



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SEROPREVALENCIA DE LEPTOSPIRA EN COMUNIDADES DE
ROEDORES SILVESTRES MEDIANTE LA PRUEBA DE MAT EN
DOS UNIDADES DE MANEJO Y APROVECHAMIENTO DE LA VIDA
SILVESTRE DEL ESTADO DE PUEBLA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

DAVID ANTHOAN JUÁREZ ORTIZ

Asesores:

Biol. M. en C. Fahd Henry Carmona Torres

MVZ. Daniel Atilano López



México, Ciudad de México

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi madre que con esta ardua, sincera e ingrata labor (la de quererme) ha logrado sacar algo bueno de mí.

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos que indirectamente formaron parte del camino que me tiene aquí ahora, y más aún a los que directamente sumaron a mis experiencias (laborales, personales, culturales, deportivas y académicas), ya que soy el resultado de mi interpretación de las mismas.

A la Escuela Preparatoria No. 5 UDG que me abrió el panorama sobre las ciencias médico-biológicas.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ya que mediante ella se ha materializado mi objetivo de convertirme en Médico Veterinario Zootecnista

Agradezco por último a todos los animales que con mi nula experiencia han formado parte de mi aprendizaje y compañía, con lo cual en un futuro espero retribuirles de alguna forma.

“El hombre ha hecho de la tierra un infierno para los animales”.

- Arthur Schopenhauer

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1. ESPECIES DE <i>LEPTOSPIRA</i> CON EJEMPLOS DE SEROGRUPOS, SEROVARIEDADES Y CEPAS	52
FIGURA 1. MAPA DEL MUNICIPIO DE JOLALPAN, PUEBLA (INEGI 21087, 2009).	53
FIGURA 2. MAPA DEL MUNICIPIO DE SAN JERÓNIMO XAYACATLÁN, PUEBLA (INEGI 21127, 2009).	54
FIGURA 3. UBICACIÓN DE LA VENA MAXILAR EN <i>MUS MUSCULUS</i> (BOGDANSKE, 2010).	55
FIGURA 4. PUNCIÓN DE LA VENA MAXILAR EN <i>HETEROMYS IRRORATUS</i> .	55
CUADRO 2. CEPAS DE <i>LEPTOSPIRA</i> UTILIZADAS EN LA PRUEBA DE MAT	56
CUADRO 3. DATOS DE LOS ROEDORES	57
FIGURA 5. RESULTADOS DE SUEROS PROCESADOS.	58
CUADRO 4. RESULTADOS DE MAT	59
FIGURA 6. RESULTADOS DE MAT POR SEROVARIEDAD EN AMBAS COMUNIDADES.	61

RESUMEN

JUÁREZ ORTIZ DAVID ANTHOAN. Seroprevalencia de *Leptospira* en comunidades de roedores silvestres mediante la prueba de MAT en dos unidades de manejo y aprovechamiento de la vida silvestre del estado de Puebla (bajo la dirección de: Biol. M. en C. Fahd Henry Carmona Torres y MVZ. Daniel Atilano López)

Los roedores son el principal hospedero y diseminador de *Leptospira*. En este estudio se evaluó la seroprevalencia de *Leptospira* por la prueba de aglutinación microscópica (MAT por sus siglas en inglés) con suero de roedores silvestres de las Unidades de Manejo y Aprovechamiento de la Vida Silvestre (UMA), "Rancho El Salado", Jolalpan, Puebla y "Centro

Ecoturístico Rancho Yeguas S.C." (CERY), Santo Domingo Tonahuixtla, San Jerónimo Xayacatlán, Puebla, durante el periodo del 5 de agosto del 2014 al 16 de enero del 2015.

Se capturaron 80 roedores por el método del cuadrante con trampas tipo Sherman, de los cuales 39 pudieron ser sujetos de muestreo (51.25%), de estos 20 se capturaron en "Rancho El Salado" (51.28%) y 19 en "CERY" (48.72%). De las muestras de "Rancho El Salado" 16 (80%) aglutinaron para MAT y en "CERY" 15 (78.95%). Los roedores muestreados pertenecen a las especies, *Baiomys taylori* (n=2), *Liomys irroratus* (n=30), *Neotoma mexicana* (n=1), *Peromyscus gratus* (n=1) y *Peromyscus levipes* (n=5). Por serovariedad los resultados fueron los siguientes: 17 (54.84%) para Bataviae, ocho (20.51%) Bratislava, 13 (33.33%) Canicola, 13 (33.33%) Grippytyphosa, tres (7.69%) Hardjo, 10 (24.64%) Icterohaemorrhagie, siete (17.95%) Pomona, cinco (12.82%) Pyrogenes, 14 (35.90%) Wolffi y cuatro (10.26%) Autumnalis. La mayoría de los sueros se titularon en una dilución 1:50 los cuales se consideran que pertenecen a ejemplares que en algún momento estuvieron en contacto con la bacteria y no a animales con la enfermedad activa.

INTRODUCCIÓN

Características generales de la *Leptospira*

Leptospira es una bacteria aerobia estricta, helicoidal, móvil, con una medida de 0.1 μm de ancho por 6 a 20 μm de largo, con la presencia de un gancho en ambos extremos, la cual pertenece a la familia de las Espiroquetaceas (Gasque, 2008). Se han identificado 22 especies del género *Leptospira* y más de 300 serovariedades (Picardeau 2017). Sobrevive en suelos con más de 20% de humedad, agua y suelos con un pH entre 5.5 a 7.6, y temperaturas de 4 a 40°C. Se ha demostrado que la bacteria mantiene su capacidad infecciosa durante 43 días en suelos húmedos y 20 meses en agua dulce (Barragan *et al.*, 2017) aunque sobrevive tan solo 30 minutos en suelos secados por la acción del viento (Gasque, 2008).

