



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Detección de anticuerpos contra *Leptospira spp* en Zarigüeya o Tlacuache común

(*Didelphis marsupialis*) capturados en un zoológico de la Ciudad de México.

TESIS

Para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

presenta:

Karina Hernandez Pascacio

Asesor de Tesis:

Dr. José Francisco Morales Álvarez

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

a. Índice de Figuras y Tablas.....	ii
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Antecedentes y epidemiología.....	2
2.2 <i>Leptospira spp.</i>	3
2.3 Cultivo in vitro.....	4
2.4 Clasificación serológica de <i>Leptospira ssp.</i>	5
2.5 Zoonosis y transmisión.....	7
2.6 Reservorios o vectores animales.....	9
2.6.1 Patogenia.....	12
2.7 Diagnóstico.....	13
2.8 Interpretación de MAT.....	14
2.9 Zarigüeya (<i>Didelphis marsupialis</i>).....	15
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivo general.....	18
5.1 Objetivos específicos.....	18
6. Metodología.....	18
6.1 Material necesario para MAT.....	18
6.1.2 Equipo.....	19
6.1.3 Reactivos.....	19
6.2 Obtención de muestras.....	20
6.3 Cepario.....	21
6.4 Protocolo de inspección de muestras.....	21
6.5 Descripción de la placa de MAT.....	22
6.6 Desarrollo de la técnica.....	23
6.6.1 Dilución de muestras para MAT.....	23
6.7 Interpretación de lectura de MAT.....	26
7. Resultados.....	27
8. Discusión.....	29
9. Conclusiones.....	31
10. Recomendaciones.....	32
10. Anexo.....	33
11. Literatura citada.....	34
11.1. Consultas.....	43

a. Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1. Micrografía de <i>Leptospira biflexa</i> serovariedad <i>andama</i> al microscopio de barrido 8000x	4
Figura 2. Leptospirosis, naturaleza bifásica e investigación dentro de sus diferentes estados de enfermedad, desde inicio de signología.....	11
Figura 3. Zarigüeya en su hábitat natural al Sur de la República Mexicana.....	15
Figura 4. Materiales usados para realizar MAT dentro del laboratorio	19
Figura 5. Identificación de muestras obtenidas del banco	20
Figura 6. Materiales usados para realizar MAT a: Medio EMJH en polvo para la elaboración de medio para cultivo de <i>Leptospira</i> . b: tubos contenedores de cepas leptospirales para ser incubadas en estufa bacteriológica. c: Enriquecimiento EMJH Difco™ para el desarrollo de <i>Leptospira</i> en medio EMJH.....	21
Figura 7. <i>Leptospira hardjo</i> observada en microscopio óptico a 100-200X.....	22
Figura 8. Placas de plástico usadas en MAT.....	23
Figura 9. Gota seca de <i>Leptospira hardjo</i> observada en	26
Figura 10. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) a: lámina control; b: lámina con 25%	27

Tablas

Tabla 1. Hospedero-reservorio comunes de serovariedades leptospirales.....	10
Tabla 2. Sinonimias o nombres comunes de nombres de <i>Didelphis marsupialis</i> de acuerdo al país donde se encuentra la especie.	16
Tabla 3. Cepas usadas en este estudio.	22
Tabla 4. Ejemplo para realizar la microtitulación en placa para prueba de MAT.....	25
Tabla 5. Número total de sueros positivos a las diferentes serovariedades de <i>Leptospira</i>	28
Tabla 6. Resultados de sueros positivos y negativos en MAT y serovariedades.	28

1. Resumen.

La leptospirosis una enfermedad zoonótica presente en países con clima cálido y húmedo idóneo para la supervivencia de la bacteria causal *Leptospira spp*, esta enfermedad es asociada con prácticas laborales y recreativas: agricultores, mineros, veterinarios, deportistas acuáticos en las que se tiene una exposición a aguas contaminadas con el microorganismo. En México es poca la información generada en los últimos diez años; así como los reservorios comunes (además de roedores) que pueden ser factor de riesgo para otras especies animales con las que interactúan. Este trabajo permite obtener información sobre la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) la cual habita en el bosque perimetral de un zoológico de la Ciudad de México y sobre la seroprevalencia de *Leptospira spp* a través de una prueba de laboratorio altamente sensible y confiable. Para determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en suero de zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) las muestras de suero de 40 zarigüeyas capturadas en el perímetro del zoológico fueron desafiadas a 9 serovariedades de *Leptospira spp* mediante la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). Los resultados obtenidos fueron 15 sueros positivos a *Leptospira hardjo* del total de muestras procesadas. La prevalencia corresponde a 37.5% de muestras positivas y los 25 restantes al 62.5% de sueros negativos a todas las serovariedades. La seroprevalencia en este estudio y la falta de seguimiento a los animales muestreados sugieren la realización de un nuevo estudio y seguimiento a los animales que permanecen en el perímetro del zoológico.

2. Introducción.

2.1 Antecedentes y epidemiología.

La leptospirosis es una zoonosis presente en países con clima cálido y húmedo en alguna época del año, con una mayor incidencia en regiones tropicales y que ahora se ha identificado como una de las enfermedades infecciosas reemergentes (Levett, 2001; Vijayachari, 2008). Esta bacteria ha sido encontrada en todas las especies mamíferas que han sido estudiadas en los 5 continentes, exceptuando la Antártida (Adler, et al. 2011). Se ha identificado como su reservorio principal los roedores, especialmente las ratas excretando la bacteria en su orina. En los seres humanos la enfermedad puede provocar insuficiencia renal e incluso la muerte en el 5 al 20% de los casos. Se han reportado más de 1 millón de casos graves de leptospirosis al año en todo el mundo con una tasa de letalidad superior al 10% (Institute Pasteur, 2013).

Esta enfermedad se asocia con prácticas laborales: agricultores, mineros, veterinarios y en varios países los casos estudiados se relacionan con prácticas recreativas (deportistas acuáticos principalmente) en las que se tiene una exposición a aguas contaminadas con el microorganismo (Céspedes, 2002). Los factores ambientales, sociales y económicos también son determinantes en la presentación de casos y brotes epidémicos, estos últimos son más frecuentes durante desastres naturales como inundaciones y períodos de lluvias intensas. La urbanización descontrolada con deficiente saneamiento ambiental, presencia de basura y proliferación de roedores, constituyen el ambiente ideal para la aparición de casos. Si a lo anterior se suma la presencia de animales de producción y domésticos sin control sanitario, se tiene un escenario propicio para un grave problema de salud pública (Moral, 2014). Así mismo el fenómeno de globalización, los cambios climáticos y las migraciones de animales y personas hacia nuevas zonas propician que la leptospirosis sea considerada en la actualidad como un problema latente para cualquier población (Bharti, *et al*; 2003).

2.2 *Leptospira* spp.

Fue aislada en 1915 en Japón e identificada como el agente causal del síndrome de Weil. El japonés Hideyo Noguchi aisló varias cepas de *Leptospira* en los años 1917 y 1918 en Japón, Bélgica y Estados Unidos y su denominación se basa en sus características y morfología (Inada, *et al.*, 1916).

El agente etiológico de leptospirosis está clasificado taxonómicamente como:

*Dominio Bacteria,

-Reino Eubacteria,

-Phylum Spirochaetes,

-clase Spirochaetes,

-orden Spirochaetales,

-familia Leptospiraceae,

-género *Leptospira*

-especies *L. interrogans*, *L. biflexa*.

El género comprende 22 especies agrupadas en tres categorías: las especies patógenas, intermedias y saprófitas. Actualmente, existen más de 250 serovariedades patógenas (Pereira, *et al*; 2014). El género *Leptospira*, del griego *leptos* (delgado) y del latín *spira* (espiral), son descritas como bacterias móviles parecidas a sacacorchos ó forma de espiral (espiroquetas) y con forma de gancho ó signo de interrogación (interrogans), tienen una longitud de 6-20 μm y un diámetro de 0,1 μm (Faine, *et al*, 1994) y pueden pasar a través de filtros de 0 a 45 μm (Charon y Goldstein, 2002). Para la visualización directa de las leptospiras, se requiere microscopía de campo oscuro o contraste de fase de preparaciones húmedas. En microscopio electrónico se observa un cuerpo celular cilíndrico enrollado helicoidalmente alrededor de un axostilo (0.01 - 0.02 μm de diámetro), que comprende dos filamentos axiales insertados en los extremos del cuerpo y sus extremos libres dirigidos hacia el centro de la célula (Hovind, 1976) (**Figura 1**). Se cree que el filamento axial es un elemento citoesquelético que permite el movimiento, fijándose a la superficie interna de la membrana y contrayéndose periódicamente provocando la rotación de la espiral y el movimiento. (Charon, 2002). Por lo anterior se describen como bacterias móviles, aerobias obligadas (Haake, 2000).

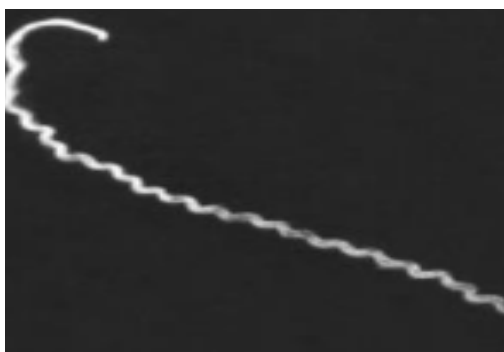


Figura 1. Micrografía de *Leptospira biflexa* serovariedad *andama* al microscopio de barrido 8000x. Macedo, 2005.

Este organismo sobrevive en asociación con animales y el humano, en climas templados, ambientes húmedos y con pH neutro o ligeramente alcalino como la orina. Las leptospiras patógenas no se reproducen fuera del hospedador y son rápidamente inactivadas cuando son expuestas a calor excesivo, radiación ultravioleta, desinfectantes y temperaturas de congelación. Sin embargo, si las condiciones son óptimas, pueden sobrevivir en agua y en suelo húmedo en periodos que van desde semanas a meses (Faine, *et al*, 1999; Adler, 2010).

2.3 Cultivo *in vitro*.

Las características físicas para que *Leptospira* se desarrolle en cultivo *in vitro* son: crecer a una temperatura entre 28-30°C y en un medio con pH entre 7.2 a 7.6, los requerimientos para su crecimiento son: vitaminas, cadenas largas de ácidos grasos y sales de amonio. Por lo anterior el medio líquido de cultivo más usado es EMJH (Ellinghausen, *et al*, 1965) (Faine, *et al*, 1999) además puede contener 1% de albúmina de suero bovino y Tween 80 (fuente de ácidos grasos de cadena larga) (Ellinghausen, 1965; Ellinghausen, *et al*, 1965; Johnson 1967).

Otros medios artificiales óptimos para su cultivo contienen un 10% suero de conejo (Ellis, 1976) ó 1% de albúmina de suero bovino más ácidos grasos de cadena larga con pH 6.8-7.4. Los ácidos grasos de cadena larga (>C15) constituyen la fuente de energía de carbono y como fuente de lípidos celulares debido a que las leptospiras no pueden sintetizarlos. Las leptospiras son catalasa y oxidasa positivas. Los cultivos se deben verificar para detectar la presencia de bacterias contaminantes después de 3-4 días de realizar la siembra y los subcultivos de 7-21 días después, aunque las leptospiras pueden sobrevivir en cultivo

líquido sin modificar sus constantes físicas durante meses o hasta años (Faine,1999; VP/OPS/OMS, 2008). Su crecimiento es relativamente lento con un tiempo de duplicación celular de 6 a 8 horas. Los medios líquidos se consideran esenciales para el aislamiento de leptospiras y para cultivos que van a ser usados como antígenos en pruebas de aglutinación. El piruvato ayuda al crecimiento de leptospiras de difícil desarrollo. Las leptospiras no usan fuentes externas de bases de pirimidina para incorporarlas dentro de su ADN o ARN por este motivo, son resistentes a la actividad antibacteriana del 5-fluoracil análogo de la pirimidina. En consecuencia, este compuesto es usado en medios selectivos para aislar las leptospiras a partir de fuentes contaminadas (VP/OPS/OMS, 2008). Los medios se hacen selectivos mediante la adición de varios antibióticos, siendo los más comunes el 5-fluorouracilo y el sulfato de neomicina, aunque se han utilizado la polimixina B, la rifampicina y la vancomicina. (Ellis, 1976).

