136. Santellano EE, Infante F, Díaz AE, Flores GGH. 2004. Use of an immunobinding test on nitrocellulose paper to diagnose caprine brucellosis. *Veterinary research communications*. 28: 27-31.
137. Santos BJA. 2010. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados con la presencia de leptospirosis caprina en los municipios de Chiconquiaco, Coatepec, Coacoatzintla, Tlacolulan y Yecuatla, ubicados en la zona entro del estado de Veracruz, México [Tesis de Licenciatura]. Veracruz, Veracruz, México: Universidad Veracruzana.
138. Schurig G, Roop M, Bagchi T, Boyle S, Burhman D, Srirangagathan N. 1991. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: 171–188.
139. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel JM. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 90:479–496.
140. Seleem MN, Boyle MS, Sriranganathan N. 2010. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140: 392–398.
141. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Caprinos carne y leche, Población ganadera del año 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/indexnal.jsp
142. Skendros P, Boura P. 2013. Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*.32: 137-147.
143. Skilbeck NW, Roderick CJ. 1987. Immunogold Silver Staining for Visualization of Leptospire in Histologic Sections. *Journal of clinical microbiology*. PP.85-86.
144. Solorio RJL, Segura CCJ, Sánchez GLG. 2007. Seroprevalence of and risk factor for brucellosis of goats in herds of Michoacán, México. *Preventive Veterinary Medicine* 82: 282–290.
145. Spickler AR, Leedom LKR. 2013. Leptospirosis. [En línea] Institute for international cooperation in animal biologics (IICAB): I-8. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leptospirosis.pdf> [Consulta: 17 de septiembre 2015].
146. Stevens MG, Steven CO. 1996. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B.abortus* RB51. *Infection and Immunity*. 64 (3):1030-1034.

147. Suárez GF, Arellano RB, Díaz AE. 2013. Brucelosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. Disponible en: <http://www.zoonosis.unam.mx/contenido/publicacion/archivos/libres/Brucelosis.pdf> [Consulta: 27 de septiembre 2015].
148. Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. 2011. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical Animal Health and Production*. 43:367–375.
149. Teixeira-Gomes A, Cloeckert A, Zygmunt MS. 2000. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity*. 68 (5): 2954-61.
150. Thayaparan S, Robertson ID, Fairuz A, Suut L, Abdullah, MT. 2013. Leptospirosis, an emerging zoonotic disease in Malaysia. *The Malaysian Journal of Pathology*. 35: 123–132.
151. Trejo GAA, Ortega HM. 2015. Principales regiones caprinas de México. *La revista del borrego y cabras*. D.F, México. (92). <http://www.borrego.com.mx/zootecnia/cabras/principales-regiones-caprinas-de-mexico/> [consulta: 29 agosto 2015].
152. Vargas GRE, Galindo CM. 2013. Aspectos epidemiológicos de las zoonosis. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. FMVZ/UNAM. Distrito federal, México. Disponible en: http://www.zoonosis.unam.mx/contenido/publicacion/archivos/libres/ASPECTOS_EPIDEMIOLOGICOS_DE_LAS_ZOONOSIS.pdf [Citado el: 18 de diciembre 2015].
153. Winter AJ, Duncan JR, Santisteban CG, Douglas JT, Adams LG. 1989. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Infection and Immunity*. 57: 3438-3444.
154. Wun-Ju S, Edwards C, Levett NP, Zaki RS. 2011. Leptospirosis. En: Guerrant LR, Walker DH, Weller Peter F. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*.
155. Xavier MN, Paixão TA, Poester FP, Lage AP, Santos RL. 2009. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses

- experimentally infected with *Brucella abortus*. *Journal of Comparative Pathology* . 140 (3):149–157.
156. Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D, Golding B. 1996. *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infection and Immunity*. 64: 3109-3117.
157. Zhan Y, Cheers CH. 1995. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*. 63 (4):1387-1390.
158. Zhan Y, Liu Z, and Cheers CH. 1996. Tumor necrosis factor alpha and Interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infection and Immunity*. 64 (7): 2782-2786.
159. Zinsstag J, Schelling E, Wyss K, Mahamat MB. 2005. Potential of cooperation between human and animal health to strengthen health systems. *Lancet*. 366:2142-2145.

ANEXOS.

Anexo 1. Prueba de Tarjeta al 3%, para el diagnóstico de brucelosis

1. Poner a temperatura ambiente los sueros problema, sueros control positivo y negativo así como el antígeno (ABA TEST TARJETA 3%).
2. Depositar una gota de 30 µl del suero problema sobre la placa de vidrio, con una cuadrícula de 3 x 3 cm.
3. Depositar una gota de 30 µl del Antígeno preparado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* (ABA TEST TARJETA 3%) junto al suero (no dentro de él).
4. Mezclar perfectamente el antígeno con el suero, utilizando para cada muestra una punta diferente en la micropipeta.
5. Después de mezclados, se homogenizan las mezclas con un ligero movimiento rotatorio a la placa.
6. Se procede a efectuar la lectura en los primeros cuatro minutos. La observación de la aglutinación en las placas deberá realizarse con ayuda de una fuente de luz indirecta (aglutinoscopio).

Interpretación de la prueba

(-) = No aglutinación.

(+) = Cualquier grado de aglutinación

Anexo 2. Prueba de Inmunodifusión Radial con Hapteno nativo para la confirmación de animales positivos a PT 3%.