Otros factores importantes para la sobrevivencia de la bacteria es su capacidad de tolerar cambios de osmolalidad, su habilidad de motilidad y dispersión. Se ha demostrado que puede llegar a moverse hasta 15 $\mu\text{m/s}$ en matrices viscosas y 5 $\mu\text{m/s}$ en superficies líquidas. En ambientes acuosos la quimiotaxis con la hemoglobina lleva al patógeno a entrar al animal. La relación de *Leptospira* con bacterias del medio como algunas encontradas en el agua dulce promueven la formación de biofilms

(Barragan et al., 2017), que es una colonia estructurada de células bacterianas incrustadas en un matriz polimérica fabricada por ellas mismas y adheridas a la superficie (Jacques et al., 2010), que ayuda a su sobrevivencia. La motilidad favorece evitar condiciones poco favorables para el agente como la exposición directa al sol. A nivel genético se conoce poco sobre los factores que influyen en la sobrevivencia de *Leptospira*, pero se han encontrado diferencias entre serovariedades que afectan el grado de sobrevivencia de estas (Barragan et al., 2017).

La bacteria se puede clasificar en tres grupos por su patogenicidad y relación filogenética (Cuadro 1); 1) las saprófitas consideradas no patógenas en las que hay siete especies *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. biflexa*, *L. vanthielii*, *L. idonii*, *L. terpstrae* y *L. yanagawae*; 2) las patógenas con diez especies, que a su vez se subdividen en 4 grupos, subgrupo I, *L. noguchii*, *L. kirschneri* y *L. interrogans*, subgrupo II, *L. santarosai*, *L. mayottensis*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii* y *L. alexanderi*, subgrupo III, *L. alstonii* y subgrupo IV, *L. kmetyi*; 3) las consideradas como intermedias con cinco especies *L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. broomii* (Guernier et al., 2017).

La leptospirosis puede ser provocada por cualquiera de las 15 especies de *Leptospira* comprendidas en los grupos de las patógenas e intermedias (Picardeau, 2013).

La leptospirosis es considerada una de las zoonosis más importantes (Picardeau, 2013), es una enfermedad de distribución mundial, se ha presentado en aproximadamente 160 especies de mamíferos (Acha y Szyfres, 2001), incluidos los pinnípedos y los murciélagos, así como las aves, los anfibios, los reptiles y posiblemente los peces, pueden portar especies patógenas de *Leptospira* (Picardeau, 2017). En roedores, mapaches, zorros, perros, caballos, borregos, bovinos y cerdos se ha visto que la bacteria se desarrolla de manera asintomática en los túbulos renales (Bauman, 2012).

Patogenia

La transmisión se puede dar de forma directa por una exposición a órganos de animales infectados o su orina, o de manera indirecta mediante el contacto de agua o suelo contaminado (Samir *et al.*, 2015) a través de pequeños cortes o abrasiones cutáneos, o mediante el contacto de mucosas (conjuntival, nasal o bucal) (Murray *et al.*, 2014). La enfermedad aguda y la colonización crónica representan los polos opuestos de una

amplia gama de presentaciones de la enfermedad (Ko *et al.*, 2009).

Al entrar la bacteria, rápidamente se establece una infección sistémica al atravesar las barreras tisulares y por diseminación hematógena. Las leptospiras parecen residir solo transitoriamente dentro de las células cuando atraviesan las monocapas celulares. Se han observado leptospiras internadas en citoplasma, y compartimentos fagosómicos de células normalmente no fagocíticas, lo cual sugiere un mecanismo de la bacteria para propagarse a los órganos diana (hígado, pulmón y riñón). Las leptospiras se pueden aislar del torrente sanguíneo unos minutos después de la inoculación y se detectan en múltiples órganos al tercer día después de la infección, pueden alcanzar 10^6 - 10^7 bacterias por mililitro de sangre o por gramo de tejido de los animales infectados (Ko *et al.*, 2009).

Factores de virulencia

Los factores de virulencia de la bacteria son principalmente proteínas de superficie. El genoma contiene aproximadamente 125 genes que codifican para lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la matriz extracelular y proteínas de membrana externa. Se han identificado nueve genes que codifican a hemolisinas que incluyen una proteína formadora de poros y esfingomielinasas

en *L. interrogans* ausentes en las especies saprofitas, además *L. interrogans* produce una colagenasa. Se han encontrado de manera experimental aproximadamente 12 proteínas de membrana entre las que se encuentran, OmpL1, LipL32, LigB, LenA, LenD y Loa22 (Ko *et al.*, 2009).

La expresión de Loa22 no se ha detectado en las especies no patógenas de *Leptospira*. Se ha demostrado que Loa22 influye en la inflamación y citotoxicidad de las células epiteliales del túbulo renal, lo cual juega un papel importante en la presentación renal de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2010).

LipL32 representa el 75% del proteoma de la membrana externa (Ko *et al.*, 2009). Este antígeno tiene una alta capacidad inmunogénica ya que es el blanco principal de la respuesta inmune tanto en animales como en el hombre y ha sido la proteína más estudiada de la *Leptospira* (Zhang *et al.*, 2005)

Las proteínas Lig son componentes de la superficie y se ha demostrado que se unen a elementos de la matriz extracelular como fibronectina, elastina, tropoelastina, laminina y colágenos I, III y IV (Evangelista *et al.*, 2017), por lo que se considera que las proteínas Lig son factores de virulencia, ya que influyen en las interacciones entre patógenos y células, como la invasión y la unión de células con otras bacterias. Sin embargo, una mutación LigB en *L. interrogans*, no afecta la

capacidad de la bacteria para causar leptospirosis aguda en hámsteres o colonización renal persistente en ratas (Ko *et al.*, 2009).

La motilidad a pesar de ser común a las especies saprófitas puede considerarse un factor de virulencia. Las leptospiras patogénicas recién aisladas tienen mayor movilidad de traslación y helicoidal que las cepas cultivadas *in vitro* (Ko *et al.*, 2009). Cepas de *Leptospira* patógenas con una mutación que elimina la motilidad no son capaces de translocarse a través de monocapas celulares o la membrana conjuntival, con lo que se establece que la motilidad es esencial para la patogénesis de la leptospirosis (Wunder *et al.*, 2018)

A diferencia de las cepas saprófitas, *L. interrogans* muestra una quimiotaxis positiva hacia la hemoglobina. La adquisición de hierro es importante para la virulencia en muchos patógenos bacterianos, y *Leptospira* contiene varios sistemas de absorción de hierro como una hemo oxigenasa, codificada por el gen *hemO*, que degrada el anillo de tetrapirrol de la molécula de hemo liberando hierro ferroso (Ko *et al.*, 2009). Se ha demostrado que tanto las cepas patógenas como las saprofitas necesitan medios suplementados con hierro para crecer. Cepas con una mutación en el gen *hemO* no crecieron en medios enriquecidos con hemoglobina de conejo, lo que sugiere que la

hemo oxigenasa influye en la adquisición de hierro durante la leptospirosis (Herman et al., 2016).