El desarrollo de las leptospiras en medio líquido se evidencia por la turbidez, ya que algunas veces se forma una apariencia granular en el fondo de los tubos en los cuales están creciendo; ambos pueden verse a simple vista pero debe confirmarse por la observación en el microscopio (VP/OPS/OMS, 2008).

La apariencia y motilidad de las leptospiras varía con la naturaleza del medio en el que se cultivan. Se consideran tres tipos de movimiento: rotación alrededor de un eje central, movimiento progresivo en la dirección del extremo recto y movimiento circular. En los medios semi-sólidos, el movimiento es mediante flexión. Las leptospiras recién aisladas se observan más cortas en el cultivo inicial con una motilidad helicoidal (Ellis, 1983).

2.4 Clasificación serológica de *Leptospira spp.*

Esta clasificación se basa en diferencias serológicas en su lipopolisacárido (LPS), siendo la serovariedad el taxón básico (Carmona, et al, 2011). El genoma leptospiral consta de dos cromosomas circulares (Boursaux, 1998) y toda su secuencia fue restablecida recientemente (Ren, 2003). El genoma es grande en comparación con los genomas de otras espiroquetas como *Treponema spp* y *Borrelia spp* (Fraser, 1997; Fraser, 1998), lo que indica la capacidad de *Leptospira spp* para vivir en diversos entornos: hospederos principales y en el medio ambiente de manera libre. Se sabe poco sobre el intercambio genético entre leptospiras aunque se ha sugerido una transferencia lateral. Se continúan desarrollando herramientas para la manipulación genética de leptospiras para estudios de patogénesis, factores de virulencia y estudios biológicos celulares básicos del organismo (Saint, 2000).

La clasificación más antigua en la que se utilizan antisueros para establecer relación antigénica entre aislamientos, así la unidad sistemática básica en la clasificación serológica, se encuentra representada por una cepa de referencia (Dikken, 1978). En la literatura, las serovariedades a veces se denominan serotipos, pero el término serovariedad se utilizará a lo largo de este trabajo siguiendo nomenclatura serológica actualmente recomendada (Ahmed, 2012). Para la clasificación genética las serovariedades que están relacionadas antigénicamente se ordenan en serogrupos. Por otro lado las serovariedades y los serogrupos no son indicativos de la relación taxonómica entre cepas ya que una serovariedad (definida por anticuerpos dirigidos contra su antígeno lipopolisacárido) puede pertenecer a más de una especie y miembros del mismo grupo genético no pertenecen necesariamente al mismo serogrupo (Dikken, 1978). Así muchas serovariedades son representadas por una sola cepa de referencia y a medida que se estudian más cepas, es probable que aumente el número de especies (Levett, 2001).

El género está dividido en 22 especies, el 70% están relacionadas con el ADN y contienen como máximo 5% de bases no emparejadas (divergencia). Estas especies se clasifican serológicamente y por patogenicidad en 3 grupos: las cepas leptospirales patógenas (conocidas o sospechosas) agrupadas dentro de la especie "interrogans" más tarde, *Leptospira interrogans sensu lato* (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii* y *L. pomona*, *L. canicola*, *L. tarassovi*, *L. bratislava*, *L. hardjo*, *L. grippityphosa*, *L. pyrogenes*, etc.); las cepas saprófitas agrupadas en la especie "biflexa" posteriormente, *Leptospira biflexa sensu lato* (*L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae* y *L. idonii*) y las cepas denominadas intermedias (*L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* y *L. licerasiae*) (Torres, 2016). Siendo más de 60 serovariedades de *L. biflexa* y 250 serovariedades agrupadas en 24 serogrupos de *L. interrogans*, patógenas descritas (Levett, 2001; Pereira, 2014). La clasificación o caracterización serológica es de importancia diagnóstica y epidemiológica. Las serovariedades que circulan localmente están asociadas con animales que actúan como reservorios de la enfermedad, esta información representa una importante contribución al desarrollo de medidas de prevención y control debido a que se observa en los animales una protección inmunológica ya sea por infección natural o por vacunación, por lo que el diagnóstico debe ser realizado con cepas específicas y requiere se conozcan las serovariedades que circulan localmente. Por lo anterior, la prueba de aglutinación microscópica* por sus siglas en inglés MAT (Microscopy Agglutination Test), funciona de manera óptima cuando se realiza con un cultivo de cepas reflejando serovariedades que circulan localmente.

*Esta prueba se describe ampliamente en la sección 6 en Metodología.

2.5 Zoonosis y transmisión.

La leptospirosis es un fenómeno mundial, pero los datos confiables sobre su incidencia y prevalencia en diferentes áreas son escasos. Debido a las manifestaciones clínicas comunes a muchas enfermedades y que también se presentan en la leptospirosis, hace que la enfermedad sea pasada por alto y sub-notificada en muchas partes del mundo, por lo tanto el diagnóstico debe ser confirmado por pruebas de laboratorio.

La infección en el humano se debe principalmente a la exposición directa o indirecta de orina de animales y personas infectadas, entrando la bacteria a su hospedero a través de mucosas intactas (nariz, boca, ojos, ano y genitales) y heridas en la piel (Hochedez, *et al*; 2011) y por manipulación inadecuada de tejidos de animales infectados y consumo de alimentos o agua con presencia de *Leptospira spp*.

Se sospecha de leptospirosis en pacientes que presenten síntomas como fiebre, dolor de cabeza severo, postración, dolor muscular y conjuntivitis o pacientes presentando signos de meningitis aséptica, síndrome de dificultad respiratoria en adultos y con hemorragia pulmonar, falla renal o ictericia. Se debe obtener información del paciente sobre edad, sexo, ocupación y datos de exposición al agente infeccioso (lugar, fecha, condiciones del contacto con animales o contacto con ambientes contaminados).

Como ya se mencionó, la infección humana resulta del contacto accidental con animales portadores o con un ambiente contaminado con leptospiras. La fuente primaria de diseminación es el animal excretor de leptospiras, de cuyos túbulos renales se excretan las bacterias al medio ambiente a través de la orina del animal. La mayoría de las infecciones por *Leptospira spp* son subclínicas o resultan en una enfermedad muy leve y se recuperan sin complicaciones. Sin embargo, una proporción pequeña desarrolla complicaciones debido a la falla en órganos de diferentes sistemas. En estos pacientes, la presentación clínica depende de los órganos predominantes implicados y la relación de letalidad es aproximadamente del 40% o más. La enfermedad en el hombre se presenta como febril con ictericia, esplenomegalia y nefritis (síndrome conocido como enfermedad de Weil) dando el nombre a la referencia de una forma severa de leptospirosis, aunque en la actualidad es preferible referirse a todas las infecciones por leptospiras como: leptospirosis, independientemente de los síntomas y signos clínicos (WHO, 2003).

Otros síndromes y/o sinonimias relacionados a los nombres por los que es identificada son: enfermedad febril aguda con dolor muscular severo, enfermedad febril con hemorragias pulmonares en forma de hemoptisis, ictericia con hemorragias pulmonares, ictericia con hematuria, meningitis con hemorragias incluyendo hemorragia subconjuntival ó enfermedad febril con arritmias cardiacas con o sin hemorragias son algunos de los síndromes. Debido a las manifestaciones ó signos clínicos no característicos de la leptospirosis, a menudo se diagnostica y/o reporta erróneamente.

Una comprensión amplia de las características eco-epidemiológicas y culturales de una comunidad que se enfrenta al problema de la leptospirosis es un requisito previo esencial para desarrollar una medida de control eficaz y aceptable. Aunque los principios básicos de la prevención, como la reducción de las fuentes de infección, el saneamiento ambiental, las prácticas laborales y personales más higiénicas, son parecidas en todas partes, no existe un método de control universal aplicable a todos los ámbitos epidemiológicos (Vijayachari, 2008).

Todas las especies patógenas de *Leptospira* lesionan la pared de vasos sanguíneos dando lugar a vasculitis con salida de elementos celulares y otros elementos intravasculares, incluyendo eritrocitos. La vasculitis es la responsable de las manifestaciones más importantes de la enfermedad. Las leptospiras afectan principalmente en riñones e hígado, pero pueden causar lesión en cualquier órgano.

Las propiedades patógenas que podrían explicar las diferencias entre las infecciones leves, autolimitadas y las infecciones más severas en el ser humano son las siguientes: la adhesión a las superficies celulares y la toxicidad celular. Cuando se forman anticuerpos las leptospiras se eliminan de todos los órganos del hospedador excepto del ojo, los túbulos proximales renales y probablemente del cerebro, donde pueden persistir de semanas hasta meses. La persistencia de las leptospiras en el humor acuoso da lugar a uveítis crónica o recidivante. La respuesta inmunitaria generalizada ayuda a eliminar el microorganismo, pero también puede ocasionar una reacción inflamatoria sintomática. El incremento del título de anticuerpos coincide con la aparición de meningitis; esta relación sugiere un posible mecanismo inmunitario (Harrison, 2015). La respuesta inmune humoral de los seres humanos está dirigida contra los epítopes de la cadena lateral del LPS de la envoltura externa; los antígenos de LPS desencadenan la producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG los cuales se unen de una manera específica con los epítopes, o reaccionan de manera cruzada con la serovariedad (es) causando infección. Después de la opsonización y la fagocitosis, las espiroquetas se eliminan de la circulación por el sistema reticuloendotelial; la rapidez de la depuración de las leptospiras tiene importancia pronóstica (Sánchez, 2011). Detección de leptospira patógena en orina de pacientes crónicos y perros mediante PCR en el valle del Cauca (Campos, 2014).

Para el diagnóstico diferencial se debe distinguir de otras enfermedades febriles que conllevan cefalalgia y mialgias como el paludismo, la fiebre entérica, la hepatitis vírica, el dengue, las infecciones por Hantavirus y las enfermedades causadas por rickettsias.

Existe controversia sobre la eficacia del tratamiento antimicrobiano en la leptospirosis leve y febril, no obstante el tratamiento está indicado en las formas más graves. En la leptospirosis grave se recomienda la

administración de bencilpenicilina, amoxicilina, ampicilina o eritromicina por vía intravenosa. En los casos más leves ha de considerarse el tratamiento con tetraciclina, doxiciclina, ampicilina o amoxicilina por vía oral. Los enfermos con leptospirosis grave e insuficiencia renal precisan a veces diálisis. Aquellos con síndrome de Weil requiere transfusiones de sangre entera, de plaquetas o de ambos tipos (Harrison, 2015).

