



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“SEROPREVALENCIA DE *Leptospira spp.*  
EN POBLACIÓN CANINA DEL COMPLEJO  
AGROPECUARIO E INDUSTRIAL DE  
TIZAYUCA, HIDALGO”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**  
**FRANCISCO GUDIÑO GARCÍA BASTIDA**

**ASESOR**  
**Dr. ORBELÍN SOBERANIS RAMOS**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



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.

## **DEDICATORIA**

A mis padres

A mi hermano

A mi familia

A mis amigos

Gracias por estar conmigo y apoyarme.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la FMVZ.

A mi asesor Orbelin Soberanis Ramos, por dirigir esta tesis y sus consejos.

A mi jurado, por su tiempo y consejos para mejorar mi tesis, gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la financiación parcial para obtención de muestras de la población canina, por FOMIX-CONACYT-GOB. HGO-2008-C01-96469.

A Victor Manuel Banda Ruiz del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

A Jorge Isaac Torres Barranca, Luis Pedro Moles y Patricia Melendez, profesores y personal del Laboratorio de Leptospirosis de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM - Xochimilco) por la capacitación del procesamiento de muestras, por la oportunidad de aprender de ustedes.

# CONTENIDO

	Página
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>CUADROS .....</b>	<b>VI</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1. DEFINICIÓN.....	3
1.2. MORFOLOGÍA.....	4
1.3. ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN.....	7
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	11
2.2. LESIONES Y SEMIOLOGÍA CLÍNICA.....	12
2.3. LEPTOSPIROSIS EN CANINOS.....	14
2.4. DIAGNÓSTICO.....	16
2.5. VACUNAS CONTRA <i>LEPTOSPIRA</i> .....	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVO.....</b>	<b>22</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
6.1. DISEÑO DE ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO.....	23
6.2. LUGAR DE ESTUDIO.....	23
6.3. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	23
6.4. CUESTIONARIO A PROPIETARIOS DE LA POBLACIÓN CANINA.....	25
6.5. SELECCIÓN DE ANIMALES.....	25
6.6. EXAMEN FÍSICO GENERAL.....	26
6.7. COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	27
6.8. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	27
6.9. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	28
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
7.1. LUGAR DE ORIGEN.....	29
7.2. MODO DE ADQUISICIÓN.....	29
7.3. TIPO DE ENCIERRO.....	30
7.4. ALIMENTACIÓN.....	30
7.5. CONVIVENCIA CON OTROS ANIMALES.....	31
7.6. CONVIVENCIA CON LA POBLACIÓN HUMANA.....	32
7.7. SALUD EN LA POBLACIÓN.....	32
7.8. SIGNOS DE ENFERMEDAD.....	33
7.9. RESULTADOS DE LA PRUEBA MAT.....	34

<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXO 1: PROTOCOLO DE LA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA</b> .....	<b>41</b>
<b>ANEXO 2: CUESTIONARIO PARA IDENTIFICAR FACTORES DE RIESGO</b> .....	<b>45</b>

## CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Leptospira</i> .....	7
<b>Cuadro 2.</b> Serogrupos y serovariedades de <i>Leptospira interrogans</i> .....	10
<b>Cuadro 3.</b> Presentaciones clínicas y patológicas de leptospirosis en diferentes especies animales .....	13
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de la prueba MAT .....	34
<b>Cuadro 5.</b> Cepas de referencia utilizadas para la AM en el CENID-Microbiología INIFAP .....	41
<b>Cuadro 6.</b> Grados de aglutinación de antígeno .....	43

## FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>L. interrogans</i> .....	5
Figura 2. Árbol filogenético de <i>Leptospira spp.</i> .....	8
Figura 3. Clasificación de especies de leptospirosis saprófitas y patógenas .....	9
Figura 4. Lugar de estudio .....	24
Figura 5. Fórmula para determinar el tamaño de muestra .....	24

## RESUMEN

GUDIÑO GARCÍA BASTIDA FRANCISCO. Seroprevalencia de *Leptospira spp.* en población canina del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo; bajo la dirección del Dr. Orbelín Soberanis Ramos.

**Objetivo:** determinar la seroprevalencia de leptospirosis en la población canina presente en los establos lecheros del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), así como la frecuencia de las principales serovariedades presentes. **Material y Métodos:** Se obtuvo muestras de 81 sueros de perros, las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Leptospirosis del CENID-Microbiología del INIFAP para determinar la presencia de anticuerpos contra *Leptospira* mediante la prueba de aglutinación microscópica (AM). Adicionalmente se aplicó un cuestionario para determinar los factores de riesgo, mediante análisis estadístico. **Resultados:** La prevalencia de *Leptospira* fue de 45.67%, las serovariedades con mayor frecuencia fueron: *L. palo alto* 39.50% (32) (*icterohaemorrhagiae*), *L. canicola* 27.16% (22), *L. portland* 27.16% (22), *L. bratislava* 19.75%. Considerando que a varios de los sueros positivos presentan anticuerpos para varias serovar de *Leptospira* diferentes.

**Conclusión:** Dado el estrecho contacto que tienen los perros del CAIT, tanto con especies domésticas, silvestres y fauna nociva, la seroprevalencia de leptospirosis esperada era mayor al 20% lo cual se cumplió al encontrarse una prevalencia de

45.67%, y las serovariedades más frecuentes, que se esperaba encontrar, serían: canicola (27.16%), icterohaemorrhagiae (12.34%), pyrogenes (11.11%), grippotyphosa (8.64% ), pomona y tarassovi no se encontraron en la población estudiada, pero se encontró *L. palo alto* 39.50% (icterohaemorrhagiae), *L. bratislava* 19.75%, *L. pyrogenes* 11.11% y *L. inifap* 1.23% (hardjo).

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Definición

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana causada por serovariedades patógenas del género *Leptospira*, que afecta tanto a mamíferos domésticos como a silvestres y es considerada una de las zoonosis más difundidas en el mundo (Guerreiro, 2001; DGE, 2012). Las pérdidas económicas causadas por la leptospirosis son significativas en la industria pecuaria, particularmente en la producción lechera y porcícola, debido a la disminución de la producción (Castillo, 2008).

Los roedores son considerados como los principales reservorios, debido a que alojan en sus riñones leptospiras patógenas (sin sufrir signos clínicos), eliminándolas en el ambiente e infectando animales domésticos y salvajes, en quienes causa diferentes manifestaciones clínicas (Ko et al., 2009).

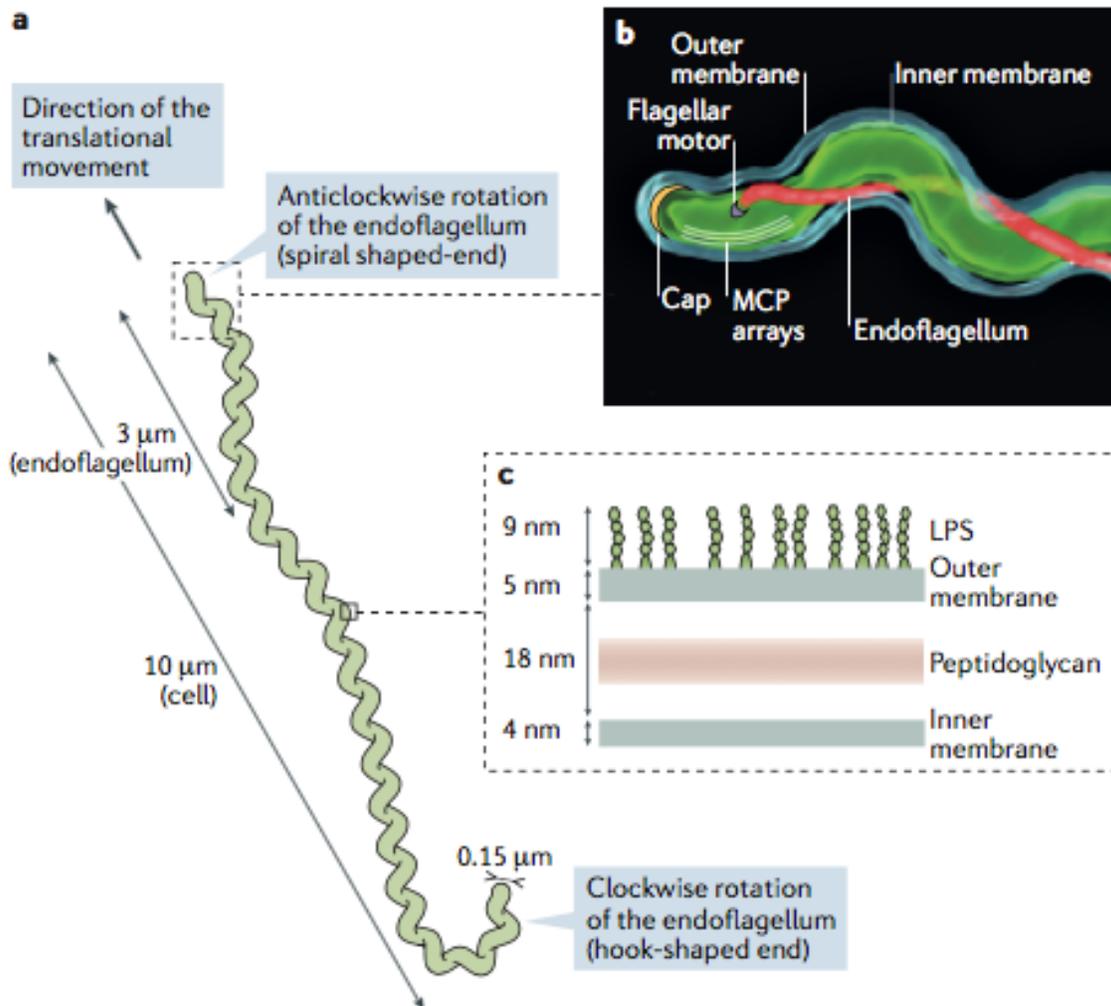
La leptospirosis es considerada una enfermedad ocupacional que afecta a personas que se dedican a la producción agropecuaria, la limpieza de drenajes, la minería y aquellos que tienen contacto con animales, representando un riesgo para la salud pública (DGE, 2012; Castillo, 2008).