Hay que tomar en cuenta que la osmolaridad y la temperatura, son factores importantes para regular la expresión de proteínas que intervienen en la infección de huéspedes mamíferos (Ko et al., 2009).

Inmunidad.

Se considera a la respuesta humoral como el principal mecanismo de inmunidad contra la Leptospirosis. El lipopolisacárido (LPS) es el objetivo principal de la respuesta humoral. Aun no se sabe si la respuesta de anticuerpos contra antígenos de leptospiras diferentes a LPS confieran protección (Ko et al., 2009).

Estudios recientes han confirmado que la inmunidad a la leptospirosis no se limita a la respuesta humoral, como en los ratones que requieren la activación de TLR2 Y TLR4 para el control de infecciones letales (Ko et al., 2009).

Las especies de *Leptospira* clasificadas como saprofitas son susceptibles al sistema del complemento (Rodrigues et al., 2016) que es un mecanismo de defensa del sistema inmune innato basado en la cascada proteolítica humoral (Degn y Thiel, 2013),

con las especies consideradas intermedias no se tiene clara aun su respuesta frente al complemento, las leptospiras patógenas han desarrollado formas de como evadir la respuesta del complemento como; 1) Obtención de reguladores del complemento, como el Factor H, C4BP y vitronectina, elementos involucrados en alguna de las tres vías de activación del complemento; 2) Obtención de proteasa del huésped, ya que la *Leptospira* es capaz de unirse al plasminógeno que en presencia de activadores como uPA se convierte en plasmina la cual promueve una disminución de la activación del complemento; y 3) Inactivación directa de proteínas del complemento por proteasas de la *Leptospira*, como metaloproteasas capaces de separar e inactivar proteínas como C3, Facto B, C2 y C4 (Rodrigues *et al.*, 2016).

La leptospirosis provoca la producción de auto-anticuerpos, como anticuerpos específicos de cardiolipina, varios artículos sugieren que tal mecanismo autoinmune puede relacionarse con el desarrollo de uveítis y el síndrome de hemorragia pulmonar asociado a leptospirosis (Ko *et al.*, 2009).

Leptospirosis.

El desarrollo de leptospirosis y la progresión de la enfermedad están influenciados por los factores de susceptibilidad del

huésped, la dosis del inóculo infectante y las características de virulencia de la cepa infectante. Ciertas especies de *Leptospira* y serovariedades causan enfermedades más graves que otras (Ko *et al.*, 2009).

Varias especies de roedores y animales silvestres están adaptados a la bacteria y pueden no llegar a manifestar signos o lesiones (Acha y Szyfres, 2001). La enfermedad en animales silvestres produce cuadros clínicos similares a los descritos en las especies domesticas como bajos índices de fertilidad, nacimiento de crías débiles, abortos e incluso trastornos oculares (Romero *et al.*, 2011).

En ratas, la bacteria causa una infección sistémica, pero posteriormente se elimina de todos los órganos, excepto los túbulos renales (sitio inmuno-privilegiado) donde las leptospiras se agregan en una estructura tipo biofilm. Las ratas excretan leptospiras en altas concentraciones durante nueve meses después de la infección (Ko *et al.*, 2009), dentro de los roedores el hámster representan el polo opuesto ya que al ser inoculados con alguna de las serovariedades patógenas desarrollan una infección fulminante, que representa la forma grave de la enfermedad en el hombre, esta respuesta se cree

que es resultado del medio desértico de donde proviene el hámster (Solecki *et al.*, 2017).

En el hombre el período de incubación para la leptospirosis es de 5-14 días en promedio, con un rango de 2-30 días. En los humanos, la leptospirosis causa una enfermedad febril en su fase inicial. En la mayoría de los pacientes, la enfermedad se resuelve después de la primera semana de síntomas. Sin embargo, un 5 a 15% de los pacientes desarrollan manifestaciones graves. Las manifestaciones graves de fase tardía generalmente ocurren de 4 a 6 días después del inicio de la enfermedad. La enfermedad de Weil es la presentación clásica de la leptospirosis grave y se caracteriza por ictericia, insuficiencia renal aguda y hemorragia. Existe una forma emergente de enfermedad grave, el síndrome de hemorragia pulmonar asociado a leptospirosis, para la cual la tasa de letalidad es más del 50%. El daño endotelial vascular es una característica de la leptospirosis grave, y causa filtración capilar, hemorragia y vasculitis. La leptospirosis activa la cascada de la coagulación, y causa coagulación intravascular diseminada en hasta 50% de los pacientes con manifestaciones graves. Las respuestas adquiridas mediadas por células pueden promover la inflamación, además de la estimulación de la inflamación por las respuestas humorales innatas y adquiridas. La bacteria puede inducir una forma peculiar de hipopotasemia, no oligúrica, de insuficiencia

renal aguda que se caracteriza por una reabsorción tubular de sodio. Las manifestaciones renales de la infección pueden ser el resultado directo de una nefritis tubulointersticial focal. Las leptospiras pueden inducir apoptosis en macrófagos y hepatocitos (Ko *et al.*, 2009).

Los bovinos son considerados el principal reservorio de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hradjo, y puede ser reservorio también de cepas de especies como *L. kirschneri* y *L. interrogans*. La leptospirosis es la principal causa de problemas reproductivos en el ganado bovino, provocando el nacimiento de crías débiles o muertas, tasas de crecimiento reducidas y disminución en la producción láctea lo que produce pérdidas económicas. Algunos bovinos pueden desarrollar la enfermedad de manera crónica, lo que los convierte en diseminadores de la bacteria, mediante eliminaciones intermitentes de la misma por la orina (Welder *et al.*, 2016).