2.6 Reservorios o vectores animales.

Las leptospiras patógenas son susceptibles a factores ambientales como la falta de humedad aunque logran sobrevivir durante largos períodos en agua y suelo húmedo. Dentro de su huésped animal habitan en los túbulos renales siendo expulsadas en la orina al medio ambiente. El ciclo de transmisión de la leptospirosis involucra a los huéspedes de mantenimiento, los hospedadores portadores, hospederos accidentales y el medio ambiente (Waitkins, 1987). *Leptospira* se adaptó a hospedadores reservorios primarios, los cuales comúnmente son animales salvajes. Las mismas especies de *Leptospira* también se presentan en casi cualquier otro hospedador mamífero como hospedadores reservorio incidentales y accidentales, como el humano (García, 2015). Casi todas las especies conocidas de roedores, marsupiales y mamíferos pueden ser portadoras y excretoras de leptospiras (Faine, 1999). En este contexto, las siguientes especies son considerados las más importantes:

1. Mamíferos pequeños: roedores silvestres y peridomésticos (ratas, ratones, roedores de campo, etc) e insectívoros (musarañas y puercoespines).
2. Animales domésticos (vacas, cerdos, perros, raramente ovejas, cabras, caballos y búfalos).
3. Animales criados en cautiverio para producción de piel (zorro plateado, visón y nutria) son potencialmente fuentes de leptospirosis humana.
4. Los reptiles y anfibios pueden también portar leptospiras.

Como se muestra en la **Tabla 1**, algunas serovariedades de *Leptospira spp* tienen hospederos predilectos, pero una especie animal puede ser hospedera de una o más serovariedades. Algunos de los reservorios u hospederos estudiados comunes son: la rata (*L. icterohemorrhagiae*), el cerdo (*L. pomona*), el ganado bovino (*L. hardjo*), algunos carnívoros (*L. canicola*) y especies silvestres o marinas como el lobo marino (*L. interrogans*) (Serrano, 2012).

Tabla 1. Hospedero-reservorio comunes de serovariedades leptospirales.

Hospedero- reservorio	Serovariedad (es)
armadillo	<i>borgpetersenii</i>
caballo	<i>bratislava</i>
cerdo	<i>pomona, tarassovi, bratislava</i>
ganado bovino	<i>hardjo, pomona,</i>
gato	<i>Canicola, icterohaemorrhagiae</i>
marsupiales	<i>grippotyphosa</i>
mapache	<i>grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, copenhageni</i>
murciélago	<i>cynopteri, wolffi</i>
oveja	<i>hardjo</i>
perro	<i>canícola</i>
ratas	<i>bataviae, copenhageni, icterohaemorrhagiae</i>
ratón	<i>arborea, australis, bim</i>

Modificada de Bharti, 2003, Méndez, 2013 y Ko, 2009.

La vigilancia de animales silvestres y domésticos también se vuelve necesaria para complementar la vigilancia en humanos cuando se están buscando las fuentes de infección, así mismo provee información de la leptospirosis como un problema de salud pública, logrando ser detectada la seropositividad en casos muy leves. La detección de anticuerpos persistentes por la prueba de MAT debe hacerse usando un panel de antígenos que sea representativo de las leptospiras que circulan localmente, así los resultados de la prueba pueden dar una indicación de la prevalencia de la leptospirosis en un área determinada. Si las cepas locales no son totalmente conocidas debe usarse un panel amplio, con cepas representativas de todos los serogrupos conocidos (VP/OPS/OMS 2008).

Aunque generalmente el número de animales infectados sin presentar signos es mayor que aquellos que desarrollan enfermedad clínica, la mortalidad es variable dependiendo de la dosis infectante y la susceptibilidad de las especies infectadas (Shotts, 1981).

Los signos clínicos reportados en animales silvestres durante fase aguda o subaguda de la enfermedad, incluyen: fiebre, vómito, diarrea, anorexia, depresión, hemorragia variable en mucosas, deshidratación,

ictericia y falla renal; mientras durante fase crónica incluyen: aborto, baja producción láctea y muerte fetal (Luna, *et al*, 1996; Fowler, 2001; Fowler, 2003). En mamíferos domésticos se producen cuadros clínicos similares: trastornos oculares, insuficiencia renal y hepática, baja fertilidad, nacimiento de crías débiles y aborto (Storck, *et al*; 2007) (Céspedes, 2002) (**Figura 2**).

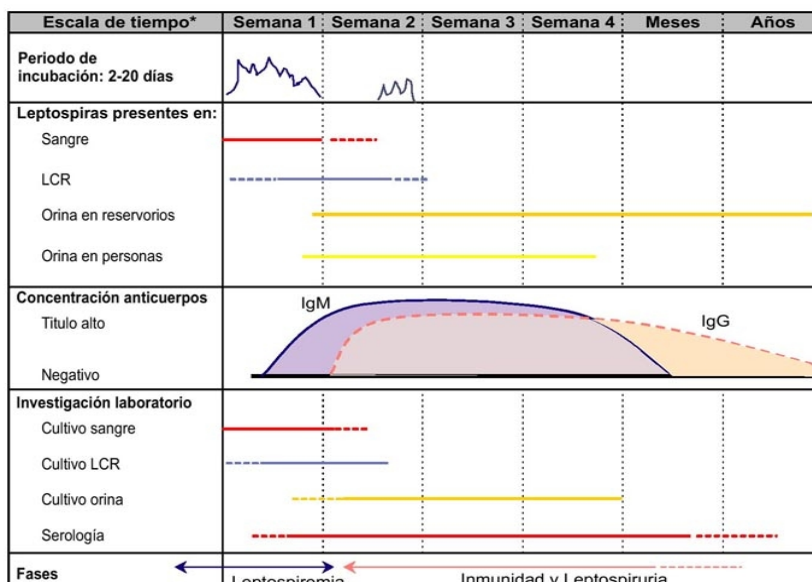


Figura 2. Leptospirosis, naturaleza bifásica e investigación dentro de sus diferentes estados de enfermedad, desde inicio de signología (Levett, 2001).

2.6.1 Patogenia.

En la patogénesis *Leptospira* al entrar al organismo se difunde rápidamente y en 48 horas se localiza en humores y tejidos de órganos, en especial: riñón, hígado, corazón y músculo esquelético (fase leptospiremia de la enfermedad). *Leptospira* es resistente a la actividad fagocitaria de polimorfonucleares y macrófagos, por lo cual no es destruida. Entre los días 5 y 7 después de la infección, los anticuerpos específicos generados favorecen la opsonización del microorganismo que pasa de sangre a túbulos renales donde permanece períodos variables de tiempo (semanas o hasta meses) y es excreta en la orina (fase inmune o leptospiruria). **La respuesta inmune por lo tanto, es la formación de inmunocomplejos, liberación de citoquinas y vasculitis autoinmune.** Los signos en pulmón, corazón, riñón e hígado aparecen en esta fase. Los animales que se recuperan de la fase aguda pueden desarrollar un estado de portador (asintomáticos) (Céspedes, 2005). Los resultados de investigaciones clínicas realizadas sugieren

que la gravedad de la leptospirosis pueda relacionarse con la intensidad de la respuesta inmune.

Los factores de virulencia más importantes de *Leptospira* son:

1. producción de toxinas con acción citotóxica directa en tejidos y órganos.
2. adherencia: en la cual las leptospiras virulentas se adhieren al epitelio renal de células y su adhesión es aumentada por concentraciones aglutinantes de anticuerpos homólogos.
3. proteínas de superficie: la membrana externa de las leptospiras contiene LPS y varias lipoproteínas o proteínas de la membrana externa (outer membrane proteins OMPs), el LPS desencadena reacciones inmunológicas importantes y es responsable de la especificidad del serovar. Se ha demostrado una relación inversa entre la expresión de OMPs transmembrana y la virulencia
4. mecanismos inmunes, el segundo estadio de leptospirosis aguda está relacionado con una fase inmune, en la cual la desaparición de los microorganismos del torrente sanguíneo coincide con la aparición de los anticuerpos. Esta reacción inmune en la enfermedad ha sido propuesta como un factor que influencia la severidad de los síntomas (Sánchez, 2011).

2.7 Diagnóstico.

Tanto en humanos como en animales el diagnóstico puede ser confirmado por aislamiento y cultivo de la bacteria, por la amplificación génica (PCR) durante la primera semana después de la aparición de fiebre alta o por serología (detección de anticuerpos) a partir de la segunda semana de la enfermedad (Institute Pasteur, 2013).

El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en la prueba de MAT, la cual de acuerdo a su fundamento detecta anticuerpos séricos contra la bacteria. La serovariedad puede ser identificada en muestras humanas y animales por medio de esta prueba. (Schneider, *et al*; 2012). En Sudamérica en 2000-2002, el diagnóstico de la enfermedad se basó en el manejo clínico y la confirmación de laboratorio por medio de la prueba de MAT. En 2008 y 2009 la vigilancia activa se puso en marcha para detectar casos utilizando MAT y ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) la cual se realiza como prueba rápida a nivel local, mejorando la detección temprana y el manejo de brotes a nivel de atención primario. Las muestras sospechosas a leptospirosis deben ser enviadas al laboratorio para confirmar el diagnóstico utilizando MAT (WHO, 2003). La prueba de ELISA IgM utilizada para diagnosticar leptospirosis en

muestras humanas principalmente, tiene una sensibilidad del 100% y un 99,6% de especificidad en comparación con MAT. Los anticuerpos (género específico, serovariedad específicos y serogrupo específicos) reaccionan con antígenos y las pruebas serológicas ponen en contacto el suero del paciente con estos (VP/OPS/OMS 2008). La prueba de MAT representa una especificidad de serovariedad superior a las demás técnicas (incluyendo ELISA) y representa la “prueba de oro” en el diagnóstico de la leptospirosis de acuerdo a la OMS (Ahmed, 2012; WHO, 2003). En algunas pruebas el antígeno consiste en leptospiras vivas (más comúnmente utilizadas) mientras que en otras se utilizan extractos de leptospiras (menos común) como antígenos (VP/OPS/OMS 2008). Para lo anterior se deben mantener cultivos vivos de todas las serovariedades requeridas para su uso como antígenos. La gama de antígenos utilizados debe incluir serovariedades representativas de todos los serogrupos y todas las serovariedades localmente comunes (Levett, 2001). Un inconveniente de la prueba es que los anticuerpos anti-*Leptospira* sólo se hacen detectables en la fase aguda tardía de la enfermedad. En contraste, la mayoría de los métodos de detección molecular pueden aplicarse en la fase aguda temprana de la enfermedad (Ahmed, 2012) pero sin la especificidad dada por MAT.

Los títulos de anticuerpos en muestras locales, son a menudo más altos que los títulos de las cepas de serovariedades del mismo serogrupo usadas en la misma prueba (Levett, 2001).

Otro método de diagnóstico para la enfermedad conocido aunque poco sensible y altamente inespecífico es la observación en campo oscuro, esta prueba es usada como complementaria a otros diagnósticos usados (Andre, 2006). Actualmente además de la prueba de ELISA, se usan diversas pruebas inmunológicas alternativas para el diagnóstico, como la inhibición de la aglutinación (IHA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y otras como la inoculación de animales de laboratorio, histopatología con tinciones diversas y la detección de ADN de la bacteria a partir de muestras clínicas por la prueba de PCR (Delgado, 2007).

2.8 Interpretación de MAT.

Para interpretar esta prueba se debe saber que: el título, título positivo o título final es la mayor dilución de suero a la que se produce la aglutinación al 50% esto se determina por la presencia de aproximadamente 50% de leptospiras libres sin aglutinar en comparación con la suspensión control. El título de anticuerpos detectado en suero dependerá de las concentraciones relativas y la fuerza de las reacciones entre los anticuerpos y los antígenos (Levett, 2001).