Las principales fuentes de transmisión a las personas son la orina, líquidos y tejidos fetales de los animales enfermos, portadores asintomáticos y reservorios. La infección por *Leptospira* se asocia a los periodos de lluvia, presentándose tanto en áreas urbanas como rurales de países sub-desarrollados y desarrollados (DGE, 2012; Castillo, 2008).

## **1.2. Morfología**

La *Leptospira* es un microorganismo en forma espiral (espiroqueta), que mide entre 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro por 10 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud, con ganchos en ambos extremos, tiene 2 flagelos periplasmáticos fijos en los extremos, que se ubican a todo lo largo y alcanzan la parte central de la bacteria, los cuales le dan los movimientos de translación, rotación y contorción característicos del género (Figura 1)(Levett et al., 2006).

Figura 1. Morfología de *L. interrogans*



Fuente: Picardeau M. 2017

La composición citoquímica de su pared es semejante a la de las bacterias Gram negativas, pero no se tiñe adecuadamente con las tinciones bacteriológicas convencionales, por lo que generalmente se observan utilizando un microscopio de campo oscuro; morfológicamente todas las leptospiras son indistinguibles (Levett, 2015). Las leptospiras tienen una estructura típica de doble membrana en la que están estrechamente asociados, la membrana citoplasmática y la pared

celular de peptidoglicano, cubierta por una membrana externa (Levett, 2015; Adler 2009).

En la membrana externa, se encuentran cadenas de carbohidratos que constituyen el lipopolisacárido (por sus siglas en inglés, LPS), antígeno principal de *Leptospira* y varía de una cepa a otra. Tiene una composición estructural e inmunológicamente similar al LPS de organismos Gram negativos. Sin embargo, es relativamente no tóxico para las células o los animales, siendo hasta 12 veces menos letal para los ratones en comparación con LPS de *E. coli* (Llanos, 2017; Adler, 2009). El LPS de *Leptospira* es el antígeno protector mayor y es el detectado en las pruebas de aglutinación microscópica (AM), por lo tanto, es responsable de la clasificación serológica en serogrupos y serovariedades (Adler, 2009).

Las leptospiras son aerobios obligados, con una temperatura óptima de crecimiento de 28 a 30°C. Es altamente susceptible a la desecación y a los cambios de pH. Crecen en medios de cultivo simple enriquecido con vitaminas (vitaminas B1 y B12 son factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio. Los ácidos grasos de cadena larga se utilizan como única fuente de carbono y se metabolizan por  $\beta$ -oxidación (Adler, 2009).

Los medios para su cultivo *in vitro* son esencialmente de dos tipos, aquellos que contienen suero de conejo en concentraciones que van del 8 al 10% (Stuart, Fletcher, Korthof, Cox) y los que utilizan la fracción V de la albúmina sérica bovina

(BSA) al 1 %. El medio sintético EMJH (Ellinghausen y McCulloch modificado por Johnson y Harris) con albúmina sérica bovina y polisorbato 80 (Tween 80), es considerado un medio superior en comparación con otros medios de cultivo tradicionales que contienen suero de conejo como constituyente esencial, por lo que es el más utilizado para aislamientos y cultivos (Levett, 2015; Adler, 2009).

### 1.3. Etiología y Clasificación

Las leptospiras pueden ser patógenas o saprófitas, estas últimas se encuentran en muchos tipos de medio ambiente húmedo, aguas superficiales y suelos húmedos con agua de grifo, incluso leptospiras halófilas saprofitas han sido encontradas en agua de mar (Terpstra, 2003). En el Cuadro 1, se puede observar la clasificación taxonómica del género *Leptospira*.

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del género *Leptospira*.

<b>Reino</b>	Procaryota
<b>División</b>	Bacteria
<b>Phylum</b>	Spirochaetes
<b>Clase</b>	Spirochaetes
<b>Orden</b>	Spirochaetales
<b>Familia</b>	Leptospiraceae
<b>Género</b>	Leptospira

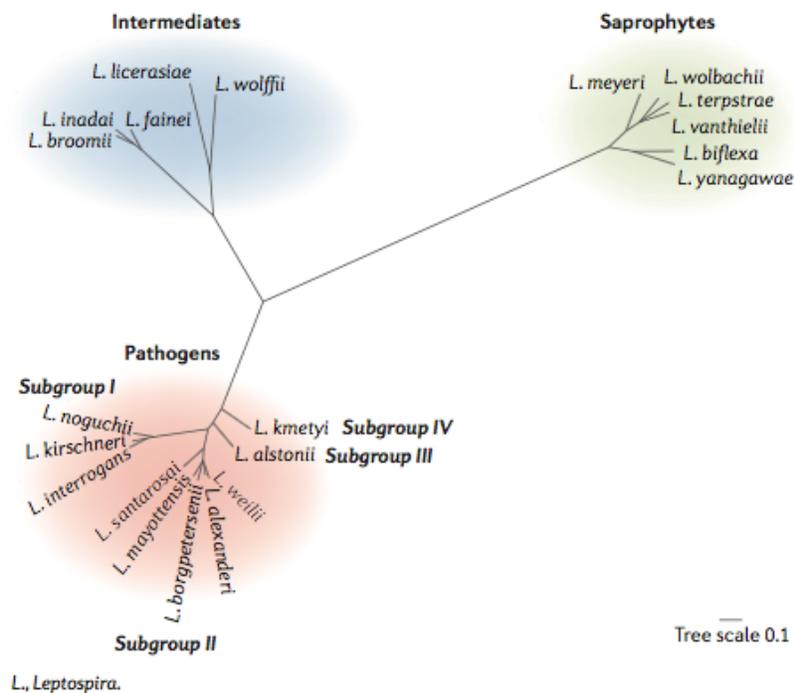
Fuente: Quinn et al, 2002; Llanos 2017

La serovariedad, es el taxón básico formulado por Wolff y Broom en 1945, tanto para clasificar como para explicar de forma práctica la relación huésped-

hospedero. Esta identidad antigénica es el resultado de diferencias en la estructura de las LPS de las leptospiras (Faine, 1999; Bulach, 2002).

La amplia lista de serovariedades de leptospiras patógenas que existe actualmente refleja la importancia de la diversidad de la estructura del LPS. Esta clasificación está basada en la respuesta serológica de *Leptospira* a sueros hiperinmunes en métodos de absorción-aglutinación y actualmente se enlistan más de 260 serovariedades patógenas que se agrupan en 25 serogrupos; mientras que las leptospiras saprófitas sólo agrupan a poco más de 60 serovariedades (Figura 2) (Levett, 2008; Levett, 2015; Picardeau, 2017).

Figura 2. Árbol filogenético de *Leptospira* spp.

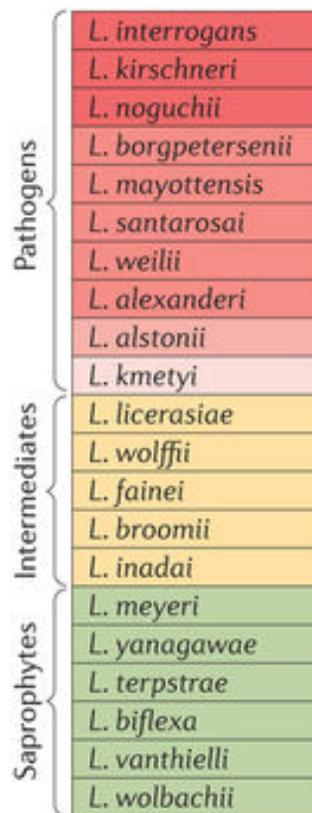


Fuente: Picardeau M. 2017

Las serovariedades patógenas generalmente tienen huéspedes específicos, por ejemplo hardjo los bovinos, canicola y los perros, icterohaemorrhagiae y roedores. (Picardeau, 2017).