Los cerdos pueden ser hospedadores de algunas cepas de *Leptospira* en particular de Pomona, Tarassovi y Bratislava. La serovariedad Pomona es la más común aislada en cerdos, la cual provoca abortos, mortinatos, disminución en la ganancia de peso, los animales jóvenes que presentan la enfermedad pueden llegar a morir, mientras que los adultos suelen ser portadores asintomáticos. Se han reportado casos de la enfermedad causada por la serovariedad Canicola en donde hay un largo periodo de

eliminación con la capacidad de sobrevivir hasta seis días en la orina sin diluir (Bertelloni et al 2018).

Los caballos son considerados huéspedes incidentales de la bacteria. Diferentes estudios han demostrado que los caballos son seropositivos a diferentes serovariedades de *Leptospira* dependiendo su ubicación geográfica, siendo *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Pomona, Ballum y Grippotyphosa las más comunes (Tsegay et al., 2016). La enfermedad en caballos se presenta con fiebre leve, pérdida de apetito, letargo, ictericia, hemorragia en mucosas, placentitis, abortos, mortinatos, crías débiles y depresión. La insuficiencia renal es más común en los potros en comparación con los caballos viejos. La leptospirosis clásica icterica ocurre principalmente en potros y es comparativamente rara en caballos adultos. La hemorragia pulmonar se presenta raramente en casos de leptospirosis en equinos. Una de las consecuencias más importantes de la leptospirosis en caballos es la uveítis recurrente equina (Khurana et al., 2016).

La Leptospirosis en pequeños rumiantes produce fiebre, anorexia, hemoglobinuria, anemia, abortos, mortinatos y el nacimiento de animales débiles (Acha y Szyfres, 2001).

La leptospirosis en perros puede ser causada principalmente por alguna de las cepas de las especies de *L. interrogans* y *L. kirschneri*. El perro puede fungir como reservorio de *L. interrogans* serovariedad Canicola (Miotto *et al.*, 2018). En perros la presentación más grave de la enfermedad es la considerada hemorrágica que inicia con fiebres repentinas durante tres a cuatro días, seguidos por rigidez y mialgias en miembros pélvicos, y hemorragias en cavidad oral con tendencia a la necrosis y faringitis, después se puede presentar una gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda. La letalidad en perros se estima en un 10% (Acha y Szyfres, 2001).

La infección de manera experimental en gatos ha generado leptospiremia y una enfermedad leve con evidencia histológica de inflamación renal y hepática. El signo más común en animales con leptospirosis es una nefritis intersticial. Se ha asociado la presencia de anticuerpos de *Leptospira* con poliuria, polidipsia, ascitis, hepatomegalia y función hepática alterada (Hartmann *et al.*, 2013).

Diagnóstico.

Actualmente existen varias pruebas de diagnóstico para la leptospirosis, las cuales pueden dividirse de la siguiente

manera: Métodos que demuestran la presencia de la bacteria mediante cultivo; métodos genómicos; y métodos inmunológicos (OIE, 2014).

El aislamiento de leptospiras es uno de los métodos más específicos de demostración de su presencia, siempre que no haya residuos de antibióticos, que no haya autólisis avanzada del tejido, que los tejidos se manejen con rapidez para realizar cultivos después de su colecta, en el caso de la orina, que tenga un pH entre 5.5 a 7.6 (OIE, 2014).

La presencia de leptospiras se puede poner de manifiesto mediante una serie de técnicas de tinción inmunoquímicas, por ejemplo, la inmunofluorescencia y diversas técnicas inmunohistoquímicas. Estas técnicas son útiles para diagnosticar la infección en muestras que son inadecuadas para la realización de cultivos o donde se requiere un diagnóstico rápido. Puesto que el éxito de estas técnicas depende del número de microorganismos presentes, son menos apropiadas para diagnosticar el estado de portador crónico, donde el número de microorganismos puede ser muy bajo o localizado (OIE, 2014).

Las pruebas genómicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplean cada vez más para detectar leptospiras en tejidos y líquidos corporales de animales debido a la sensibilidad percibida y a la capacidad de dar un

diagnóstico temprano. La prueba se clasifica en dos posibles grupos en función de si se detectan los genes que están siempre presentes o genes restringidos a especies patógenas de *Leptospira*. Estas pruebas no identifican el serotipo infectante, aunque algunos grupos de cebadores pueden permitir un mayor grado de identificación, a nivel de especie o de cepa. Esta prueba no es un método de diagnóstico de rutina. Muchos de los conjuntos de cebadores de la PCR se han diseñado y evaluado para ser utilizados en muestras humanas y no animales. La validación sigue siendo uno de los problemas por resolver en cuanto al uso de la PCR en el diagnóstico de la leptospirosis animal, y cada laboratorio es responsable de la validación de la prueba concreta que utilice para el tejido, líquido y especie analizados. La presencia en las muestras clínicas de inhibidores de la amplificación puede originar falsos negativos, especialmente en muestras de animales alteradas por la contaminación con heces o autólisis (OIE, 2014).

Las pruebas serológicas constituyen el procedimiento de laboratorio utilizado con más frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico, para determinar la prevalencia en un grupo y para realizar los estudios epidemiológicos. Los anticuerpos de las leptospiras se producen a los pocos días del comienzo de la enfermedad y persisten durante semanas o meses y, en algunos casos, años. Los títulos de anticuerpos puede que

desciendan hasta niveles indetectables mientras los animales permanecen infectados crónicamente. Para superar este problema, se necesitan métodos sensibles que detecten el microorganismo en la orina o en el tracto genital de portadores crónicos. Se ha descrito una amplia variedad de pruebas serológicas que muestran grados variables de especificidad de serogrupo y de serotipo, como la ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y la prueba de la aglutinación microscópica (MAT) (OIE, 2014).