La prueba de MAT se lee mediante microscopía de campo oscuro, por lo que se requiere un conocimiento

previo considerable debido a la variación del observador, incluso dentro del laboratorio. MAT ha tenido modificaciones diversas en su metodología con anterioridad las cuales han conducido al método actual de la prueba y a pesar de haberse descrito manuales detallados de ésta, sigue considerándose compleja para controlar, realizar e interpretar. Cuando se manejan muestras de fase aguda, interpretación puede resultar complicada debido al alto grado de reacción cruzada que se produce entre los diferentes serogrupos, lo cual es en cierta medida predecible y los pacientes a menudo tienen títulos similares a todas las serovariedades de un serogrupo individual (Levett, 2001). Otro factor de complejidad para la realización de MAT es el cultivo de la bacteria en condiciones de laboratorio (Bharadwaj, 2004), debido al uso de antígenos vivos principalmente y factores como la edad y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación, por lo cual la prueba de MAT no puede ser estandarizada (Borg, 1949; Carbrey, 1960). MAT puede ser positiva alrededor del décimo día después de la aparición de los signos e inicialmente un suero puede reaccionar con muchos de los serogrupos antigénicos, como ya se mencionó anteriormente. Eventualmente durante un período –que pueden ser varios meses- los anticuerpos para un serogrupo pueden predominar lo que resulta indicativo de la identidad del serogrupo infectante.

2.9 Zarigüeya (*Didelphis marsupialis*).

Los didelfimorfos (*Didelphimorphia*), son marsupiales cuya distribución geográfica va desde el sureste de Canadá (Clemens, 1968) hasta América del Sur: Norte de Argentina y Sureste de Brasil y en casi todo el continente de Australia, encontrándose hasta los 4,000 metros de altitud. (Emmons; 1999). Incluye 92 especies vivas, todas en la familia *Didelphidae*, y muchas más ya extintas. La zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) es un marsupial de talla mediana, de cuerpo robusto con patas cortas, el dedo pulgar de los miembros posteriores es oponible, con un hocico largo y puntiagudo y orejas redondas, su cola es larga, desnuda y prensil, de color negro en la base y blanco en la punta; las hembras presentan un marsupio bien desarrollado el cual se abre en la parte posterior. Su pelaje es muy denso y su color presenta todas las tonalidades intermedias entre el blanco y el negro (Krause, 2004) (**Figura 3**).

En México se distribuyen 8 especies de marsupiales, dentro del orden *Didelphimorphia*, en 7 géneros (*Marmosa*, *Tlacuatzin*, *Caluromys*, *Chironectes*, *Didelphis*, *Metachirus* y *Philander*) (Medina, *et al*; 2012). De ellos, el género *Didelphis* es uno de los más ampliamente distribuidos (Sunquist *et al*; 1987), con 2 especies: *D. virginiana* y *D. marsupialis* (Ringier, 1961; Gardner, 1973; Sunquist, *et al*; 1987).



Figura 3. *Zarigüeya* en su hábitat natural al Sur de la República Mexicana. CONABIO, 2017.

Esta especie es considerada generalista (Cabello, 2006), oportunistas y exitosas, capaz de habitar distintos ambientes, incluso con incidencia de perturbaciones antropogénicas (Sunquist *et al.*, 1987; Adler *et al.*; 1997). Son animales capaces de desplazarse a grandes distancias en poco tiempo y pueden cambiar de hábitos alimenticios con relativa facilidad, lo que probablemente ha ayudado a que la especie ocupe grandes áreas en su distribución geográfica (Ringier, 1961; Gardner, 1973; Sunquist *et al.*; 1987), por lo que se encuentra presente en una gran variedad de hábitats desde el matorral xerófilo hasta el bosque tropical perennifolio y a elevaciones que van desde el nivel del mar en la costa hasta más de 3,000 m en las montañas del centro de México. Se refugia en cavidades de rocas, oquedades de árboles, debajo de arbustos secos y en madrigueras, además tiene una notable agilidad para desplazarse en las ramas, contrastando con la torpeza y lentitud que muestra en el suelo, por ende, rara vez abandona el medio arbóreo.

Es una especie omnívora que consume desde frutos, raíces, vegetales, invertebrados (larvas, insectos, gusanos), hasta pequeños mamíferos (huevos, aves, etc). Los patrones de distribución, hábitos alimenticios, alta capacidad de reproducción y resistencia o flexibilidad a perturbaciones antropogénicas de *D. marsupialis* y *D. virginiana* permiten suponer son especies con poblaciones relativamente grandes. En México se conocen aspectos generales de su taxonomía, comportamiento y hábitos alimenticios y relaciones filogenéticas (Medina, *et al.*, 2012), mientras en otros países se han estudiado aspectos poblacionales (Adler *et al.*; 1997; Cabello, 2006), influencia del paisaje y el efecto de variables microclimáticas en su supervivencia, así como los diferentes nombres como se les conoce de acuerdo al país donde se encuentra la especie *Didelphis* (**Tabla 2**).

Tabla 2. Sinonimias o nombres comunes de nombres de *Didelphis marsupialis* de acuerdo al país donde se encuentra la especie.

PAÍS	Nombre común	PAÍS	Nombre común
El salvador:	Tacuazines	México:	Tlacuaches o tacuaches
Guatemala:	Tacuazines	Perú:	Mucas o canchalucos
Ecuador:	Guanchacas	Colombia:	Faras, chuchas, runchos o raposas
Honduras:	Guasalos	Venezuela:	Rabipelados, faros o "zorros"
Bolivia:	Carachupas	Nicaragua:	Zorros de cola pelada
Uruguay, Paraguay:	Zorros	Argentina:	Zorros o comadrejas overas

Modificada de Mendoza, 2004.

Existen algunas características diferenciales de acuerdo a la edad y por dimorfismo sexual aunque no es precisamente evidente, por ejemplo, en las hembras juveniles las mamas son pequeñas, planas y sin pigmentación, mientras que en las hembras adultas, gestantes y paridas, las mamas están permanentemente alargadas y a menudo pigmentadas; mientras en los machos juveniles y adultos, los testículos son grandes y colgantes (escrotales); el pelaje de los juveniles es generalmente más lanoso, de color más grisáceo y más opaco que el de los adultos. Su periodo de gestación es corto, y tiene una duración entre 8 y 24 días. Todos los marsupiales nacen en un estado de desarrollo embrionario incompleto y es precisamente cuando comienza la organogénesis, durante la cual los ventrículos del corazón aún permanecen conectados, los pulmones son simples bolsas vascularizadas sin alveolos, y los ojos y oídos aún están cerrados (Muñoz, 2003). Pueden tener 2 camadas por año hasta con 13 crías por camada.

Las zarigüeyas suelen ser reservorio silvestre o sinantrópico de diferentes agentes etiológicos como Trypanosomiasis, zoonosis que ocasiona en el hombre la enfermedad de Chagas (Pacheco, 2013). En Perú se ha identificado como reservorios potenciales de *Leptospira* (Bunnell, et al, 2000).

3. Justificación.

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica y en México es poca la información que se ha generado en los últimos diez años. Así mismo, se desconocen otros reservorios comunes los cuales pueden ser un factor de riesgo como contagio para los animales del zoológico. Este trabajo permitirá obtener

información sobre la especie zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) la cual habita en el bosque perimetral de un zoológico de la Ciudad de México y la seroprevalencia de *Leptospira spp.* a través de una prueba de laboratorio altamente sensible y confiable. Se destaca, por lo tanto, la importancia que implica la presencia de la zarigüeya en el perímetro ó al interior del zoológico, debido a que existe una alta probabilidad de interacción o exposición directa e indirecta con la población animal que albergan los zoológicos (Céspedes, 2002). Así mismo se busca determinar los factores de riesgo que implica dicha interacción con la finalidad de minimizar posibles contagios interespecie.

4. Hipótesis.

Si existen las condiciones ambientales como humedad, temperatura, pH y presencia de hospederos animales con predisposición y exposición a la bacteria dentro del perímetro del zoológico, entonces se espera encontrar títulos altos correspondientes a la presencia de *Leptospira* en las zarigüeyas.

5. Objetivo general.

Determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en suero de zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) en un zoológico de la Ciudad de México.

5.1 Objetivos específicos.

- a) Detectar por medio de la prueba de Microaglutinación (MAT) la presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sueros de animales previamente capturados al interior y en perímetro del zoológico.
- b) Señalar los posibles factores de riesgo asociados a la transmisión de la enfermedad, a través de las condiciones medioambientales conocidas y el comportamiento de la zarigüeya.
- c) Tener una base de datos actualizada a partir de los resultados obtenidos, respecto a la seroprevalencia de *Leptospira spp* existente en la población de zarigüeyas presentes en el perímetro del zoológico.

6. Metodología.

La prueba para la detección de anticuerpos contra *Leptospira* fue la Aglutinación Microscópica, la cual utiliza como fundamento la aglutinación de leptospiras en presencia de anticuerpos específicos. La reacción se observa a través de un microscopio de campo oscuro.

6.1 Material necesario para MAT (Figura 4).

- Guantes de látex.
- Canaletas de plástico.
- Muestras problema.
- Cepas de *Leptospira* (9 serovariedades locales).
- Placa de microtitulación de plástico con 96 pocillos, fondo en V, fondo plano o fondo curvo.
- Cubierta o tapa para placa de microtitulación (opcional).
- Puntas estériles para micropipetas.
- Asa bacteriológica.
- Micropipetas calibradas: de 1-10 µl, de 10-100 µl, de 20-200 µl y 100-1000 µl (opcional: pipetas multicanal de 50 µl).
- Mechero de Bunsen.

6.1.2 Equipo.

- Estufa de incubación 28-30° C.
- Microscopio de campo oscuro.

6.1.3 Reactivos.

- Agua destilada
- Sales de fosfato
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X, véase receta en Anexos) pH 7.2 .
- Base en polvo para el medio de *Leptospira* EMJH *Difco* TM.
- Etanol al 96%.

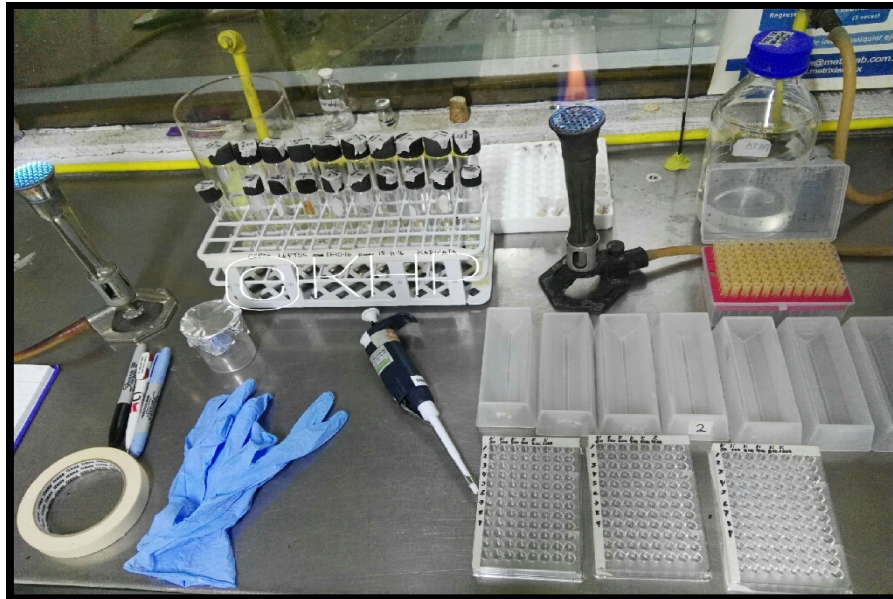


Figura 4. Materiales usados para realizar MAT dentro del laboratorio de Bacteriología del INIFAP. (Hernández Pascacio, 2016).