Se realizó un sistema de clasificación molecular basado en la relación del ADN que divide al género *Leptospira* en varias genomoespecies. Se consideran actualmente 15 genomoespecies patógenas y 6 especies de leptospiras saprófitas (Figura 3). La determinación de un serovar está basado en el cross-agglutinin absorption test (CAAT), por sus siglas en ingles (Picardeau, 2017).

Figura 3. Clasificación de especies de leptospiras saprófitas y patógenas



Fuente: Modificado de Picardeau M. 2017

La reclasificación de las leptospiras con los determinantes genéticos proporciona información taxonómica útil, pero es independiente de la clasificación serológica establecida. Por lo tanto, ambas clasificaciones (genética y antigénica) coexisten,

la mayor parte de la investigación epidemiológica y de diagnóstico se ha realizado con base en la clasificación serológica (Cuadro 2) (Levett, 2015).

**Cuadro 2.** Serogrupos y serovariedades de *Leptospira interrogans*

<b>Genero</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Serovar</b>
	Australis	australis, bratislava, hawain, nicaragua, peruviana
	Autumnalis	autumnalis, louisiana, rachmani, sumatrani
	Ballum	ballum, castellonis
	Bataviae	argentis, balboa, bataviae
	Canicola	canicola, galtoni, malaya, schueffneri, sumneri
	Celledoni	celledoni
	Cynopteri	cinopteri
	Djasiman	djasiman
	Grippotyphosa	canalzoane, grippotyphosa, muelleri
<b>L. interrogans</b>	Hebdomadis	borincana, georgia, hebdomadis.
<b>(Patógenas)</b>	Icterohaemorrhagiae	copenhageni, dakota, icterohemorrhagiae, mankarso
	Javanica	fulmínense, javánica, poi
	Panamá	crístobali, panamá
	Pomona	mmonjakov, pomona, tropica
	Pyrogenes	abramos, kawali, pyrogenes, varela
	Ranarum	
	Sarmin	
	Sejroe	balcánica, dikkeni, haemolytica, hardjo, wolffi
	Shermani	babudieri, shermani
	Tarassovi	atlantae, bekeri, gatuni, tarassovi

Fuente: Ren, et al. 2003

## **2. Antecedentes**

La *Leptospira* patógena fue aislada por primera vez en Japón en 1914, un año después, los investigadores japoneses habían inmunizado con éxito a cuyes. Ellos demostraron que la inyección de leptospiras inactivadas con fenol provocó inmunidad protectora en los conejillos de indias, lo que demostró por primera vez la importancia de los anticuerpos en la inmunidad para leptospiras en un modelo animal (Inada et al., 1916).

### **2.1. Epidemiología**

La epidemiología de la leptospirosis es compleja debido al amplio rango de serovariedades, posibles hospedadores, diversidad de nichos ecológicos y presentaciones clínicas participantes en la misma. Sin embargo, epidemiológicamente la infección por *Leptospira* se puede entender en dos amplias categorías: leptospirosis adaptada al hospedero y la no adaptada (DGE, 2012).

Un animal infectado con una serovariedad adaptada se comporta como un hospedero de “mantenimiento” o “reservorio”, en tanto la exposición de animales susceptibles a serovariedades no adaptadas produce una enfermedad accidental (DGE, 2012).

Cada serovariedad tiene un hospedero de mantenimiento en particular, aunque pueden causar enfermedad en cualquier especie de mamíferos. Por lo tanto, una serovariedad se comporta de forma diferente dentro de su especie de mantenimiento que en un hospedero accidental (Castillo, 2008; Rodríguez, 2007).

Se consideran como hospederos reservorios típicos de *Leptospira spp.* en primer lugar a los roedores (serovariedades ballum, icterohaemorrhagiae, copenhageni), en segundo término a los carnívoros (serovariedad canicola) y en tercer lugar a otros animales domésticos como bovinos (serovariedad hardjobovis), porcinos (serovariedades bratislava, pomona, tarassovi) y equinos (bratislava y pomona) (DGE, 2012).

Cuando estos animales se encuentran infectados por serovariedades adaptadas se presentan cuadros subclínicos o asintomáticos. Por consiguiente, las especies que son portadoras durante largo tiempo (usualmente asintomáticos), se les llama hospederos de mantenimiento (Castillo, 2008).

## **2.2. Lesiones y semiología clínica**

La lesión primaria en todas las formas de leptospirosis es el daño al endotelio vascular causado por hemolisinas, provocando daños isquémicos y muerte celular (Hauk, *et al*, 2005).

Las lesiones más frecuentes se observan en los riñones, donde la necrosis celular cortical, petequias y hemorragias equimóticas ocurren especialmente en los glomérulos y los túbulos contorneados proximales. Sin embargo, el alcance y la gravedad de las lesiones depende de la serovariedad infectante, la edad del animal y el estadio de la enfermedad (Alston JM, Brom JC. 1958; Llanos, 2017).

Las principales lesiones patológicas que pueden observarse en forma aguda, son anemia, ictericia, hemoglobinuria y hemorragias. En los animales recuperados de la forma aguda de la enfermedad el hallazgo característico es la nefritis intersticial progresiva. En el caso de aborto, en la placenta se puede observar edema y placentitis, en el feto se puede detectar nefritis (Cuadro 3)(Llanos,2017).

**Cuadro 3.** Presentaciones clínicas y patológicas de leptospirosis en diferentes especies animales

<b>HOSPEDERO</b>	<b>LESIONES Y SIGNOS CLINICOS</b>
<b>Rumiantes</b>	Infertilidad, abortos, agalactasia, mortinatos, hemoglobina, anemia hemolítica, nacimientos prematuros, crías débiles
<b>Cerdos</b>	Meningitis, hemoglobinuria, daño renal, mastitis, abortos, nacimientos prematuros y momificaciones
<b>Perros</b>	Cuatro síndromes: hemorrágico agudo, urémico crónico, icterico crónico y abortivo
<b>Caballos</b>	Abortos, infertilidad, agalactia, hemoglobinuria y uveítis recurrente (forma crónica)
<b>Hámsteres y cuyes</b>	Pérdida de peso, postración, nefritis intersticial, neumonía hemorrágica, hepatitis

Fuente: Llanos, 2017; Adler, 2004; Quinn et al., 2002; Faine et al., 1999

### 2.3. Leptospirosis en caninos

En los perros, se conoce como enfermedad de Stuttgart (presentación urémica), tifus del perro e ictericia infecciosa canina. La vías de entrada de *Leptospira* spp. es a través de las mucosas (conjuntiva, nasofaríngea y genital), heridas en la piel o piel reblandecida, o bien por la ingestión de ratas infectadas. De forma indirecta por la ingesta de agua contaminada con leptospiras (Luna, 2008; Arenas, 2016).

Una vez que *Leptospira* ha penetrado se multiplica con rapidez en el torrente sanguíneo (fase de leptospiremia), durante 7 a 10 días y se disemina a tejidos como sistema nervioso central, pulmones, bazo, humor vítreo, tracto genital, hígado y riñones (Luna, 2008).

Algunas infecciones son asintomáticas (presentación subclínica), mientras que otras infecciones son graves o mortales (presentación sobreaguda), en la cual los perros pueden morir sin la presencia de signos clínicos (McDonough, 2001).

Los signos clínicos y el desarrollo de lesiones son muy variables en los perros y se ven influenciados por la edad, el estado inmunológico del perro, la virulencia inherente de una serovariedad de *Leptospira* en particular, así como también la ruta y el grado de exposición (Luna, 2010a).

Los signos iniciales suelen ser inespecíficos y pueden incluir fiebre, depresión, anorexia, rigidez, mialgia, escalofríos y debilidad. Estos signos pueden ser

seguidos por enfermedad renal incluyendo anuria, hematuria o aumento de la frecuencia de micción, vómitos, deshidratación y úlceras orales (presentación crónica o urémica). Diarreas, tos, disnea, epistaxis, conjuntivitis, pérdida de peso, hemorragias petequiales y equimóticas e ictericia, también puede ser visto (síndrome hemorrágico) (Adler, 2009; Miguel, 2009; Luna, 2010<sup>a</sup>; Luna, 2010b; Luna, 2008).

Cuando las leptospiras invaden el sistema nervioso y el líquido cefalorraquídeo (LCR) se observa meningitis y también pueden colonizar el humor acuoso produciendo uveítis crónica o recurrente (Godínez, 2013).