Los ELISA para la detección de anticuerpos antileptospira se han elaborado empleando una serie de preparaciones antigénicas diferentes, protocolos de ensayo y programas de ensayo que incluyen pruebas en placa y pruebas con tiras reactivas. Los ELISA basados en proteína de membrana externa (OMP) recombinantes son ampliamente reactivos frente a anticuerpos contra todas las leptospiras patógenas y por lo tanto no tienen valor en los estudios epidemiológicos. Por el contrario, los ELISA basados en antígenos LPS son específicos de serogrupo y sí tienen utilidad en los estudios epidemiológicos y los planes de control. Se ha observado que los ELISA que funcionan con IgM son útiles en el diagnóstico de la infección aguda. Un ELISA que funcione con todas las Ig es útil para identificar

animales totalmente susceptibles, que serán adecuados para las pruebas de exposición experimental (OIE, 2014).

Entre los métodos inmunológicos la prueba de micro aglutinación (MAT) es la prueba de referencia serológica, mediante la cual se evalúan las demás pruebas serológicas. Se puede mejorar la sensibilidad de la prueba utilizando aislamientos locales en vez de cepas de referencia, pero las cepas de referencia ayudan en la interpretación de los resultados entre los laboratorios. La especificidad de la MAT es buena; normalmente los anticuerpos frente a otras bacterias no dan reacción cruzada con *Leptospira* de manera significativa. Sin embargo, existen reacciones serológicas cruzadas significativas entre serotipos y serogrupos de *Leptospira* y es probable que un animal infectado con un serotipo tenga anticuerpos frente al serotipo infectante que dé una reacción cruzada con otros serotipos en la MAT. Debido al tiempo en que tardan en producirse los anticuerpos la prueba puede resultar negativa en la fase inicial de la enfermedad (OIE, 2014).

La prueba se define como: diluciones en serie del suero sospechoso, con un volumen igual de una suspensión de cultivo vivo de *Leptospira*, a una cierta temperatura, durante un período de tiempo determinado y se lee mediante el microscopio de campo obscuro estimando el 50% de aglutinación de la mezcla como el título de punto final de la reacción (OIE, 2014).

El principal reto para MAT es determinar el título a partir del cual se considerará positiva la prueba, ya que elementos como el tipo de serovariedades usadas para la prueba, vacunación previa, ubicación geográfica y condiciones climatológicas entre otras pueden influir en la titulación debido a la exposición del agente. Existen estudios en roedores en los cuales a partir de un título 1:20 son considerados positivos. Es importante tener presente que títulos bajos (menores a 1:100) pueden ser considerados positivos con fines meramente epidemiológicos (Aznida *et al.*, 2018). La Organización Mundial de la Salud ha establecido para fines diagnósticos de la enfermedad activa, un título igual o mayor a 1:400 y 1:100 donde la enfermedad no se considere endémica, títulos menos a 1:400 hasta 1:100 en zonas endémicas pueden ser considerados individuos con una presentación crónica de la enfermedad (WHO, 2010).

Epidemiología.

Los roedores son los principales reservorios de las leptospiras patógenas y el principal responsable de su transmisión a los seres humanos. Los brotes de leptospirosis se han asociado con la infestación de roedores, inundaciones y actividades

ocupacionales como veterinarios, granjeros y trabajadores de rastros (Fortes *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en Angola, donde se pudieron identificar mediante pruebas fenotípicas, serológicas y genéticas seis especies de *Leptospira* de muestras obtenidas de los roedores más abundantes de la región, arrojó que son la fuente primaria de transmisión de la leptospirosis entre la población humana de la zona (Fortes *et al.*, 2016).

Un estudio realizado en 2013 al sur de Tanzania atribuyó la seropositividad de los serogrupos de *Leptospira* *Icterohemorrhagiae* y *Grippotyphosa* en humanos a la abundante población de roedores en la zona (Assenga *et al.*, 2015).

En una investigación realizada en Croacia donde se tomaron muestras de roedores y se analizaron para las principales zoonosis que estos transmiten, se encontró que *Leptospira* fue el agente más frecuentemente detectado (Tadin *et al.*, 2016).

En estudios realizados en el periodo de 2003-2014 se ha visto que la seroprevalencia de *Leptospira* en ratas domésticas fue de 11.1% en Vancouver, Canadá; de 16% en Tokio, Japón; de 48% en Santa Fe, Argentina; de 65.3% en Baltimore, EUA; y del 63% al 83% en El Salvador, Brasil (Costa *et al.*, 2015).

En cuanto a la situación nacional un estudio publicado el 2002 donde se analizaron mediante la prueba de MAT 4,043 sueros

bovinos de distintas regiones de México indicó un 31.1% de seroprevalencia a *Leptospira*, resultado cercano al obtenido en un estudio similar en 1991 donde con 4,413 sueros bovinos analizados de diferentes regiones de México se obtuvo 34% de seroprevalencia (Cervantes et al., 2002).

La situación epidemiológica de Leptospirosis humana en México en el 2000 presentaba una tasa nacional de 0.65 y al 2010 0.45 casos por cada 100,000 habitantes, manteniéndose constante durante los últimos 10 años (Zuñiga y Caro, 2013)

En México en el periodo 2000-2010 se observó que los estados con la mayor tasa de casos seropositivos fueron: Campeche, Yucatán, Sonora, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz, Sinaloa, Tabasco, y Veracruz, pero con excepción de Zacatecas, todos los estados del país cuentan con más de un caso reportado. Se considera que existe un mayor riesgo de presentar leptospirosis en la región del trópico húmedo que en el resto de las regiones ecológicas del país. Se observó que la mayoría de los casos confirmados se presentaron en los meses que comprenden la temporada de huracanes en nuestro país, tanto para el Atlántico como para el Pacífico. Los serovares más aislados en México fueron: *L. bratislava*, *L. autumnalis*, *L. canicola*, *L. ballum*, *L. hardjo*, y *L. pomona*. Un alto porcentaje de las muestras fueron positivas para más de un serovar (CoNaVe, 2012). Diversos estudios han determinado que los animales silvestres

pueden fungir como reservorios, portadores, hospederos de mantenimiento y hospederos accidentales, dependiendo las características propias de la especie, condiciones ambientales y susceptibilidad del ejemplar (Romero *et al.*, 2011).