6.2 Obtención de muestras.

Para este estudio, se tomaron en cuenta muestras de suero de zarigüeya obtenidas previamente al estudio y que se encontraban congeladas en el banco de sueros del zoológico**. Para llevar a cabo el estudio se usó la técnica de MAT, siendo el número de sueros a trabajar 40 muestras como mínimo, de acuerdo a un muestreo de conveniencia y en coordinación con fechas de entrega de muestras, establecidos por el zoológico. Cabe destacar que los animales de los que se obtuvieron los sueros obtenidos varían en sexo, edad, condición fisiológica y fecha de toma de muestra y se tomaron los datos proporcionados por el zoológico para la identificación de los mismos.

Después de obtener los sueros, cada muestra fue debidamente identificada y de acuerdo al proceso de “Toma y envío de muestras” (Ortega *et al*; 2010) se trasladaron al Laboratorio de Diagnóstico del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, INIFAP en Palo Alto donde se procesaron las muestras. Una vez en el Laboratorio, las muestras a procesar se dejaron a temperatura ambiente hasta que se descongelaron para su posterior análisis (**Figura 5**).

**En este trabajo por cuestiones de confidencialidad y convenio del el zoológico con el que se trabajó y de donde se obtuvieron las muestras, no se menciona el nombre del mismo.



Figura 5. Identificación de muestras obtenidas del banco de sueros del zoológico (Hernández Pascacio, 2016).

6.3 Cepario.

Para el mantenimiento de las cepas se colocaron 5 mL de cada serovariedad en tubos de vidrio con tapa roscada, además de 8 mL de medio preparado líquido EMJH (**Figura 6a**) más 0.5 ml de enriquecimiento EMJH para *Leptospira* Difco™ (**Figura 6c**) y se colocaron dentro de una estufa de incubación con temperatura de 28-30°C para su crecimiento (7 días) y mantenimiento (de semanas hasta años) (VP/OPS/OMS, 2008) (**Figura 6b**). La densidad del cultivo usado como antígeno fue en promedio de $1,5$ a 2×10^8 leptospiras de acuerdo a lo especificado por el Manual de Procedimientos bacteriológico y serológico para el Diagnóstico de leptospirosis (Céspedes, 2005).



Figura 6. Materiales usados para realizar MAT **a:** Medio EMJH en polvo para la elaboración de medio para cultivo de *Leptospira*. **b:** tubos contenedores de cepas leptospirales para ser incubadas en estufa bacteriológica. **c:** Enriquecimiento EMJH Difco™ para el desarrollo de *Leptospira* en medio EMJH. (Hernández Pascacio, 2016).

6.4 Protocolo de inspección de muestras.

Previo a realizar cualquier prueba que requiera el uso de las cepas (**Tabla 3**) se realizó una inspección de las mismas de la siguiente forma:

- Se abre el tubo en un medio estéril y se toma una gota de medio EMJH con un asa bacteriológica.
- La gota se observa en el microscopio óptico con fondo oscuro y se confirma las bacterias se encuentren en estado óptimo y el medio no presente ningún contaminante (**Figura 7**).
- En caso contrario se puede optar por usar la cepa a criterio del laboratorista ó realizar una nueva siembra de la bacteria para obtener un cultivo más puro.



Figura 7. Leptospira hardjo observada en microscopio óptico a 100-200X. (Hernández Pascacio, 2016)

Tabla 3. Cepas usadas en este estudio. (Hernández Pascacio, 2017).

ID de cepa	Especie	Serovariedad representativa	Serogrupo
1	L. interrogans	Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae
2	L. interrogans	pyrogenes	Pyrogenes
3	L. interrogans	grippotyphosa	Grippotyphosa
4	L. interrogans	Canicola	Canicola
5	L. interrogans	pomona	Pomona
6	L. borgpetersenii	hardjo	Sejroe
7	L. interrogans	wolfi	3701
8	L. noguchi	tarasovi	Tarassovi
9	L. interrogans	bratislava	Bratislava

Modificada de Levett. 2001.

6.5 Descripción de la placa de MAT.

La placa que se usa comúnmente para realizar MAT es de fondo curvo con 96 pozos, tomando como referencia un plano con eje “X” (filas) y eje “Y” (columnas) se colocan dos tiras de cinta adherente en la orilla de cada placa y se escribe sobre la tira a la altura de cada pozo en el eje X las diferentes diluciones a usar iniciando de izquierda a derecha de la siguiente forma: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600. Se debe especificar que las diluciones comienzan a partir del pozo 2 de toda la columna. El eje Y se identificará con el número de cepa a usar iniciando de arriba hacia abajo del 1 al 9 respectivamente, esta identificación si comienza a partir del primer pozo que se use (**Figura 8**).

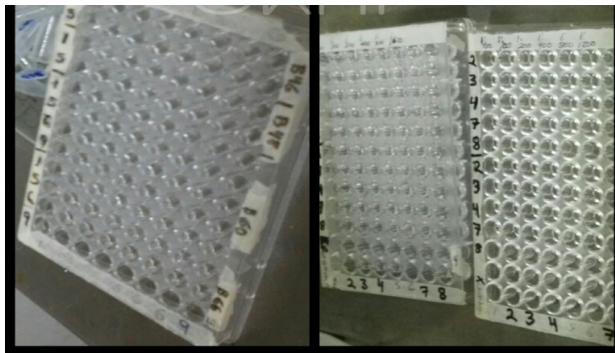


Figura 8. Placas de plástico usadas en MAT. (Hernández Pascacio, 2016).

6.6 Desarrollo de la técnica.

6.6.1 Dilución de muestras para MAT.

Para realizar el diagnóstico de leptospirosis se utilizó la prueba de Microaglutinación en Placa, como prueba de referencia recomendada por la OMS para la leptospirosis. Se prepararon diluciones previas de todos los pozos con PBS 1X para obtener 6 diluciones del suero (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600) (ver **Tabla 4**) contra 9 serovariedades de *Leptospira* (*icterohemorrhagiae*, *pyrogenes*, *grippothyposa*, *canicola*, *wolffi*, *hardjo*, *tarassovi*, *bratislava*, *pomona*) (ver **Figura 6b**) con las cuales cuenta el Laboratorio de Diagnóstico en el INIFAP. Las cepas mencionadas fueron donadas por la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y fueron cultivadas, replicadas y evaluadas previamente a la realización de la prueba por el laboratorista a cargo en el INIFAP. Las serovariedades utilizadas son detalladas en el **Tabla 3**.

1. Llenar todos los pocillos a usar de una placa de microtitulación con 50 μ l de PBS 1X, pH 7.2 (Goris, 2014).
2. Añadir 50 μ l de la dilución previa del suero problema en todos los pozos de la columna 1.
3. Con micropipeta sencilla o multicanal, marcando 50 μ l como medida, mezclar el contenido de los pozos de la columna 1 pipeteando 50 μ l arriba y abajo varias veces. A continuación, tomar y transferir 50 μ l a los pozos de la columna 2.
4. Repetir el paso 3 con las siguientes columnas hasta terminar las diluciones marcadas en la cinta adherente, los 50 μ l restantes de la última dilución se desechan.
5. Una vez realizadas las diluciones se añaden 50 μ l de la cepa marcada de *Leptospira* a usar, en toda la fila correspondiente.
6. La dilución final (incluyendo la cepa de *Leptospira* añadida) del suero en la columna 2 es ahora 1:100, la columna 3 es 1:200, etc.
7. Los pozos de la columna 1 sirven como control comparativo sin aglutinación y sirven para comprobar la auto-aglutinación de las leptospiras y esterilidad del PBS.
8. Una vez agregadas todas las cepas a utilizar, se debe cubrir la placa con una tapa para placas u otra placa que embone de la mejor manera y después envolver la placa con un trapo húmedo, para evitar que la muestra se evapore al meter la placa a la estufa de incubación.
9. Incubar de 45 minutos a 60 minutos a la temperatura constante de 30° C. Se han documentado tiempos de incubación de 30 minutos hasta 4 horas. Sin embargo, para resultados óptimos, es importante utilizar un tiempo de incubación fijo. Como alternativa, podría considerarse la incubación durante la noche a temperatura ambiente (Goris, 2014).
10. Transcurrido el tiempo de incubación se sacó la placa de la estufa para observar al microscopio, para ello, se requiere un portaobjetos limpio (el cual se lavó con etanol al 96%), una asa bacteriológica y un mechero de Bunsen para poder esterilizar el asa bacteriológica constantemente.
11. La observación al microscopio se realizó de la siguiente forma: se esteriliza el asa con el mechero de Bunsen de la punta hacia la base, después se tomó una gota del primer pozo de dilución en la placa y en el microscopio con un objetivo 100x-200X se inspeccionó la gota, iniciando del borde hacia el centro de la misma.
12. Lo anterior se realiza en segundos, ya que conforme transcurre el tiempo y uso del microscopio, éste tiende a calentarse y a provocar que la gota se evapore (**Figura 9**) con mayor rapidez conforme se incrementa el tiempo.
13. El título será la dilución más alta en la que $\geq 50\%$ de las leptospiras todavía están aglutinadas es decir, $<50\%$ de las leptospiras se mueven libremente- en comparación con la suspensión del

pozo control de la primera columna de cada fila (la cual contiene sólo el cultivo de *Leptospira* diluido 1:2 en PBS sin suero). El título se expresa como la dilución final que incluye el volumen del cultivo de *Leptospira* añadido. Se debe estimar la claridad del fondo y el porcentaje de leptospiras libres (no aglutinadas) (Goris, 2014).

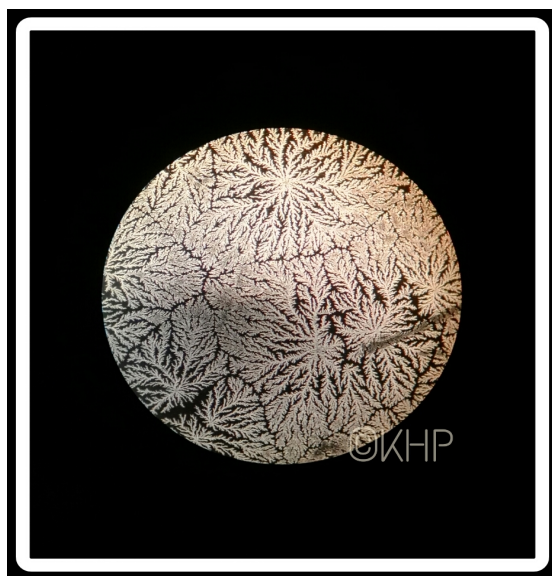


Figura 9. Gota seca de *Leptospira hardjo* observada en microscopio óptico a 100-200X. (Hernández Pascacio, 2016)

Tabla 4. Ejemplo para realizar la microtitulación en placa para prueba de MAT.

	# Muestra	Dilución de muestra	Pozo 2 - 1:2.5	Pozo 3 - 1:5	Pozo 4 - 1:10	Pozo 5 - 1:15	Pozo 6 - 1:20
	Control	Dilución final 1:2.5	1:5	1:10	1:15	1:20	
	1	2	3	4	5	6	
Serovariedad A	1	○	○	○	○	○	○
Serovariedad B	2	○	○	○	○	○	○
Serovariedad C	3	○	○	○	○	○	○
Serovariedad D	4	○	○	○	○	○	○
Serovariedad E	5	○	○	○	○	○	○
Serovariedad F	6	○	○	○	○	○	○
Serovariedad G	7	○	○	○	○	○	○
Serovariedad H	8	○	○	○	○	○	○
Serovariedad I	9	○	○	○	○	○	○

6.7 Interpretación de lectura de MAT.

Estimación de la densidad de la cantidad de cepa agregada, observada. Sólo personal experimentado debe juzgar visualmente la densidad de cepa de *Leptospira* directamente por microscopia de campo oscuro. Una cepa se cultiva correctamente cuando todos los campos inspeccionados están completamente cubiertos con leptospiras bien formadas y no se observan otras bacterias, levaduras u hongos. Esto se indica mediante 4+, y "muestra" similar a la densidad de los pozos de control negativos representados en la **Figura 10**. Esta es la densidad correcta para su uso en MAT:

3+ El 75% del campo del microscopio está cubierto por leptospiras en comparación con 4+.