Eventualmente se puede presentar aborto en el último tercio de la gestación o nacimiento de cachorros débiles con trastornos digestivos y muerte en las primeras semanas de vida (síndrome reproductivo) (Adler, 2009; Miguel, 2009; Flores, 2010).

El incremento de los anticuerpos séricos elimina a *Leptospira* de la mayor parte de los órganos, excepto de los túbulos contorneados renales donde coloniza y persiste para después ser eliminada por la orina (fase de leptospiuria) en forma intermitente por periodos prolongados (meses, años o de por vida), convirtiéndose en portadores de *Leptospira* spp. y reservorio para personas y animales susceptibles (Luna, 2010a; Luna, 2010b; Estrada, 2008).

## 2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de leptospirosis, es difícil de confirmar, debido a la gran diversidad de signos clínicos presentes en individuos enfermos (humanos o animales), así como, a la difícil adaptabilidad del microorganismo a las condiciones de laboratorio que lo hace de aislamiento difícil y lento (Adler, 2009; Castillo, 2008, Flores, 2010).

El diagnóstico de leptospirosis se puede realizar mediante técnicas de laboratorio directas e indirectas (de la Peña, 2009; DGE, 2012).

Las pruebas directas detectan leptospiras, antígenos de leptospiras o ácidos nucleicos de leptospiras en tejidos o fluidos corporales de animales. Entre ellos está la microscopía de campo oscuro, el aislamiento, la inmuno-tinción o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Adler, 2009; DGE, 2012).

a) La observación directa de *Leptospira* mediante microscopio de campo oscuro de líquidos corporales: sangre, líquido cefalorraquídeo y orina, así como del sobrenadante del macerado de tejidos. Requiere de experiencia para efectuar el examen de muestras para lograr su identificación por ser frecuente la presencia de estructuras denominadas “pseudoespiroquetas” con las que fácilmente se pueden confundir con la bacteria (DGE, 2012).

b) El aislamiento bacteriológico directo de muestras de tejidos y fluidos es el método definitivo de diagnóstico de la infección, sin embargo, tiene el

inconveniente de ser costoso y complejo debido a sus exigentes requerimientos nutricionales, así como la lentitud de su desarrollo (DGE, 2012).

c) La inmunohistoquímica es una técnica basada en una reacción enzimática que permite la identificación de determinantes antigénicos por medio de la aplicación directa de anticuerpos y su detección por una reacción colorimétrica. La eficacia de esta prueba depende del número de organismos que estén presentes en el tejido y no identifica la serovariedad infectante, además de que los resultados deben interpretarse junto con los resultados serológicos (OIE, 2008).

d) La PCR sirve para detectar la presencia de material genético de leptospiras de líquidos corporales o tejidos. Es una prueba sensible pero los procedimientos de control de calidad y el procesamiento de las muestras para PCR son cruciales y deben adecuarse al tejido, al fluido y a la especie que se esté analizando. Al igual que ocurre con las pruebas inmunoquímicas, con la mayoría de los ensayos de PCR no se identifica la serovariedad infectante (DGE, 2012).

Las pruebas indirectas detectan anticuerpos específicos anti-leptospiras, entre ellos, están el ensayo inmuno-enzimático (ELISA), la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI), y la prueba de aglutinación microscópica (AM) (Adler, 2009; DGE, 2012).

a) La prueba de ELISA puede detectar títulos de anticuerpos en los primeros días de la infección, sin embargo no discrimina entre infecciones por diferentes serovariedades. Los animales que han sido vacunados frente a la serovariedad pertinente pueden dar resultados positivos en muchos ELISA, dificultando de esta manera la interpretación de los resultados (DGE, 2012).

b) La prueba AM es la prueba serológica más ampliamente utilizada y es considerada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como de validez diagnóstica (Anexo 1) (Adelr, 2009; OIE, 2008).

La AM detecta anticuerpos aglutinantes principalmente del tipo IgM contra la serovariedad infectante específica. La prueba consiste en enfrentar antígenos vivos a diferentes diluciones del suero. Las diluciones se observan en el microscopio de campo oscuro con los diferentes objetivos, hasta 100X y sueros con anticuerpos anti-*Leptospira* dan como resultado la aglutinación de las leptospiras en suspensión (Rodríguez, 2007).

Los sueros negativos no aglutinan las leptospiras observándose éstas aisladas y uniformemente distribuidas en todo el campo. La prueba se considera positiva cuando se detecta aglutinación microscópica en diluciones de por lo menos 1:100 (Chappel, 2004; Rodríguez, 2007).

Los anticuerpos anti-*Leptospira* se detectan en el curso de la infección y éstos aumentan aproximadamente entre los 11 a 21 días post infección por lo que es posible obtener AM negativas en animales recientemente infectados (Adler, 2009; DGE, 2012).

## **2.5. Vacunas contra *Leptospira***

En cuanto a los animales domésticos, la vacunación de cerdos, bovinos y perros es eficaz para prevenir la enfermedad, pero no protege por completo contra la infección. Los animales vacunados pueden infectarse sin mostrar signos clínicos, y pueden tener leptospiruria, aunque en menor grado y por menor tiempo que los animales no vacunados, considerando que la protección es serovar específica, si se infectan de una serovar no contenida en la bacterina, se enfermarán (Acha, et al, 2001).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La población canina del CAIT cumple funciones de vigilancia o de compañía, sin embargo, puede ser reservorio de *Leptospira spp.* A través de sus excreciones puede dispersar la *Leptospira* a todo el establo y llegar a contaminar el agua y el alimento de los bovinos de las unidades de producción lechera. También puede ser reservorio para las personas que conviven con ellos, lo que representa un grave problema de salud pública. Si bien, existe información epidemiológica de la leptospirosis canina en México, hay pocos estudios realizados donde cohabiten población canina, bovinos lecheros y trabajadores.

#### 4. HIPÓTESIS

Dado el estrecho contacto que tienen los perros del CAIT, tanto con especies domésticas, silvestres y fauna nociva, la seroprevalencia de leptospirosis esperada será mayor al 20%, y las serovariedades de *Leptospira* que se espera encontrar más frecuentemente serán: canicola, icterohaemorrhagiae, pomona, pyrogenes, grippotyphosa y tarassovi.

## **5. OBJETIVO**

Estimar la seroprevalencia de leptospirosis en la población canina del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo.

### 5.1. Objetivos específicos

Estimar la frecuencia de las serovariedades.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Diseño de estudio epidemiológico**

Se realizó un estudio epidemiológico transversal de tipo analítico.

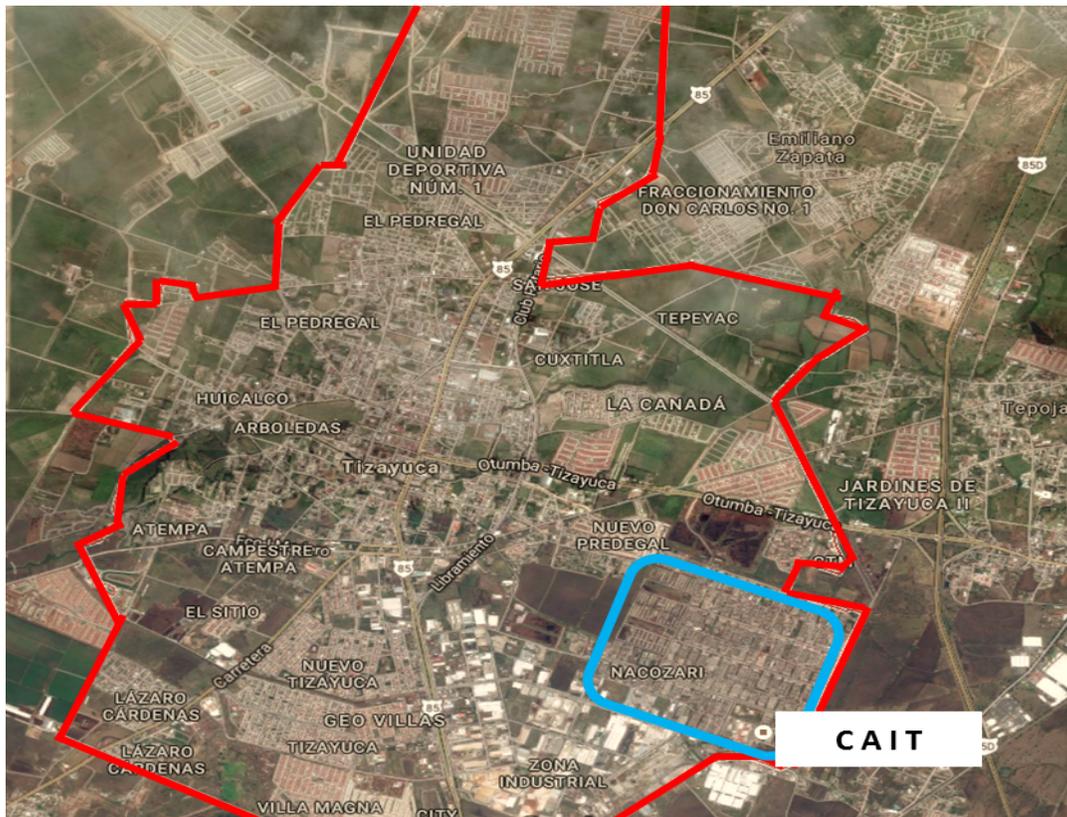
### **6.2. Lugar de estudio**

En el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), el cual se encuentra localizado en la parte sur de la localidad de Tizayuca, perteneciente al municipio del mismo nombre, en el estado de Hidalgo, en la carretera federal México-Pachuca, Km. 51.5. Cuenta con 126 establos especializados en la producción de leche, con alrededor de 22,000 vacas en producción y 6,000 becerras en recría (Figura 4).