Las serovariedades que circulan en seres humanos o animales dependen estrechamente de los reservorios presentes, las tasas más altas de infección con serovares distintas se reportan en áreas con elevado número de roedores y cuanto más numerosa es la población de reservorios más frecuente es la transmisión inter e intraespecífica (Torres-Castro *et al.*, 2016).

HIPÓTESIS

Los roedores silvestres de las Unidades de Manejo y Aprovechamiento de la Vida Silvestre (UMA), "Rancho El Salado", Jolalpan Puebla y "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S.C.", Santo Domingo Tonahuixtla, San Jerónimo Xayacatlán, Puebla presentan anticuerpos séricos contra algunas serovariedades de *Leptospira* identificados mediante MAT.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la seroprevalencia de *Leptospira* con la prueba de aglutinación microscópica, en poblaciones de roedores silvestres de las UMAs, "Rancho El Salado" y "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S.C.", para generar un registro de evidencia de la seroprevalencia en estos lugares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Captura, identificación y registro de roedores silvestres.
2. Toma y manejo de muestra sanguínea de roedores silvestres.
3. Identificación de la presencia de anticuerpos contra diferentes serovariedades de *Leptospira* de las muestras tomadas mediante MAT.
4. Comparación de las serovariedades presentes (en caso de encontrarlas) entre las comunidades "Rancho El Salado" y "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S.C."

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio y sitio de muestreo

El estudio se realizó en las UMAs, "Rancho El Salado", Jolalpan, Puebla y "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S.C.", Santo Domingo Tonahuixtla, San Jerónimo Xayacatlán, Puebla.

El municipio de Jolalpan se ubica entre los paralelos 18° 10' y 18° 26' de latitud norte; los meridianos 98° 45' y 99° 04' de longitud oeste; altitud entre 700 y 1,700 m.snm. Colinda al norte con el estado de Guerrero y el municipio de Teotlalco; al este con los municipios de Teotlalco, Huehuetlán el Chico, Chiautla, Cohetzala, Huehuetlán el Chico, Chiautla y Cohetzala; al sur con el municipio de Cohetzala y el estado de Guerrero; al oeste con el estado de Guerrero (Figura 1). Cuenta con 64 localidades y una población total de 11,771 habitantes. El rango de temperatura es de 22-28°C, el rango de precipitación 800-1,000 mm y el clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano (INEGI 21087, 2009).

Región hidrológica, Balsas (100%); Cuenca, R. Grande de Amacuzac (57%) y R. Atoyac (43%); Subcuenca R. Bajo Amacuzac (57%) y R. Nexapa (43%); Corrientes de agua Perennes: Amacuzac y Nexapa, Intermitentes: Ajuchitlán, Atlameya y Ziniquihuil; Cuerpos de agua, Perenne: Presa Huachinantla (0.5%).

Vegetación, Selva (55%), pastizal (12%), palmar (6%) y bosque (5%) (INEGI 21087, 2009).

El municipio de San Jerónimo Xayacatlán se ubica entre los paralelos $18^{\circ} 07'$ y $18^{\circ} 17'$ de latitud norte; los meridianos $97^{\circ} 50'$ y $98^{\circ} 00'$ de longitud oeste; altitud entre 1,200 y 2,000 m.snm. Colinda al norte con los municipios de Xayacatlán de Bravo y Toltepec de Guerrero; al este con el municipio de Toltepec de Guerrero y el estado de Oaxaca; al sur con los municipios de Petlalcingo y Acatlán; al oeste con los municipios de Acatlán y Xayacatlán de Bravo (Figura 2). Cuenta con 19 localidades y una población total de 3,843 habitantes. El rango de temperatura es de $20-24^{\circ}\text{C}$, el rango de precipitación es de 900-1,000 mm y el clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano (59%) y semicálido subhúmedo con lluvias en verano (41%) (INEGI 21127, 2009).

Región hidrológica, Balsas (100%); Cuenca, R. Atoyac (100%); Subcuenca, R. Acatlán (100%); Corrientes de agua, Intermitentes: La Trompeta, Tizácc y Valiente. Vegetación Pastizal (62%), selva (21%) y área sin vegetación (2%) (INEGI 21127, 2009).

Los sitios de muestreo se ubicaron en: La UMA "Rancho El Salado" que se ubica en lo paralelos $18^{\circ}20'07.6''$ latitud norte y $98^{\circ}57'31.8''$ longitud oeste a 950 m.snm., y; La UMA "Centro

Ecoturístico Rancho Yeguas S. C.” dentro de la comunidad de Santo Domingo Tonahuixtla que se ubica en los paralelos $18^{\circ}08'24''$ latitud norte y $97^{\circ}52'58.1''$ longitud oeste a 1,489 m.snm. (Barrientos, 2012).

Captura de roedores silvestres

El muestreo se realizó durante el periodo del 5 de agosto del 2014 al 16 de enero del 2015, dividido en once semanas intercalando los lugares de muestreo.

Los roedores se capturaron con trampas tipo Sherman cebadas con crema de cacahuete, plátano, avena y esencia de vainilla.

Los lugares de muestreo se establecieron aleatoriamente, tomando en cuenta únicamente que no se mantuvieran cercanos a asentamientos humanos, tierras de cultivo o caminos. Una vez escogido el lugar con la ayuda de un GPS se obtenían los datos de latitud, longitud, altitud y se hacía una breve descripción del lugar. Se colocaron 50 trampas mediante el método de cuadrante dejando 10 metros de distancia entre las trampas (González, 2004).

Los puntos del cuadrante donde se pusieron las trampas se marcaron con una cinta fluorescente para su fácil ubicación en posteriores visitas.

El cebo de las trampas se preparaba en la noche y antes de cebar las trampas se agregaba la esencia de vainilla. Las trampas se ponían en la noche, verificando antes de colocarlas, el correcto funcionamiento del mecanismo, después de lo cual se ponía el cebo y eran puestas en el suelo en su marca, procurando ponerlas cerca de algún árbol, arbusto o piedra, aquellas que quedaban sin protección se cubrían con hojarasca.