2+ El 50% del campo del microscopio está cubierto por leptospiras en comparación con 4+.

1+ El 25% del campo del microscopio está cubierto por leptospiras en comparación con 4+.

0 sólo se observan pocas o ninguna leptospiras.

Negativo: Es igual al control y no presenta aglutinación.

Positivo en 1:50: Presenta aglutinación a menos del 50% del campo.

Positivo para titular: Presenta aglutinación en más del 50% del campo (Delgado, 2007).

Los sueros que presenten una aglutinación igual o mayor a 1:100 serán considerados como positivos (Céspedes, 2005).

De acuerdo con el Instituto Pasteur en París, si se obtiene un título de 1/100 en la prueba de MAT con uno o varios antígenos, el umbral del título positivo ha sido alcanzado.

Un punto importante a tomar en cuenta es que no se debe usar el tamaño de aglutinación para determinar el punto final. Los sueros "sucios" muestran partículas que se asemejan a grupos de leptospiras aglutinadas. Se debe tener en cuenta un efecto prozona que podría ocurrir, es decir, la aglutinación se produce a rangos de dilución más altos, pero no es visible a diluciones más bajas. Comprobar siempre realizando diluciones mayores en casos donde las diluciones menores no muestran aglutinación aparente. Utilizar agua destilada y destilada en todas las recetas y pasos.

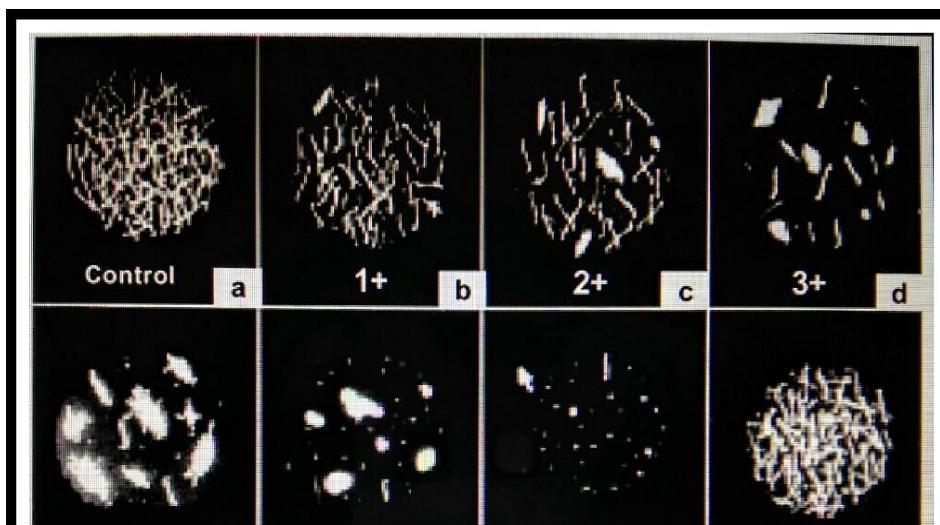


Figura 10. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) **a:** lámina control; **b:** lámina con 25% de aglutinación (zonas con copos de algodón); **c:** lámina con 50% de aglutinación; **d:** lámina con 75% de aglutinación; **e:** lámina con 100% de aglutinación; **f:** lámina con 100% de aglutinación y lisis; **g:** lámina con 100% de lisis; **h:** lámina negativa. Céspedes, 2005.

7. Resultados.

Se procesaron 40 muestras en total, de las cuales 32 sueros se les realizó la prueba de MAT contra las 9 serovariedades presentes en el laboratorio de Diagnóstico; de éstos, 13 sueros los cuales corresponden al 40.62% de las 32 muestras, resultando positivas a *L. hardjo* (Ver **Tabla 5**).

A 8 sueros se les realizó MAT únicamente contra 4 serovariedades (1, 3, 6 y 9) debido a que la cantidad de muestra fue menor a la requerida para completar la prueba con el total de serovariedades presentes en el laboratorio de Diagnóstico; de estos sueros, 2 dieron positivos a *L. hardjo*, correspondiendo al 25% de los 8 sueros procesados. Todas las muestras anteriores se les realizó MAT usando las diluciones 1:50, 1:100, 1:200 1:400 1:800 y 1:1600. Si se toma el total de muestras (40) y el total de sueros positivos a *L. hardjo* el porcentaje corresponde a 37.5% de muestras procesadas.

Del total de los 40 sueros, 6 sueros fueron elegidos al azar para realizar MAT a cada uno usando diluciones más pequeñas, siendo las siguientes: 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20, esto para corroborar que la dilución usada inicialmente estuviera correcta en la especie *Didelphis marsupialis*, la cual de acuerdo con la literatura consultada, se tomó el título 1:100 para la prueba como positivo; por lo cual de estas muestras 4 sueros dieron positivos a *L. hardjo* presentando diferentes títulos en diversas diluciones **Tabla 6**.

Tabla 5. Número total de sueros positivos a las diferentes serovariedades de *Leptospira*.

Positivos 1:100	Cepas usadas	1 Icterohaemorrhagiae	2 Pyogenes	3 Gryppothyposa	4 Canicola	5 Pomona	6 Hardjo	7 Wolffi	8 Tarasovi	9 Bratislava
No. sueros procesados										
40	9	0	0	0	0	0	15	0	0	0

(Hernández Pascacio, 2017).

Tabla 6. Resultados de sueros positivos y negativos en MAT y serovariedades de *Leptospira* a las que fueron desafiados los diferentes sueros para la prueba.

Sueros problema	Cepas de <i>Leptospira</i> usadas para MAT								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 7	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 10	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 11	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 15	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 23	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 24	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 26	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 27	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 35	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 40	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 46	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 55	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 61	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 62	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 63	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 64	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 65	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B 66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B X	-	-	-	-	-	+	-	-	-

(Hernández Pascacio, 2017).

8. Discusión.

La literatura indica que MAT tiene una especificidad de serovariedad insuperable y representa la “prueba de oro” en el diagnóstico serológico correcto de leptospirosis, considerada por la OMS (Ahmed, *et al* 2012; WHO, 2003). Actualmente no hay ninguna prueba disponible que supere a MAT respecto a la especificidad en el diagnóstico, es por ello que en esta tesis se elige MAT como prueba diagnóstica para la presencia de anticuerpos anti-leptospira.

De acuerdo a Dikken, 1978 se pueden detectar anticuerpos anti-leptospiras de cinco a diez días después de la aparición de la enfermedad. Este autor describe que, al analizar una muestra de sangre durante la primera semana de la enfermedad, es importante examinar una segunda muestra después de 2 semanas para verificar la seroconversión o un aumento en el título, debido a que la seroconversión o una elevación ≥ 4 veces en el título, indica una infección activa de la enfermedad en el organismo. En este trabajo solo se determinó la presencia de anticuerpos en un solo muestreo debido a que los animales fueron capturados y liberados nuevamente, por lo tanto no fue posible dar el seguimiento para toma de una segunda muestra.

Fowler, 2003 reporta que la mayoría de los casos reportados en colecciones zoológicas se deben a infecciones de hospederos accidentales que han tenido contacto con animales o ambientes contaminados. Luna *et al*, 1996 en una investigación hecha en el zoológico de Chapultepec en México, se encontraron anticuerpos contra *Leptospira* en 15 de 19 especies muestreadas, con un 52% de positividad de los sueros obtenidos. Este fue el último estudio dado a conocer sobre leptospirosis en un zoológico de la Ciudad de México, con base en el mismo y los datos recolectados en este estudio se puede señalar a la especie *Didelphis marsupialis* como posible hospedador accidental de *Leptospira* serovariedad *hardjo*, aunque los resultados no sean representativos de la población actual en el perímetro del zoológico.

Tomando en cuenta también que en la investigación de Mendoza, 2004, donde se presentó leptospirosis en pecarís, puede considerarse posible que las zarigüeyas al estar en contacto con diversas especies al interior del zoológico, sean también susceptibles a la enfermedad.

La gama de antígenos utilizados debe incluir serovariedades representativas de todos los serogrupos y todas las serovariedades localmente comunes (Levett, 2001). Con base en lo anterior en este estudio se usaron 9 serovariedades de *Leptospira* que se encuentran disponibles en el Laboratorio de Diagnóstico del INIFAP y que son usadas con regularidad debido a la incidencia prevaleciente en la zona.

La serovariedad *L. hardjo* encontrada en los sueros trabajados, podría tener un origen en los herbívoros dentro de la colección del zoológico, ya que al observar el perímetro exterior del mismo no se encuentran especies herbívoras y posibles reservorios de la enfermedad.

En algunas pruebas el antígeno consiste en leptospiras vivas mientras que en otras, se utilizan extractos de leptospiras como antígenos (VP/OPS/OMS, 2008). Debido lo anterior se deben mantener cultivos vivos de todos los serovariedades requeridos para su uso como antígenos. La gama de antígenos utilizados debe incluir serovariedades representativas de todos los serogrupos y todas las serovariedades localmente comunes (Levett, 2001). Por lo que se puede concluir que la serovariedad de *L. hardjo* encontrada en los sueros trabajados, podría tener origen en los herbívoros dentro de la colección del zoológico.

Farace, 2001 menciona que las leptospiras pueden ser encontradas desde 3 a 4 días después de la infección y hasta por 1 a 2 semanas en sangre. El uso de estas pruebas es limitado, debido al corto periodo en el que pueden ser detectables las bacterias presentes en fluidos corporales y la dificultad de conservar las mismas en una muestra obtenida (Alonso, *et al*, 2001; Céspedes, 2005). Por ello se piensa que los resultados en este trabajo, se encontró la serovariedad de *L. hardjo* únicamente en 6 sueros de las 40 muestras trabajadas.

Fowler, en 2003 escribió que en fauna silvestre de vida libre los casos de leptospirosis aguda son esporádicos y generalmente pasan inadvertidos, sin embargo, en algunas poblaciones silvestres ocurren brotes con cierta regularidad.

Los anticuerpos antileptospirales aparecen en la primera semana de la enfermedad, alcanzan los títulos máximos a los 30 días y pueden mantenerse por un periodo prolongado de tiempo. La respuesta primaria de tipo humoral puede evidenciarse mediante pruebas de ELISA IgG, ELISA IgM y MAT (Farace, 2001; Céspedes, 2005). La inmunidad es específica a una serovariedad y surge después de la infección o inmunización (Alonso, *et al*, 2001; Farace, 2001). Analizando lo anterior, las muestras que no dieron positivo a ninguna serovariedad, podría deberse al momento vital en que fueron tomadas las muestras, en el caso en que hayan estado en contacto con cualquier serovariedad de leptospira pero no alcanzarán la primer semana de contacto con la bacteria y su sistema inmune generara anticuerpos detectables con MAT. Las pruebas serovar-específicas detectan anticuerpos aglutinantes a partir de los siete días de iniciada la enfermedad. En estudios iniciales, puede brindar datos acerca de la susceptibilidad de la especie, así como de la adaptación de cada serovariedad a la misma, en función a la titulación de anticuerpos (Muñoz, 2003; Farace, 2001) (en Metodología) (Mendoza, 2004).