### **6.3. Determinación del tamaño de muestra**

Se determinó con base en el estudio previo de Bautista 2010, con una prevalencia esperada del 25%, un nivel de confianza del 95% y un error aceptado del 9%. Se utilizó el programa Sample Size 2.0 ® (Figura 5).

**Figura 4.** Lugar de estudio



En rojo se muestra el municipio de Tizayuca, en azul se muestra el CAIT  
*FUENTE: Modificado de Google Maps, 2016.*

**Figura 5.** Fórmula para determinar el tamaño de muestra

$$n = \frac{z^2 p(1-p)}{d^2}$$

$Z^2$ = nivel de confianza

P= Probabilidad de éxito

1-P= Probabilidad de fracaso (q)

$D^2$ = diferencia de la frecuencia modal con la frecuencia posterior

Dando una n de 89 individuos.

#### **6.4. Cuestionario a propietarios de la población canina**

Se aplicó un cuestionario previamente validado y adaptado de Bautista 2010, enfocado a obtener información sobre los factores de riesgo asociados con los animales de compañía y la leptospirosis, así como datos de salud en general (Anexo 2).

Se aplicó a los propietarios de los caninos seleccionados, considerando las siguientes variables:

- Presencia o ausencia de mascotas en el establo.
- Número de mascotas por sexo y especie.
- Tipo de contención de las mascotas: encerrados, amarrados o libres.
- Acceso de las mascotas propias a los establos vecinos.
- Acceso de otros perros, gatos o ambos al establo.

Cabe destacar que 2 de los establos visitados, se encontraban despoblados en ese momento.

#### **6.5. Selección de animales**

Los animales muestreados fueron seleccionados de manera aleatoria simple. Los criterios de inclusión fueron: que los perros habitaran en los establos del CAIT, mayores de 6 meses de edad y con permiso del propietario para ser incluido en el estudio.

Se excluyeron animales menores de seis meses, hembras gestantes, animales que deambularan libremente sin dueño o en los que el propietario no accediera a participar.

## **6.6. Examen físico general**

Para realizar el examen físico general se elaboró y utilizó un formato en el cual se incluyeron los datos generales de cada mascota: especie, raza, sexo, edad y el número de identificación individual consecutivo asignado para la participación en el estudio. Se evaluaron las siguientes constantes fisiológicas: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, reflejo deglutorio, reflejo tusígeno, campos pulmonares, palmo percusión, nivel de hidratación, estado de los linfonodos mandibulares, cervicales y poplíteos, coloración de las mucosas, tiempo de llenado capilar, palpación abdominal, pulso y condición corporal.

Además fueron considerados otros hallazgos adicionales al examen físico general, especialmente aquellos que pudieran coincidir con la semiología característica de la enfermedad.

## **6.7. Colección de muestras**

Se obtuvo asépticamente las muestras de sangre de cada perro por punción de la vena cefálica y se dejó coagular. Dicha muestra fue centrifugada a 3584 RCF (Relative Centrifugal Force) (8,000 RPM) ( $RCF = 1.12 \times \text{Radius} \times (\text{rpm}/1000)^2$ ) durante 10 minutos, con el fin de dividir completamente el suero del paquete celular. El suero ya separado fue transferido a microtubos nuevos que se rotularon y se conservaron en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento en el laboratorio del CENID-Microbiología del INIFAP; esta unidad cuenta con los procedimientos establecidos por el Comité de Bioseguridad con normatividad vigente para el personal del laboratorio; de igual manera para el manejo, procesamiento y destino final de las muestras y tratamiento adecuado de los Residuos Peligrosos Biológicos e Infecciosos (RPBI).

## **6.8. Diagnóstico de laboratorio**

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del CENID-Microbiología del INIFAP, con la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). Esta técnica es la prueba serológica más ampliamente utilizada y es considerada por la OIE, la OPS, OMS y la International Leptospirosis Society, una dilución con un título  $\geq 1:100$  se considera como un diagnóstico positivo, de validez diagnóstica

## **6.9. Análisis de la información**

Las variables fueron sometidas a un análisis descriptivo univariado, mediante frecuencias absolutas y relativas, medidas de tendencia central y de dispersión. En el análisis bivariado, cuando las variables continuas presentaban distribución normal se utilizó la prueba de "t", en caso contrario el estadístico de U de Mann-Whitney para las variables categóricas la prueba de  $\chi^2$ .

Se obtuvo razón de momios (RM) para cada una de las variables con sus respectivos intervalos de confianza al 95% para identificar en caso de que existiera asociación con la variable de infección.

## **7. RESULTADOS**

De las 89 muestras obtenidas, solo fue posible procesar 81, ya que las otras presentaban contaminación, hemolisis o lipemia.

De 81 sueros analizados, procedían de 50.62% hembras (41) y 49.38% machos (40); la edad media de la población fue de 3 años. La edad promedio de los machos es de 35.7 (36) meses, mientras que en las hembras es de 35.05 (35) meses.

### **7.1. Lugar de origen**

El 48.15% (39) de los perros nacieron dentro del CAIT, mientras que el resto provienen de otros lugares: 18.52% (15) del municipio de Tizayuca, 13.58% (11) de otros municipios del estado de Hidalgo, 9.88% (8) del Estado de México, 3.70% (3) de la Ciudad de México, 1.23% (1) de Querétaro y del 4.94% (4) se desconoce el lugar de origen.

### **7.2. Modo de adquisición**

El 61.73% (50) fue regalado por algún conocido, el 18.52% (15) nacieron de hembras que habitan en el CAIT, el 12.35% (10) fue encontrado en la calle y adoptado y el 7.41% (6) de los perros fue adquirido mediante compra.

### **7.3. Tipo de encierro**

El 59.25% (48) de los perros permanecen libres todo el tiempo, el 18.51% (15) permanecen amarrados o encerrados la mayor parte del tiempo, el 9.87% (8) permanecen sueltos únicamente durante el día y el 12.34% (10) solo durante la noche. En ocasiones los dueños llegan a soltar a los perros, pudiendo deambular libremente por los establos. Por lo tanto, se observó que el 87.65% (71) de las mascotas pueden deambular libremente en algún momento del día.

Las principales áreas a las que tienen acceso los perros son: corrales 71.60% (58/81), almacén de alimentos 54.32% (44/81), becerreras 43.20% (35/81), habitaciones de la casa 23.45% (19/81) y sala de ordeño 22.22% (18/81). El 53.08% (43/81) tiene acceso a establos vecinos.

En cuanto a si los caninos tienen un área específica para dormir, el 40.74% (33/81) de los perros no tienen un área específica, mientras que el resto sí tiene algún sitio para ello, en el establo.

### **7.4. Alimentación**

El 98.76% (80) de los perros son alimentados por sus propietarios al menos una vez al día; solo uno de ellos (1.23%) no recibe este tipo de cuidado por parte de sus dueños.

A pesar de recibir alimento constantemente, el 37.03% (30/81) de la población canina ha sido observada consumiendo placentas de bovinos o fetos abortados.

El 79.01% (64/81) de los perros recibe por parte de sus dueños una fuente de agua para su consumo diario, y de estos, el 93.75% (60/64) reciben agua corriente proveniente de las tomas de agua potable en las instalaciones del establo; 3.12% (2/64) recibe agua hervida; 3.12% (2/64) recibe agua proveniente de los bebederos de los bovinos. Los perros restantes 20.98% (17/81) no reciben una fuente de agua por parte de sus propietarios, por lo que se ven obligados a tomarla de otros sitios.

El 56.79% (46/81) del total de los caninos han sido vistos bebiendo agua de charcas o asentamientos de agua, y el 19.75% (16/81) llegan a consumir agua directamente de los bebederos de los bovinos, aun cuando tienen un traste específico para ello.

## **7.5. Convivencia con otros animales**

El 39.50% (32/81), de los perros puede convivir con caninos de otros establos. El 37.03% (30/81) tiene convivencia con los bovinos. Además se encontró que algunos animales pueden convivir con aves de corral (gallinas, gallos, gansos), gatos, conejos.