Concentración del antígeno:

Suficiente para 3 cajas de petri (3ml/caja), la concentración final del antígeno usado es de 20 µg de HN/ml. Habitualmente el título de HN es de este orden.

Preparación de soluciones:

Solución A (amortiguador de glicina pH 7.8)

- a. Glicina 7.13 g
- b. Cloruro de sodio 5.73 g
- c. H₂O destilada 450 ml
- d. Llevar el pH a 7.8 con NaOH 1N (4 g/100 ml de H₂O)
- e. Aforar con H₂O destilada hasta 500 ml.

Solución B (Agarosa)

- a. Agarosa (pureza inmunolectroforesis) 0.8
- b. Azida de sodio 50 mg
- c. H₂O destilada 50 ml

Calentar el H₂O, añadir azida y la agarosa agitando y calentar en baño María a 100°C hasta que quede transparente y sin grumos.

Solución C (*stock* HN)

- a) 1 mg de HN en 1 ml de H₂O destilada

Preparación del gel:

- a. Disolver 1 g de NaCl en 5 ml de solución A.
- b. Añadir 200 µl de la solución C a 5 ml de la sol A + NaCl y mezclar.
- c. Calentar la mezcla anterior en baño María a 60° C.
- d. Añadir 5 ml de solución B, previamente fundida y mezclar.

- e. Verter la mezcla (con pipeta caliente) en las cajas de petri (adicionar la cantidad necesaria que proporcione un espesor de gel de 2 mm).
- f. Dejar solidificar 15 minutos, esperar 24 horas antes de emplearlas.
- g. Las placas se pueden almacenar en refrigeración en un recipiente cerrado durante 15 días.

Realización de la prueba:

- Perforar pocillos con sacabocados a una distancia mínima de 4 mm entre ellos y extraer el gel con aguja o pipeta Pasteur conectada al vacío. Llenar los pozos con 10 a 15 μ l de suero e incubar las placas en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 24 horas, permitiendo así la unión antígeno-anticuerpo precipite de forma visible sobre la placa en las muestras positivas.

Anexo 3. Preparación del medio de cultivo y del cepario de diagnóstico para leptospirosis

Para el cepario de diagnóstico se utilizó medio Cox para la siembra, y este fue preparando usando un litro de agua destilada, en el que se usó 2gr de caldo biotriptosa, 40 ml de fosfato de potasio (KH_2PO_4) al 1/15mM, 1 ml de rojo de fenol al 0.4% y oscilar con un pH de 7.2-7.4, después el preparado con cinta testigo se esterilizó en la autoclave 121°C, 15 lb de presión durante 15 a 20 min. Posteriormente ya cuando este enfrió, se vierte en tubos con taparrosca de 10 ml previamente esterilizados para después se agregarse asépticamente 1ml de suero estéril de conejo, para después dejar el medio durante 24 hrs en una estufa bacteriológica a 30°C, para comprobar su esterilidad, sin que haya algún tipo de residuo. Pasando este lapso de tiempo, se agregaron 2 ml del cultivo anterior de la serovariedades seleccionadas para dejarlas incubar por 7 días a 28-30°C. Una vez terminado este lapso de tiempo se confirmó su viabilidad a través de un microscopio a campo oscuro, este cepario se albergó después en un lugar a temperatura ambiente, lejos de la luz solar.

La resiembra se debe hacer cada 21 días, para evitar que el cepario se mantenga viable.

Anexo 4. Procedimiento de la Técnica de Aglutinación Microscópica (MAT):

Diluciones:

Humanos, pequeños rumiantes y evaluación de bacterinas se requiere una dilución 1:20.

1. Tomar una pipeta con 1 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) y depositarlo en un tubo de ensaye.
2. Del suero a evaluar tomar 90 μ l y agregarlo en un tubo con PBS. Obteniendo así una dilución inicial de 1:10, la cual será transformada en la placa posteriormente a 1:20
3. Una vez que se obtiene la dilución inicial; se procede a colocar en la microplaca serológica 50 μ l de PBS en el segundo y tercer pozo con la micropipeta multicanal y puntas, dejando el primer pozo vacío. También se deberá colocar 50 μ l de PBS a los pozos destinados para el control.
4. Se cambian las puntas de la micropipeta y se toman 50 μ l de la dilución y son depositados en el primer pozo, se toman otros 50 μ l y se revuelven en el segundo pozo tomando 50 μ l que pasaran al tercer pozo donde se revuelven y se toman nuevamente 50 μ l los cuales serán desechados
5. Encender un mechero con un radio de cobertura de 15 a 20 cm. Y limpiar con una solución de alcohol al 66%.
6. Llevar a esta área la microplaca preparada y el cepario de diagnóstico.
7. Se toma asépticamente 0.05 ml por cada pozo a diagnosticar de la cepa a evaluar, se vacía en una canaleta (se va a cambiar de pipeta para cada toma de diferente cepa).

8. Adicionar 50µl de la cepa a cada uno de los pozos correspondientes a la cepa incluyendo el control (No revolver). Realizar el mismo procedimiento para cada una de las cepas restantes, cambiando de puntas para cada una.

9. Se someten a un periodo de incubación de una 1 hora en la cámara húmeda.

10. Al término de la incubación se procede a realizar la lectura de la prueba.