La revisión de las trampas se realizó a la mañana siguiente de su colocación. Todas aquellas trampas que estaban abiertas con cebo se marcaban AC, las abiertas sin cebo como AS, las trampas cerradas eran marcadas con la referencia del punto al que pertenecían, se llevaban a un punto en común donde se revisaban, aquellas que estaban cerradas y sin captura se marcaban como CS y aquellas que estaban cerradas con captura como CC.

Los roedores capturados se colocaban en bolsas de plástico protegidos del rayo del sol. A todos los ejemplares capturados se les determinaba el sexo, madurez, peso y las siguientes medidas: oreja, tibia, pata trasera, longitud cuerpo (LHC), longitud cola (LC) y longitud total (LT), a cada ejemplar capturado se le asignaba un número de catálogo para anotar sus datos. Después de lo anterior se les colocaba una marca con plumón de aceite en la base de la cola para su identificación en posibles recapturas. El número de catálogo se componía de

las letras SAMA (para los ejemplares capturados en "Rancho El Salado") o TOMA (para los ejemplares capturados en "CERY") seguido de un guion, después el número quince seguido de otro guion y el número a dos dígitos al que correspondía la captura (este último número comprende a todos los mamíferos capturados en el 2015 en cada UMA).

La determinación de la especie se realizó tomando en cuenta las características anatómicas de los roedores, así como la ubicación geográfica y la ayuda del M. en C. Fahd Henry Carmona Torres.

Obtención de muestra de roedores silvestres

Fueron muestreados únicamente aquellos ejemplares que pesaban al menos 25 gramos para obtener al menos 0.3 ml de sangre. Las muestras se tomaron por goteo mediante la punción de la vena maxilar (Figura 3 y 4). Para lo anterior se utilizaron lancetas de 5.5 mm y tubos Eppendorf® de 1.5 ml (Bogdanske, 2010).

Las muestras recolectadas se mantuvieron en una hielera con bolsas con gel refrigerante congeladas durante la colecta, en el campamento los trabajadores de las UMAs las mantenían en un refrigerador hasta el último día de colecta, de regreso se mantenían en la hielera con los refrigerantes, y en

refrigeración ya en la ciudad, hasta la entrega en el Laboratorio de Diagnóstico de *Leptospira* FMVZ UNAM.

Prueba de aglutinación microscópica (MAT)

Para la determinación de presencia de anticuerpos en suero se realizó la prueba de MAT en el Laboratorio de Diagnóstico de *Leptospira* FMVZ UNAM.

Para la prueba se usaron 12 cepas de *Leptospira*, las cuales son (Cuadro 2):

1. *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.
2. *L. interrogans* serogrupo Bataviae serovariedad Bataivae cepa Van Tienen.
3. *L. interrogans* serogrupo Australis serovariedad Bratislava cepa Jez Bratislava.
4. *L. interrogans* serogrupo Canicola serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV.
5. *L. interrogans* serogrupo Pomona serovariedad Pomona cepa Pomona.
6. *L. interrogans* serogrupo Sejroe serovariedad Hardjo cepa Hardjoprajitno.

7. *L. interrogans* serogrupo Sejroe serovariedad Wolffi cepa 3705.
8. *L. interrogans* serogrupo Pyrogenes serovariedad Pyrogenes cepa Salinem.
9. *L. interrogans* serogrupo Autumnalis serovariedad Autumnalis cepa Akiyami A.
10. *L. kirschneri* serogrupo Grippytyphosa serovariedad Grippytyphosa cepa Moskva V.
11. *L. borgpetersenii* serogrupo Tarassovi serovariedad Tarassovi cepa Perepelitsin.
12. *L. weilii* serogrupo Celledoni serovariedad Celledoni cepa Celledoni.

Descripción de la prueba

Se utilizó una suspensión de cultivo puro de cada serovariedad de 7 días, con una densidad aproximada de 1.5 a 2×10^8 leptospiras / ml.

1. Se realizaron diluciones dobles seriadas a partir de 1:25 con solución salina.

2. Se colocaron 50 μ l de las diluciones de los sueros con la misma cantidad de volumen de los antígenos de cada serovariedad en placas con 96 pozos de fondo plano y un control con solución

salina, obteniendo las siguientes diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600 (que indica cada dilución).

3. Se incubaron durante dos horas en estufa bacteriológica a una temperatura de 30°C.

4. Al finalizar el periodo de incubación se observaron las placas en un microscopio de campo oscuro.

5. La interpretación de la prueba se realizó estableciendo un número según el grado de aglutinación como se muestra a continuación:

0 Negativo, sin aglutinación, 100% de leptospiras libres.

1+ 25% de aglutinación, 75% de leptospiras libres.

2+ 50% de aglutinación, 50% de leptospiras libres.

3+ 75% de aglutinación, 25% de leptospiras libres.

4+ 100% de aglutinación, 0% de leptospiras libres.

El título del anticuerpo se determinó en la máxima dilución del suero en donde al menos 50% de las leptospiras se encontrarán aglutinadas y 50% libres (2+).

Se consideraron positivos los sueros con títulos iguales o mayores a 1:50. En las muestras donde el suero no fue suficiente para correr todas las serovariedades se corrieron únicamente las que fueron teniendo más resultados positivos.

RESULTADOS

Se capturaron 80 roedores en el transcurso del muestreo entre las dos unidades de manejo, de los cuales 39 cumplieron las condiciones necesarias para ser sujetos de muestreo (51.25%) (Cuadro 3). De los animales muestreados 20 se capturaron en "Rancho El Salado" (51.28%) y 19 en el "CERY" (48.72%). Las especies de roedores capturados y muestreados son: *Baiomys taylori* (n=2); *Heteromys Liomys irroratus* (n=30); *Neotoma mexicana* (n=1); *Peromyscus gratus* (n=1) y; *Peromyscus levipes* (n=5) (Cuadro 3).

Del total de sueros procesados ocho (20.51%) no presentaron anticuerpos hacia ninguna serovariedad de la prueba, siete (17.95%) reaccionaron a una serovariedad y 24 (61.54%) a más de una serovariedad de la prueba (Figura 5).

La seroprevalencia de la bacteria en "Rancho El Salado" fue de 80% y en el "CERY" fue de 78.95%.