## **7.6. Convivencia con la población humana**

El 59.25% (48/81) de los perros tienen una convivencia cercana o muy cercana con sus propietarios, con sus familias y con otros habitantes del mismo establo; el 27.16% (22/81) conviven poco con las personas en el establo y 13.58% (11/81) tienen una convivencia casi nula con la población humana. El 54.32% (44/81) llegan a tener convivencia con la población infantil en el CAIT.

Los cuidados, atención y el tipo de convivencia entre otras cosas, dependen en gran medida de la manera en que una familia ve a su mascota. En el CAIT, 41.97% (34/81) de los dueños entrevistados señalaron que sus mascotas son vistas como un miembro más en su familia.

## **7.7. Salud en la población**

Se encontró que 98.76% (80/81) de los perros son o han sido sometidos regularmente a algunas medidas básicas de medicina preventiva como la vacunación, desparasitación y esterilización para controlar la natalidad. Únicamente uno de ellos (1.23%) nunca ha sido sometido a ninguna de estas medidas.

Entre los que han sido vacunados, se encontró que 88.73% fue vacunado en el último año durante la campaña de vacunación antirrábica, 7.04% hace más de un

año 2.82% solo recibió vacunas en la etapa de cachorro y el 1.41% nunca ha recibido vacuna alguna.

El 93.82% (76/81) de los animales no ha sido esterilizado mientras que el 6.17% (5/81) esta esterilizado, de los cuales 80% (4/5) son hembras y el 20%( 1/5) corresponde a machos.

El 30.86% (25/81) de los propietarios manifestó que su animal ha recibido algún tipo de desparasitación en toda su vida.

## **7.8. Signos de enfermedad**

Se preguntó a los propietarios si sus perros han presentado alguno de los siguientes signos de enfermedad, por ejemplo, en el tracto digestivo: diarrea, melena y vómito; signos respiratorios: tos, disnea y moco nasal; signos urinarios: poliuria y hematuria; signos inespecíficos de enfermedad: pérdida de peso, hiporexia, depresión, polidipsia y distensión abdominal. El signo más común fue la presencia de moco, presente en el 21.13% de la población.

## 7.9. Resultados de la prueba MAT

De los 81 sueros de caninos procedentes del CAIT analizados mediante la prueba de MAT, se encontraron 37 pruebas positivas (45.67%), las cuales se discriminaron según el serotipo (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Resultados de la prueba MAT**

<b>Serotipo</b>	<b>n (%)</b>
<i>L. palo alto</i> (icterohaemorrhagiae)	32 (39.50)
<i>L. canicola</i>	22 (27.16)
<i>L. portland vere</i>	22 (27.16)
<i>L. bratislava</i>	16 (19.75)
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	10 (12.34)
<i>L. pyrogenes</i>	9 (11.11)
<i>L. grippotyphosa</i>	7 (8.64)
<i>L. inifap (hardjo)</i>	1 (1.23)

Se debe considerar que el 40.54% (15) de los sueros positivos presentan anticuerpos para una serovar de *Leptospira*, el 8.10% (3) a dos serovares diferentes, el 10.81% (4) a tres serovares diferentes, el 13.51% (5) a cuatro serovares, el 18.91% (7) a cinco serovares diferentes, el 10.81% (4) a seis serovares diferentes y el 2.70% (1) a siete serovares diferentes. Resaltando que existe reactividad cruzada entre serovares.

## 8. Discusión

El propósito del presente trabajo es describir y analizar los factores de riesgo asociados a la infección por leptospirosis en una población canina que habita en los establos del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca. Las variables de estudio fueron consideradas con base en la plausibilidad biológica en la cadena causal de la leptospirosis, así como algunas variables condicionantes de la enfermedad, mismas que fueron seleccionadas a partir de una encuesta enfocada a otra zoonosis realizada en el año 2011.

Los resultados encontrados en el presente estudio evidenciaron una frecuencia de (45.67%), menor a la reportada en un estudio en Veracruz (66%) (Lugo, 2015), pero superior a lo reportado en Culiacán, Sinaloa (9%) (Hernández, 2017). Las serovariedades con mayor frecuencia fueron: *L. palo alto* 39.50%, *L. canicola* 27.16%, *L. portland vere*, 27.16%, *L. bratislava* 19.75% encontrando concomitancia hasta con siete serovares distintas (Lugo, 2015; Hernández, 2017; Rivera 1999). No existe diferencia estadísticamente significativa respecto al sexo entre hembras y machos. En cuanto a la edad de los caninos, se encontró una prevalencia mayor en los caninos mayores a un año, lo cual concuerda con las investigaciones realizadas en el estado de Veracruz y Yucatán, así como en Colombia (Lugo, 2015; Jiménez 2008; Sánchez 2010).

## 9. Conclusiones

El presente estudio permitió establecer la seroprevalencia de infección por *Leptospira* en una población canina en una zona de alto riesgo, la tipificación de las leptospirosis circulantes en el CAIT como indicadores de fuente de infección y sus reservorios asociados, para la transmisión de la leptospirosis.

Debido a la presentación clínica de la enfermedad con semiología similar a otras enfermedades, es necesario disponer de un diagnóstico en laboratorios cercanos asociado a los antecedentes de exposición con animales para confirmar o descartar la enfermedad con el objeto de realizar tratamientos oportunos para mejorar y restablecer la salud poblacional.

Dado el estrecho contacto que tienen los perros del CAIT, tanto con especies domésticas, silvestres y fauna nociva, la seroprevalencia de leptospirosis esperada era mayor al 20% lo cual se cumplió al encontrarse una prevalencia de 45.67%, y las serovariedades más frecuentes que se esperaba encontrar serían: *L. canicola* (27.16%), *L. icterohaemorrhagiae* (12.34%), *L. pyrogenes* (11.11%), *L. grippityphosa* (8.64% ), *L. pomona* y *L. tarassovi* no se encontraron en la población estudiada, pero se encontró *L. palo alto* 39.50% (*icterohaemorrhagiae*), *L. bratislava* 19.75%, *L. pyrogenes* 11.11% y *L. inifap* (hadjo) 1.23%.

## 10. REFERENCIAS

- Acha PN, Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera Edición. Washington DC: OPS Pub. Cient. Y Tec. Organización Panamericana de la Salud.
- Adler B, de la Peña M. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 2009; 140:287-296.
- Alston JM, Broom JC. Leptospirosis in man and animals. Edinburgh and London 1958, E & S. Livingstone. 367
- Arenas Pérez, Pablo “Andrés. Seroprevalencia de rabia y *Leptospira* en poblaciones de perros de libre rango (*Canis familiaris*) y tlacuaches (*Didelphis spp.*) que habitan dos reservas ecológicas” (Tesis de licenciatura) CDMX, México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, 2016.
- Bautista Rincón, Ilce Lorena. “Distribución espacial de perros y gatos como un factor de riesgo en la transmisión de *Mycobacterium bovis* en el complejo agropecuario e industrial de Tizayuca, Hidalgo” (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México , Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, México, 2010.
- Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. J. Mol. Microbiol and Biotechnology, 2002. 2: p. 375-380.
- Castillo Sanchez L. “Detección de perros portadores de leptospirosis patógenas: Estudios bacteriológico, serológico, histopatológico y molecular”. (Tesis de licenciatura) Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, 2008.
- Chappel RJ, Goris M, Palmer MF, Hartskeerl RA. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology, 2004. 42: p. 5484-5488
- Dirección General de Epidemiología (DGE). Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Leptospirosis, Mexico; 2012.