De acuerdo a la literatura mencionada en este trabajo, las leptospiras pueden ser encontradas de 3 a 4 días después de la infección y hasta por 1 a 2 semanas en sangre. El uso de estas pruebas es limitado, debido al corto periodo en el que pueden ser detectables las bacterias presentes en fluidos corporales y la dificultad de conservar las mismas en una muestra obtenida (Alonso, *et al*, 2001; Ochoa, *et al*, 2001; Céspedes, 29

2005). Debido a que el muestreo fue realizado aleatoriamente, se piensa que los resultados en este trabajo se encontró la serovariedad de *L. hardjo* únicamente en 15 sueros de las 40 muestras trabajadas.

9. Conclusiones.

- En este grupo de estudio con sueros de la especie *didelphis marsupialis*, solamente se encontró seropositividad de anticuerpos contra *Leptospira* serovariedad *hardjo* en el 37.5% de muestras procesadas.
- Las zarigüeyas no constituyen un factor de riesgo de contagio hacia los animales de la colección en el zoológico dado que se obtuvieron títulos bajos sobre la presencia de la serovariedad *hardjo* y un porcentaje >50% de las muestras trabajadas.
- No se puede establecer un factor de riesgo específico debido a que solo se detectó la serovariedad *hardjo*, la cual tiene como reservorio a hervíboros.
- Con los resultados obtenidos en este trabajo se aporta información sobre la serovariedad *hardjo*, presente en la especie *didelphis marsupialis*.

10. Recomendaciones.

1. Realizar estudios posteriores dando seguimiento a ejemplares muestreados a fin de correlacionar la presencia de anticuerpos en zarigüeyas con problemas de leptospirosis clínica, comprobar la excreción de espiroquetas en la orina, evidenciar fuentes de infección, y determinar la duración de la inmunidad en animales infectados.
2. Como propuesta se sugiere realizar un nuevo estudio en esta especie y en la zona ya mencionada en este trabajo haciendo capturas de nuevos animales para obtener muestras actualizadas de la población y darle seguimiento a los animales muestreados para tener una base de datos completa y continuar al monitoreo de la enfermedad en el perímetro del zoológico.
3. Realizar monitoreos serológicos en ejemplares con historias de abortos y/o con problemas de fertilidad.
4. Referente a la realización de la prueba de MAT, para obtener una mayor especificidad en los resultados, la gama de antígenos utilizados debe incluir serovariedades representativas de todos los serogrupos y todas las serovariedades localmente comunes.

5. De acuerdo a la literatura mencionada en este trabajo, se recomienda ampliamente realizar un nuevo estudio con muestras pareadas, con un intervalo mínimo de 7 a 14 días entre toma de muestra y así poder detectar las bacterias en caso de estar presentes en fluidos corporales.
6. No se recomienda la vacunación en estos animales.

11. Anexo.

*Solución salina tamponada con fosfato (PBS), concentrado de 10X. Para 5 litros:

- NaCl ----- 425 g
- Na₂ HPO₄ 2H₂O ----- 42,8 g
- KH₂ PO₄ ----- 12.7 g

Ajustar el volumen a 5 litros llenando con agua destilada.

Mezclar para disolver las sales.

Dividir alícuotas en botellas de 1 litro.

Almacenar hasta 1 año de temperatura ambiente en un lugar oscuro. La alta concentración de sales evita el crecimiento de microorganismos.

*Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2 . Para 1 litro:

- Solución salina tamponada con fosfato (PBS) ----- 100 ml, 10 \ mu l de concentrado
- Añadir agua destilada ----- 900 m
- Mezclar y ajustar el pH a 7.2 con ----- HCl diluido o NaOH

Dividir en alícuotas en botellas de 100 ml y usar el mismo día.

Alternativamente, el PBS puede autoclavarse.

El PBS esterilizado en autoclave es estable durante 1 año a temperatura ambiente en un lugar oscuro. El PBS necesita autoclave para evitar el crecimiento de leptospiras saprofitas y otros microorganismos, que perturban la lectura de la MAT.

12. Literatura citada.

1. Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Review*. p. 296–326, April. Barbados (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: http://www.leptospirosis.org.nz/Portals/0/Images/Leptospirosis/Levett_2001_review.pdf
2. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* Vol.33 p.557–569 India (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017) Disponible en URL: <http://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/033/04/0557-0569>
3. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray G. 2011. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology* vol.153 p.1-2 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21440384>
4. Institute Pasteur. 2013. *Leptospira interrogans*, the leptospirosis agent. *National Reference Center for leptospirosis by Picardeau, Mathieu.* (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017) Disponible en URL: <https://www.pasteur.fr/en/medical-center/disease-sheets/leptospirosis>
5. Céspedes ZM, Glennly AM. 2002. Manual de procedimientos bacteriológico y serológico para el diagnóstico de la leptospirosis. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, p.53 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1049_INS-NT34.pdf
6. Moral M, 2014. Enfermedades Infecciosas Leptospirosis. Diagnóstico de Leptospirosis. Guía para el equipo de salud. Ministerio de Salud. Argentina (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000489cnt-guia-medica-leptospirosis.pdf>
7. Bharti AR, Nally JE, Ricardi JN, Matthias MA, Díaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3 p.757-771. Perú-USA (en línea) (fecha de acceso 24 de marzo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
8. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. 1916. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J. Exp. Med* vol.23 p.377-402 (en línea para descargar) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867994> .
9. Pereira MM, Bianchi A, Petrakovsky J, Fisun H. 2014. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002-2014). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. (en línea para descargar) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: https://www.researchgate.net/publication/267044547_Animal_Leptospirosis_in_Latin_America_and_the_Caribbean_Countries_Reported_Outbreaks_and_Literature_Review_2002-2014

10. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1994. A brief history of leptospirosis. *Leptospira* and leptospirosis. **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
11. Charon NW, Goldstein SF. 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The *spirochetes*. *Annu Rev Genet* p.47–73 **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL vía red DGB-UNAM: http://ac.els-cdn.com.pbidi.unam.mx:8080/S1473309903008302/1-s2.0-S1473309903008302-main.pdf?_tid=38580678-df60-11e6-8775-0000aab0f6b&acdnat=1484951683_3e7793f0aace9d8747298ded4a192caa
12. Haake DA. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* vol.146:1491–504. **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol.3, December, pag. 757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL vía red DGB-UNAM: http://ac.els-cdn.com.pbidi.unam.mx:8080/S1473309903008302/1-s2.0-S1473309903008302-main.pdf?_tid=38580678-df60-11e6-8775-0000aab0f6b&acdnat=1484951683_3e7793f0aace9d8747298ded4a192caa
13. Macedo AS, 2005. Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar *andamana* cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* vol.22 p.281–289 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=24052200&lang=es&site=ehost-live>.
14. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2a ed. Melbourne: *Medi Sci* (en línea para solicitar formato .pdf) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:8j6I3eml260J:www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/leptobookinfo.rtf+&cd=2&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx&client=firefox-b-a>
15. Adler B, De la Peña MA. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* vol.140 p.287–296 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.academia.edu/25209860/Leptospiraandleptospirosis?auto=download>
16. Ellinghausen HC Jr, McCullough WG. 1965. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* vol.26 p.45–51 **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>

17. Ellinghausen HC, Jr, McCullough WG. 1965. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. *Am J Vet Res* vol.26 p.39–44 **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
18. Johnson RC, Rogers P. 1967. Metabolism of leptospire II. The action of 8-azaguanine. *Can J Microbiol* ; 13: 1621–29. **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
19. Ellis WA, Michno SW. 1976. Bovine leptospirosis: a serological and clinical study. *Vet Rec* vol.99 p.387–91. **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
20. VP/OPS/OMS. 2008. Leptospirosis humana. Guía para el diagnóstico, vigilancia y control Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Rio de Janeiro (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017) Disponible en URL: <http://www.paho.org/dor/images/stories/archivos/leptospirosis/who-guia-lepto-2003-spa.pdf?ua=1>
21. Ellis WA, Hovind HK, Müller S, Birch AA. 1983. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* vol.255 p.323–35 **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
22. Carmona GC, León LL, Castillo SL, Ramírez OJ, Ko A, Luna C, De la Peña MA. 2011. Detección de *Leptospira santarosai* y *Leptospira kirschneri* en bovinos: nuevos aislados con potencial impacto en producción bovina y salud pública. *Vet. Mex.* Vol.42 núm.4 Oct-Dic, México (en línea) (fecha de acceso 26 de agosto del 2016). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922011000400003
23. Boursaux EC, Saint GI, Zuerner R. 1998. *Leptospira* genomics. Electrophoresis. Vol.19 p.589–92. **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
24. Ren SX, Fu G, Jiang XG, et al. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* vol.422 p.888–93. **En:** Bharti AR, et all. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>

25. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, *et al.* 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. vol.390 p.580–86 **En:** Bharti AR, *et al.* 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
26. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, *et al.* 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* vol.281 p.375–88. **En:** Bharti AR, *et al.* 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, vol.3, Diciembre, p.757-771 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bvs.insp.mx/articulos/5/22/082005.pdf>
27. Saint GI, Bourhy P, Ottone C, *et al.* 2000. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *Leptospira biflexa* – *Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* vol.182 p.5700–05 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC94690/>
28. Dikken H, Kmety E. 1978. Serological typing methods of leptospires. *Methods in Microbiology*. Cap. VIII. Editorial ELSEVIER. New York. Vol.11 p.259–307 (en línea) (fecha de acceso 20 de enero del 2017). Disponible en URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951708704938> .
29. Ahmed A, Grobusch MP, Klatser, Hartskeerl RA. 2012. Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. *Journal of Bacteriology and Parasitology* (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <https://www.omicsonline.org/molecular-approaches-in-the-detection-and-characterization-of-leptospira-2155-9597.1000133.php?aid=5777#7> .
30. Torres CM. Hernández BS. Agudelo P. Arroyave E. Zavala J. Puertoa F. 2016. Revisión de la epidemiología de la leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. vol.54 p.620 Yucatán, México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im165k.pdf>
31. Hochedez P, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourthy P, Picardeau M, Quénel P, Cabié A. 2011. Outbreak of leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, vol.84, p.621–626 (en línea) (fecha de acceso 2 de febrero del 2017). Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062459/>
32. World Health Organization. 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control; WHO: Geneva, Switzerland (fecha de acceso 24 de mayo del 2017) Disponible en formato .pdf en URL: <http://www.who.int/zoonoses/resources/Leptospirosis/en/> .
33. Harrison T, Rudy AH, Jiří FW. 2015. Principios de Medicina Interna. Ed 18va. McGraw-Hill Interamericana Editores. USA. cap.171. **En:** Campos CN. 2014. Leptospirosis. *Med. Leg.* Costa Rica, Heredia, vol.31, núm.2, p.112-118. (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200012&lng=en&nrm=iso