- Estrada, NM del P, Torres, BJI, Moles y CLP, Soto. CR. Determinación serológica de anticuerpos contra *Leptospira* spp y *Brucella* en fetos de bovino del complejo agroindustrial de Tizayuca hidalgo (CAITSA). Memorias XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Yucatán 2008.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, *Leptospira* and Leptospirosis 2da ed. 1999, Melbourne, Australia: MediSci.
- Flores-Castro R. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. Gac Med Mex 2010; 146(6):423-429.
- Godínez Santos Janeth, MANUAL DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE *Leptospira interrogans*, Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 2013
- Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao RM, et al., Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect. Immun. 2001. 69: p. 4958-4968.
- Hauk P, Negrotto S, Romero EC, Vasconcellos SA, Genovez ME, Ward RJ, et al. Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni: potentiation of hemolytic activity by LipL32. Biochem Biophys Res Commun 2005; 333(4): 1341-47.
- Hernández Ramírez CV, Gaxiola Camacho SM, Osuna Ramirez I, Enríquez Verdugo I, Castro del Campo N, López Moreno HS. Prevalence and risk factors associated with serovars of *Leptospira* in dogs from Culiacan, Sinaloa. Veterinaria México OA 2017;4(2). doi: 10.21753/vmoa.4.2.369
- Inada R, Ido Y, Hoki R, Ho H, Wani h. The serum treatment of weil's disease (*Spirochaetosi Icterohaemorrhagica*) J Exp Med 1916. Nov 1: 24(5): 485-496
- Jiménez M, Vado I, Cárdenas M, Rodríguez J, Ortega A. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. Acta tropica. 2008; 106.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.12.011>
- Ko AI, Gorat C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7:736-747

- Levett PN, Morey RE, Galloway RI, Steigerwalt AG, *Leptospira boomii* sp. Nov. isolated from humans with leptospirosis. *Int Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 671- 673
- Levett PN. Minutes of the closed meeting, 2008, Quito, Ecuador. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58: p. 1049-1050.
- Levett PN. Systematics of leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;387:11-20  
[https://doi: 10.1007/978-3-662-45059-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2).
- Llanos Salinas SP. Inmunogenicidad de la proteína recombinante GspD de *Leptospira interrogans*, Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, 2017.
- Lugo Chávez L, Velasco Rodríguez LdC, Canales Velásquez G, Velázquez Hernández JF, Herrera Huerta EV. Detección de anticuerpos anti-*leptospira* en una población vulnerable del municipio de Ixhuatlancillo, Veracruz. *Rev Med Inst Mes Seguro Soc*. 2015 Octubre; 53(2).
- Luna AMA, Santillán FMA, Moles CLP, Vázquez NC. Diagnóstico y patología clínica de la leptospirosis canina. Memorias curso Leptospirosis en perros: riesgo en salud pública y actualidades en la reproducción de los perros 2010 Junio 7-8, Puebla, Puebla, México. 2010 47-65 (a)
- Luna AMA, Santillán FMA, Moles CLP, Vázquez NC. Epidemiología de la leptospirosis canina. Memorias curso Leptospirosis en perros: riesgo en salud pública y actualidades en la reproducción de los perros 2010 Junio 7-8, Puebla, Puebla, México. 2010 29-46 (b)
- Luna AMA, Moles CLP, Gavaldón RD, Nava VC, Salazar GF. La leptospirosis canina y su problemática en México. *Rev Salud Anim*. 2008; 1:1-11
- Miguel GC. Revisión bibliográfica de la leptospirosis canina, con enfoque a salud pública y generación de un disco compacto temático. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, 2009

- McDonough PL. Leptospirosis in dogs-current status. In: Recent advances in canine infectious diseases, Carmichael L, (Ed). Ithaca NY: International Veterinary Information Service [IVIS]; 2001. Disponible en:  
  
[http://www.ivis.org/advances/Infect\\_Dis\\_Carmichael/mcdonough/ivis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/mcdonough/ivis.pdf)
- Organización Mundial De Sanidad Animal. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Paris, OIE, 2008. Capítulo 2.1.9. Leptospirosis.
- Picardeau Mathieu. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. Nature Reviews Microbiology, volume 15, pages 297–307 2017. doi:10.1038/nrmicro.2017.5
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ. Veterinary microbiology and microbial disease. England: Blackwell Science, 2002
- Ren SX, FuG, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, et al., 2003 Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature, 422: p. 888-893.
- Rivera Flores A, de la Peña Moctezuma A, Roa Riold MdlA, Ordoñez Badillo L. Seroprevalencia de leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México. Veterinaria México. 1999; 30(1)
- Rodríguez Reyes, Ernesto Armando Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspDL, la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, 2007
- Sánchez A, Balluta J, Calderón A, Rodríguez V. Leptospirosis: enfermedad endémica en caninos de áreas rurales en Montería (Cordoba). Orinoquia. 2010.
- Terpstra WJ. International Leptospirosis Society, Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis. Surveillance and control. Malta: World Health Organization and the International Leptospirosis Society, 2003.

## Anexo 1: Protocolo de la Técnica de Aglutinación Microscópica

La batería de cepas de referencia utilizadas para la prueba de aglutinación microscópica (Cuadro 5)

**Cuadro 5.** Cepas de referencia utilizadas para la AM en el CENID-Microbiología INIFAP

Serovariedad	Serogrupo	Cepa de referencia	Genogrupo
<b>bratislava</b>	Australis	Jez-bratislava	Interrogans
<b>canicola</b>	Bataviae	Hond utrecht IV	Interrogans
<b>grippotyphosa</b>	Grippotyphosa	Moskva V	Kirshneri
<b>hardjo</b>	Serjoe	Hardjoprajitno	Interrogans
<b>icterohaemorrhagiae</b>	Icterohaemorrhagiae	RGA	Interrogans
<b>pomona</b>	Pomona	Pomona	Interrogans
<b>pyrogenes</b>	Pyrogenes	Salinem	Interrogans
<b>tarassovi</b>	Tarassovi	Perepelitsin	Borgpetersenii
<b>wolffi</b>	Serjoe	3705	Interrogans
<b>inifap*</b>			
<b>palo alto**</b>			
<b>portlan vere***</b>			

\*Aislada de un quiste folicular bovino corresponde por serología a Hardjo, Hardjoprajitno

\*\* Aislada de un perro corresponde por serología a Icterohaemorrhagiae

\*\*\* Aislada de un cerdo y corresponde a cepa Canicola.

Estas cepas de referencia fueron mantenidas en medio de cultivo líquido de COX (tubos de vidrio con 10 ml de medio) e incubadas en una estufa bacteriológica a una temperatura de 30 °C, por 24 h. Posteriormente los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente y se revisaron a los 4 días para comprobar el crecimiento bacteriano. Se realizaron resiembras cada 21 días en condiciones de esterilidad. Para realizar la resiembra se transfirió un volumen de 0.5 ml del cultivo crecido al medio de cultivo fresco.

Los sueros sometidos a la prueba fueron diluidos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para obtener una dilución 1:25.

Se usaron 2 tubos de ensayo para cada antígeno. En uno se colocó 0.2 ml de suero diluido y en el otro 0.1 del mismo suero y 0.1 ml de PBS. A ambos tubos se les agregó 0.2 ml del antígeno estandarizado. Se obtuvieron diluciones finales del suero de 1:50 y 1:100. Para cada uno de los antígenos de prueba de la batería se incluyó un tubo control con 0.2 ml de PBS y 0.2 ml del antígeno. Los tubos fueron agitados e incubados a temperatura ambiente durante 1 hora para su posterior revisión.

Con un asa bacteriológica se dejó caer sobre un cubreobjetos de vidrio limpio una pequeña gota de cada tubo. Los portaobjetos fueron leídos por microscopia de campo oscuro con el objetivo de poco aumento (10X) y oculares de 10X o 15X sin cubre objetos.

Los grados de aglutinación de cada antígeno en relación con el antígeno control se registraron según la escala 1+ a 4+, o como negativo (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Grados de aglutinación de antígeno

<b>NEGATIVO</b>	<b>=</b>	<b>Sin aglutinación e idéntico al antígeno control</b>
<b>+</b>	<b>=</b>	Aglutinación con 75% de células libres
<b>++</b>	<b>=</b>	Aglutinación con 50% de células libres
<b>+++</b>	<b>=</b>	Aglutinación con 25% de células libres
<b>++++</b>	<b>=</b>	Aglutinación con 0 - 25% de células libre

Todos los sueros que a una dilución 1:100 reaccionaron con aglutinación del 50%(++) o mayor frente a uno o más antígenos, se les realizó nueva titulación. Para estas pruebas se hicieron diluciones dobles de la dilución original del suero de 1:25. En una gradilla se colocaron hileras de 8 tubos para cada antígeno reaccionante, cada uno con 0.2 ml de PBS. Al primer tubo se añadirá 0.2 ml de la dilución del suero 1:25, se mezcló y transfirió 0.2 ml al segundo tubo y se volvió a mezclar. Este procedimiento de división se repitió hasta el último tubo del cual después de mezclar, se descartó 0.2 ml. Una vez agregado el mismo volumen de antígeno, se llegó a diluciones del suero de 1:100 a 1:1600. Se incubaron y leyeron los tubos como ya se describió. Si algún título encontrado era mayor que la dilución más elevada, se repetía el procedimiento efectuando diluciones adicionales al suero.

El título de aglutininas de un suero se expresa como la recíproca de la dilución más alta del suero en cual se haya aglutinado por lo menos el 50% (++) de las células.

Un resultado se considera positivo cuando se detectan AM en diluciones iguales o superiores a 1:100 frente a uno o más de los antígenos leptospirales, sin embargo, solo es una evidencia indicativa de enfermedad anterior o de posibilidad de infección en curso.

Un título único de AM de 1:400 en la presencia de signos e historia clínica, se considera como un diagnóstico positivo a leptospirosis activa.