34. Sánchez A. 2011. Detección de leptospira patógena en orina de pacientes crónicos y perros mediante PCR en el Valle del Cauca. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Programa Académico de Biología, Colombia (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/3912/4/CB-0441166.pdf> .
35. Campos CN. 2014. Leptospirosis. *Med. Leg.* Costa Rica, Heredia, vol.31, núm.2, p.112-118. (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200012&lng=en&nrm=iso
36. Waitkins SA. 1987. Leptospirosis; in Manson's tropical diseases. Ed.19va. P E C Manson-Bhar and D R Bell. London. **En:** Vijayachari P, et al. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* Vol.33 p.557–569 India (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/033/04/0557-0569>
37. García PJ, Romero ME. 2015. Evaluación y comparación de pruebas de diagnóstico para leptospirosis en caninos remitidos para prácticas de necropsias al laboratorio de patología de la FES Cuautitlán, UNAM. Tesis de licenciatura. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL vía red DGB-UNAM: <http://132.248.9.195/ptd2015/abril/305156383/Index.html>
38. Serrano VM. 2012. Exposición a *Leptospira* sp. patógena del Elefante Marino (*mirounga angustirostris*). Tesis para Maestría. Baja California, México (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/ecologia_molecular/maestria/Tesis%20Mercedes%20Itzel%20Serrano%20De%20la%20Vega.pdf
39. Méndez C, Benavides L, Esquivel A, Aldama A, Torres J, Gavaldón D, et al. 2013. Pesquisa serológica de Leptospira en roedores silvestres, bovinos, equinos y caninos en el noreste de México. *Rev Salud Anim.* Vol.351 p.25-32 **En:** Torres CM, et al, 2016. Revisión de la epidemiología de la leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* Vol.54 p.620 Yucatán, México (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im165k.pdf>
40. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* Vol.7 p.736-747. **En:** Torres CM, et al, 2016. Revisión de la epidemiología de la leptospirosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* Vol.54 p.620 Yucatán, México (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im165k.pdf>
41. Shotts E. 1981. Leptospirosis. **En:** Davis, J, Karstad L, Trainer D. 1972. Infectious diseases of Wild Mammals. The Iowa State University Press. Iowa. E.U.A. Vol.446 p.323-331 **En:** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549>

42. Luna AM, Moles CL, Torres BJ, Gual SF. 1996. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México. *Vet. Méx.* Vol.27 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=208059&indexSearch=ID>
43. Fowler M. 2001. *Biology, medicine and surgery of South American Wild Animals*. Saunders Publishers. EE.UU. p.536 **En:** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549>
44. Fowler, M. 2003. Leptospirosis. En: *Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy 5*. Saunders Publishers. EE.UU. pag. 982. **En:** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549>
45. Storck CH, Postic D, Lamaury I, Pérez JM. 2007. Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Niño Southern Oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol. Infect.* Vol.136 p.1407–1415 (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870739/>
46. Céspedes ZM. 2005. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. (en línea) (fecha de acceso 21 de marzo del 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1726-46342005000400008#fig04
47. Romero MH. Sánchez JA. González LM. 2011. Revisión sobre la importancia de la fauna silvestre en la epidemiología de la leptospirosis. Departamento Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias (en línea) (fecha de acceso 26 de agosto del 2016). Disponible en URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502011000200011
48. Delgado MJ, Vargas OM. 2007. Evaluación serológica de la inmunización de una comercial contra *Leptospira spp*. mediante la técnica de Microaglutinación-lisis en hatos de la sabana de Bogotá. Tesis de Licenciatura. Universidad de La Salle. Medicina Veterinaria. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2016). Disponible en URL: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5968/T14.06%20D377e.pdf?sequence=1>
49. Bharadwaj RS, Ambekan AN, Joshi SA, Kagal AS, BAL AM. 2004. Sero surveillance of leptospirosis among sewer workers in Pune. *Indian Journal of Public Health* vol.48 p.27-29 (en línea) (fecha de acceso 29 de junio del 2017). Disponible en URL: <http://europepmc.org/abstract/med/15704723>
50. Borg PC. 1949. Experience of leptospirosis in Denmark. From: Discussion of leptospirosis. *Proceedings*

- of the Royal Society of Medicine* p.714-718, **En:** VP/OPS/OMS. 2008. Leptospirosis humana. Guía para el diagnóstico, vigilancia y control Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Río de Janeiro (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.paho.org/dor/images/stories/archivos/leptospirosis/who-guia-lepto-2003-spa.pdf?ua=1>
- 51.** Carbrey EA. 1960. The relative importance of variable factors in the agglutination-lysis test. Annual Proceedings of the United States Livestock Sanitary Association p.130-142. **En:** VP/OPS/OMS. 2008. Leptospirosis humana. Guía para el diagnóstico, vigilancia y control Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Río de Janeiro (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.paho.org/dor/images/stories/archivos/leptospirosis/who-guia-lepto-2003-spa.pdf?ua=1>
- 52.** Schneider MC, Nájera P, Aldighieri S, *et al.* 2012. Leptospirosis outbreaks in Nicaragua: Identifying critical areas and exploring drivers for evidence-based planning. *International Journal Environ. Res. Public Health* (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.mdpi.com/1660-4601/9/11/3883> .
- 53.** André FG. 2006. Canine leptospirosis—Do we have a problem? Escuela Nacional Veterinaria de Nantes Médico Bacteriológica y Molecular de Leptospira, *Veterinary Bacteriology*. Vol.117 p.19-24 (en línea compra) (fecha de acceso 27 de junio del 2017). Disponible en URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506001398?via%3Dihub>
- 54.** Clemens WA. 1968. Origin and early evolution of marsupials. *Evolution* vol.2 p.1-18 **En:** Hunsaker D. II. The biology of Marsupials. Elsevier. p. 556, 2012.
- 55.** Emmons LH, Feer F. 1999. Mamíferos de los bosques húmedos de América tropical, una guía de campo. Ed. Fundación Amigos de la Naturaleza. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. **En:** Ramírez HE, 2007. Pérez WA. Mamíferos de un fragmento de bosque de roble en el departamento del Cauca, Colombia. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v11n1/v11n1a04.pdf>
- 56.** Krause WJ, Krause WA. 2004. The Opossum: It's Amazing Story. *Editor Walsworth*, p.71, 2004.
- 57.** CONABIO, México. 2017. Disponible en URL: <http://bios.conabio.gob.mx/especies/8012494>
- 58.** Medina RM, Goyenechea I, Castillo CJ. 2012. Phylogenetic measures applied to the conservation of Mexican marsupials. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol.83 p.1216-1220 México. **En:** Cruz SB, et al. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo de 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
- 59.** Sunquist ME, Austa SN, Sunquist F. 1987. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy*, vol.68 p.173-176 **En:** Cruz SB, et al. 2014. Diversidad

- genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo de 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
- 60.** Ringier HJ. 1961. Review of Oligocene *Didelphis marsupials*. *Journal of Paleontology* vol.35 p.218-228. En: Cruz SB, et al. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo de 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
- 61.** Gardner AL. 1973. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *Special Publications of the Museum Texas Tech University* vol.4 p.1-81. En: Cruz SB, et al. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo de 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
- 62.** Cabello DR. 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Therologica* vol.51:427-433. En: Cruz SB, et al. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo de 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
- 63.** Adler GH, Arboledo JJ, Travi BL. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* vol.32 p.7-11. En: Cruz SB, et al. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo de 2017). Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
- 64.** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.paho.org/dor/images/stories/archivos/leptospirosis/who-guia-lepto-2003-spa.pdf?ua=1>
- 65.** Muñoz J, Cuartas C. 2003. Marsupiales, cenoléstidos e insectívoros de Colombia. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín.
- 66.** Pacheco C, Lugo P, Tzuc C, Ruiz P. Estudios multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán. 1a. edición. Universidad Autónoma de Yucatán. México. 2013.
- 67.** Bunnell J, Hice C, Watts D, Montrueil V, Tesh R, Vinetz J. 2000. Detection of pathogenic *Leptospira spp.* Infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg.* vol.5 p.225-258. **En:** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu*

- tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://www.paho.org/dor/images/stories/archivos/leptospirosis/who-guia-lepto-2003-spa.pdf?ua=1>
68. Ortega LM, García SG; Cruz TA. Manual de prácticas de microbiología veterinaria. UNAM. FESC. 2010.
69. Goris MG, Hartskeerl RA. 2014. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. Current protocols in Microbiology (en línea) (fecha de acceso 29 de junio del 2017). Disponible en URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc12e05s32/full>
70. Farace M. 2001. Epidemiología, Diagnóstico y control de Leptospirosis. Manual del Servicio de bacteriología sanitaria. Instituto nacional de Enfermedades Infecciosas. Argentina. p.28. **En:** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549>
71. Alonso C, García F, Ortega L. 2001. Epidemiología, diagnóstico y control de la Leptospirosis bovina (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* España. Vol.16 p.205-225. **En:** Mendoza BP. 2004. Presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp* en sajinos (*tayasu tajacu*) mantenidos en cautiverio en la amazonia peruana. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú (en línea) (fecha de acceso 24 de mayo del 2017). Disponible en URL: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549>

12.1.Consultas.

1. Romero V, Falconar A. 2016. *Leptospira spp.* y leptospirosis humana. *Revista Salud Uninorte.* Barranquilla, Colombia vol.32 p.123-143. Disponible en URL: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1549> o http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522016000100011
2. Mughini GL, Bonfanti L, Natale A, Comin A, Ferronato A, Greca E, Patregnani T, Lucchese L, Marangon S. 2013. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiol. Infect.* Vol.142 p.1172–1181. Disponible en URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/application-of-an-integrated-outbreak-management-plan-for-the-control-of-leptospirosis-in-dairy-cattle-herds/0C3A318DB5D39C56A8F411573F0E0D25>
3. Cruz SB, et al. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.85 no.1 México. Disponible en URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532014000100024
4. Petrakovsky, Jessica. *et al*; 2014 Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported outbreaks and Literature review (2002-2014). Disponible en URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310001528?np=yidemiology>

o

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211005/>

5. Weinberger D, *et al* 2014. El Niño Southern Oscillation and Leptospirosis outbreaks in New Caledonia. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743322>
6. Terpstra W. 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. World Health Organization; Geneva, Switzerland. Disponible en URL: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:NsmEZvIHHt0J:whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx
7. Wilson JM, Junger G. 1968. The principles and practice of screening for disease. *Public Health Papers*: WHO n°34 **En**: Galván B. 2009. Pruebas de tamizaje. Red CIB. U.N.A.M. Facultad de Medicina, Depto. de Bioquímica, México. Disponible en URL: <http://www.uacj.mx/icb/redcib/materialesdidacticos/monografas/pruebas%20de%20tamiz.pdf> .
8. Lottersberger J, Pauli, R, Vanasco NB. 2002. Desarrollo y validación de un enzimoimmunoensayo para el diagnóstico de leptospirosis bovina. *Archivos de medicina veterinaria*, vol.34 p.89-95. Disponible en URL: <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000100009> ó http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000100009 .
9. Silva Rf, Riedemann S. 2007. Seroprevalencia de leptospirosis canina en perros atendidos en clínicas veterinarias, mediante aglutinación microscópica y comparación con las técnicas de aislamiento e inmunofluorescencia indirecta. *Arch. Med. Vet. Vol.39*, N°3. Disponible en URL: <http://www.scielo.cl/pdf/amv/v39n3/art11.pdf>
10. Macedo A. 2005. Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar *andamana* cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. (Spanish). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol.22p.281–289. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=24052200&lang=es&site=ehost-live>.
11. Martínez GR. 2000. Estado actual de la leptospirosis. *Revista MVZ Córdoba*, vol.5 p.61-63. Bogotá Colombia. Disponible en URL: https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:H55-SmtbS_QJ:scholar.google.com/+factores+de+virulencia+de+leptospirosis&hl=es&as_sdt=0,5&as_vis=1
12. Ramírez. J.M. 2012. Inmunogenicidad de una vacuna elaborada con proteína de membranas externas de una cepa de *Leptospira interrogans* serovariedad *canicola* (LoCaS46) Tesis Maestría U.N.A.M. México.

13. Chirathaworn C, Inwattana R, Poovorawan Y, Suwancharoen D. 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. Disponible en URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025277/>
14. Kin MS. 2016. Chaetophractus villosus reservorio y/o transmisor de algunas enfermedades infecto-contagiosas y/o zoonóticas que afectan a los rumiantes y al hombre. Tesis de posgrado. Argentina (en línea). Disponible en URL:
<http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2645>