Para confirmar el diagnóstico se deben comparar dos muestras de suero tomadas con espacio de 15 días. Si existe un aumento de cuatro veces el título de anticuerpos frente a uno o más de los antígenos leptospirales, se presenta una seroconversión, lo que se considera diagnóstico de la infección en curso. Del mismo modo, una conversión del título de menos de 1:50 en 1:100 o mayores, se considera diagnóstico significativo de enfermedad en curso.

## ANEXO 2: Cuestionario para identificar factores de riesgo.

**Cuestionario aplicado a los propietarios para obtener información de sus mascotas sobre aspectos de salud en general y para identificar patrones que pudieran representar un riesgo para la transmisión de la leptospirosis**

Número de establo		Fecha
Nombre del entrevistado		Cargo en el establo
Especie	Sexo	Edad
Raza	Identificación (Nombre y número)	
1. ¿Cuál es el lugar de origen de su mascota?	<input type="checkbox"/> CAIT (No de establo) <input type="checkbox"/> Tizayuca	<input type="checkbox"/> Hidalgo <input type="checkbox"/> Otro estado/país _____
2. ¿Cómo adquirió a su mascota?	<input type="checkbox"/> La compró <input type="checkbox"/> Se la encontró y la adopto/llego sola al establo	<input type="checkbox"/> Se la regalaron <input type="checkbox"/> La adquirió en algún refugio <input type="checkbox"/> Otro _____
3. ¿Realiza algún tipo de acción para mantener la salud de su mascota?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
4. ¿Qué tipo de acción realiza?	<input type="checkbox"/> Vacunación <input type="checkbox"/> Desparasitación	<input type="checkbox"/> Ninguna <input type="checkbox"/> Esterilización
5. ¿Su perro ha recibido alguna vacuna a lo largo de la vida?	<input type="checkbox"/> No nunca <input type="checkbox"/> Si, de pequeño <input type="checkbox"/> Alguna vez pero no recuerda el momento	<input type="checkbox"/> Hace más de un año <input type="checkbox"/> Si, en el último año <input type="checkbox"/> No lo sabe
6. ¿Alguna vez su mascota ha recibido atención veterinaria?	<input type="checkbox"/> No nunca <input type="checkbox"/> Hace más de un año <input type="checkbox"/> Hace un año	<input type="checkbox"/> Hace seis meses <input type="checkbox"/> Hace menos de seis meses <input type="checkbox"/> No sabe
7. ¿Usted o su veterinario han desparasitado a su mascota?	<input type="checkbox"/> No, nunca <input type="checkbox"/> Hace más de un año <input type="checkbox"/> Hace un año	<input type="checkbox"/> Hace seis meses <input type="checkbox"/> Hace menos de seis meses <input type="checkbox"/> No sabe
8. ¿Usted baña a su mascota?	<input type="checkbox"/> No, nunca <input type="checkbox"/> Casi nunca (2-3 veces al año o menos) <input type="checkbox"/> De vez en cuando (4-6 veces al año) <input type="checkbox"/> Frecuentemente (7-9 veces al año) <input type="checkbox"/> Siempre por lo menos una vez al mes	
9. ¿Cómo permanece la mayor parte del tiempo su mascota?	<input type="checkbox"/> Amarrado/ encerrado todo el tiempo <input type="checkbox"/> Amarrado por el día, suelto por las noches <input type="checkbox"/> Suelto todo el tiempo <input type="checkbox"/> Suelto todo el día, amarrado en las noches <input type="checkbox"/> Otro _____	
10. ¿Su mascota puede caminar libremente por el establo?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	

11. ¿A qué áreas del establo puede entrar su mascota?	<input type="checkbox"/> Todo el establo <input type="checkbox"/> Casa/ habitaciones <input type="checkbox"/> Corrales	<input type="checkbox"/> Becerreras <input type="checkbox"/> Almacén de alimentos <input type="checkbox"/> Sala de ordeño
12. ¿Su mascota ingresa a su casa?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
13. ¿Su mascota puede entrar a la sala de ordeño mientras ocurre la ordeña?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
14. ¿Su mascota sale del establo libremente a otros establos?*	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Solo cuando la saca usted.	
15. ¿Qué tan cercana es la convivencia de su mascota con las personas en el establo?	<input type="checkbox"/> Casi nula, está amarrado todo el tiempo	<input type="checkbox"/> Poca <input type="checkbox"/> Muy cercana <input type="checkbox"/> Otra _____
16. ¿Su mascota convive con niños?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
17. ¿Con que animales convive su mascota directamente?	<input type="checkbox"/> No convive con otros animales <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Perros de otros establos / Perros sin dueño (ferales)	<input type="checkbox"/> Gatos <input type="checkbox"/> Gallinas o Gallos <input type="checkbox"/> Conejos <input type="checkbox"/> Otros _____
18. ¿Su mascota tiene un área especial para dormir (cama/albergue)?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
19. ¿Dónde está ubicado?	<input type="checkbox"/> Dentro de la casa <input type="checkbox"/> Cercano a los corrales	<input type="checkbox"/> Cercano a las becerreras <input type="checkbox"/> Otro _____
20. ¿Usted alimenta a su mascota?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
21. ¿Con qué frecuencia alimenta a su mascota?	<input type="checkbox"/> Tienen comida todo el tiempo <input type="checkbox"/> Dos o más veces al día	<input type="checkbox"/> Una vez al día <input type="checkbox"/> Otro
22. ¿Qué tipo de alimento le da a sus mascotas?	<input type="checkbox"/> Croquetas o latas <input type="checkbox"/> Sobras de comida	<input type="checkbox"/> Alimento casero <input type="checkbox"/> Otro _____
23. ¿Alimenta o ha alimentado a su mascota con leche bronca o sin hervir?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
24. ¿En qué etapa de la vida de su mascota esta fue alimentada con leche bronca?	<input type="checkbox"/> Cachorro/ gatito (primer año de vida) <input type="checkbox"/> Durante la gestación	<input type="checkbox"/> Durante la vejez <input type="checkbox"/> Durante toda su vida <input type="checkbox"/> Otra _____
25. ¿Con qué frecuencia le da/daba leche bronca a sus mascotas?	<input type="checkbox"/> Cada vez que se ordeña <input type="checkbox"/> Una vez al día	<input type="checkbox"/> Una vez a la semana <input type="checkbox"/> Ocasionalmente
26. ¿Su mascota tiene plato de agua específico para el?	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	

27. ¿Qué tipo de agua le proporciona a su mascota?	<input type="checkbox"/> De toma directa de agua (Alguna llave) <input type="checkbox"/> De pozo <input type="checkbox"/> No le proporciona agua/La toma de donde la encuentra <input type="checkbox"/> La toma de los bebederos del ganado Otro _____														
28. ¿Ha visto a su mascota tomar agua de alguno de los siguientes lugares con frecuencia?	<input type="checkbox"/> Charcas y asentamientos de agua en botes o frascos <input type="checkbox"/> De los bebederos del ganado Otro _____														
29. ¿Ha notado si su mascota ha presentado recientemente o actualmente presenta alguno de los siguientes signos?	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Depresión</td> <td><input type="checkbox"/> Diarrea</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Pérdida del apetito</td> <td><input type="checkbox"/> Diarrea con sangre</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Pérdida de peso</td> <td><input type="checkbox"/> Distensión del abdomen</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Tos</td> <td><input type="checkbox"/> Mucha sed</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Dificultad para respirar</td> <td><input type="checkbox"/> Orina mucho</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Moco nasal</td> <td><input type="checkbox"/> Orina con sangre</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Otro _____</td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> Depresión	<input type="checkbox"/> Diarrea	<input type="checkbox"/> Pérdida del apetito	<input type="checkbox"/> Diarrea con sangre	<input type="checkbox"/> Pérdida de peso	<input type="checkbox"/> Distensión del abdomen	<input type="checkbox"/> Tos	<input type="checkbox"/> Mucha sed	<input type="checkbox"/> Dificultad para respirar	<input type="checkbox"/> Orina mucho	<input type="checkbox"/> Moco nasal	<input type="checkbox"/> Orina con sangre		<input type="checkbox"/> Otro _____
<input type="checkbox"/> Depresión	<input type="checkbox"/> Diarrea														
<input type="checkbox"/> Pérdida del apetito	<input type="checkbox"/> Diarrea con sangre														
<input type="checkbox"/> Pérdida de peso	<input type="checkbox"/> Distensión del abdomen														
<input type="checkbox"/> Tos	<input type="checkbox"/> Mucha sed														
<input type="checkbox"/> Dificultad para respirar	<input type="checkbox"/> Orina mucho														
<input type="checkbox"/> Moco nasal	<input type="checkbox"/> Orina con sangre														
	<input type="checkbox"/> Otro _____														
30. Considera a su mascota un miembro más de su familia	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No														
31. ¿Ha observado a su mascota consumir restos de otros animales? (placentas, fetos, ratas. etc.)	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No														
<b>OBSERVACIONES</b>															