En cuanto a los resultados por serovariedad, ningún suero en ambas UMAs aglutinó para las serovariedades Tarassovi y Celledoni. De los animales positivos, 17 (54.84%) aglutinaron para la serovariedad Bataviae con títulos de 1:50 y 1:100, ocho (20.51%) para Bratislava con títulos de 1:50 y 1:100, 13

(33.33%) para Canicola con títulos de 1:50, 1:100, 1:200 y 1:800, 13 (33.33%) para Grippytyphosa con títulos de 1:50, 1:100 y 1:400, tres (7.69%) para Hardjo con títulos de 1:50 y 1:100, 10 (24.64%) para Icterohaemorrhagie con títulos de 1:50, siete (17.95%) para Pomona con títulos de 1:50 y 1:100, cinco (12.82%) para Pyrogenes con títulos de 1:50 y 1:100, 14 (35.90%) para Wolffi con títulos 1:50 y 1:100, y cuatro (10.26%) para Autumnalis con títulos de 1:50 y 1:100 (Cuadro 4).

En "Rancho El Salado" se muestrearon 20 roedores, de los cuales 16 (80%) aglutinaron para alguna serovariedad de la prueba. De los sueros positivos, 11 (68.75%) aglutinaron para la serovariedad Bataviae con títulos de 1:50 y 1:100, dos (12.5%) para Bratislava con títulos de 1:50, siete (43.75%) para Canicola y Wollffi con títulos de 1:50, 1:100 y 1:800 para Canicola y, de 1:50 y 100 para Wolffi, ocho (50%) para Grippytyphosa con títulos de 1:50 y 1:100, uno (6.25%) para Hardjo a un título de 1:50, cuatro (25%) para Icterohaemorrhagie con títulos de 1:50, cinco (31.25%) para Pomona con títulos de 1:50 y 1:100, y tres (18.75%) para Pyrogenes y Autumnalis con títulos de 1:50 y 1:100 (Cuadro 5).

De los 19 ejemplares muestreados en el "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S. C.", 15 (78.95%) reaccionaron al menos a una serovariedad de la bacteria. De los sueros positivos seis (32.58%) aglutinaron para la serovariedad Bataviae, Bratislava, Canicola e Icterohaemorrhagie, con títulos de 1:50 y 1:100 para Batavie y Bratislava, 1:50, 1:200 y 1:800 para Canicola y 1:50 para Icterohaemorrhagie, cinco sueros (26.32%) aglutinaron para Grippotyphosa con títulos de 1:50, y 1:400, dos (10.53%) para Hardjo, Pomona y Pyrogenes con títulos de 1:50 y 1:100 para Hardjo y 1:50 para Pomona y Pyrogenes, siete (36.84%) para Wolffi con títulos 1:50 y 1:100, y uno (5.26%) para Autumnalis con título de 1:50 (Cuadro 6).

DISCUSIÓN

La seroprevalencia en el "Rancho El Salado" fue de 80% y en "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S.C." de 78.95%.

En un estudio realizado en el 2009 en la Isla de Cozumel, mediante MAT se obtuvo una seroprevalencia de 95.7% de 267 sueros de roedores utilizando dilución 1:25 (Sotomayor 2009), este resultado es parecido al obtenido en ambas comunidades en Puebla tomando en cuenta un número menor de muestras, aunque en la seroprevalencia por serovariedad fue completamente diferente. Los resultados que se obtuvieron en Puebla y en Isla Cozumel difieren de los obtenidos en Chapa de Mota donde se encontró una seroprevalencia en roedores silvestres de 39.28% con MAT (González 2004).

Estudios realizados en Nueva Zelanda e India han obtenido títulos a partir de 1:12 y 1:20 respectivamente. Lo anterior se establece tomando en cuenta los resultados de la prueba como evidencia de un contacto previo con la bacteria y no como diagnóstico de una infección activa (Sotomayor, 2009).

En México las serovariedades más aisladas en casos de leptospirosis en humanos son Bratislava, Autumnalis, Canicola, Ballum, Hardjo y Pomona (Zúñiga y Caro 2013), este estudio

presentó sueros positivos para cinco de las seis serovariedades anteriormente mencionadas (excepto Ballum para la cual no se corrió la prueba), esto puede implicar un potencial riesgo infeccioso al hombre en relación con la cercanía del mismo o los animales domésticos con las zonas de muestreo.

De los roedores muestreados en el "Rancho El Salado", 80% (N=16) pertenecen a la especie *Heteromys irroratus*, mientras que en el "Centro Ecoturístico Rancho Yeguas S.C." esta especie representó el 73% (N=19). Lo anterior puede establecer una relación entre las especies de los roedores y la presencia de anticuerpos hacia las mismas serovariedades de *Leptospira* en las dos UMAs.

La diferencia de la seroprevalencia entre "Rancho El Salado" y el "C.E.R.Y." es menor al 2%, con lo que la cercanía a asentamientos urbanos no pareciera tener mucha injerencia en los resultados de este estudio, contrario a lo que han demostrado otros estudios (Pérez *et al.*, 2017).

La seroprevalencia de *Leptospira* en Puebla es del 26% (Carrada *et al.*, 2002), tomando en cuenta lo anterior y las recomendaciones de la OMS para los casos de leptospirosis (WHO, 2010), del total de animales positivos a MAT (N=31) tomando el título mayor de las serovariedades que aglutinaron 3 (9.8 %) tuvieron un título igual o mayor a 1:400 que son los ejemplares

que se pueden considerar con la enfermedad activa, once animales (35.5%) obtuvieron títulos iguales o mayores a 1:100 y menores a 1:400 estos roedores se consideran animales que pueden tener la enfermedad crónica, el resto (54.8%) de los animales se consideran ejemplares que estuvieron expuestos a la bacteria sin tener en ese momento la enfermedad.

MAT como los demás métodos diagnósticos presentan ventajas y desventajas. Dentro de los primeros días de la enfermedad, la única prueba sensible y específica es el PCR. En esta etapa, el diagnóstico rápido solo es posible mediante pruebas moleculares. A partir de la segunda semana de la enfermedad, el diagnóstico serológico se basa en la detección de IgM específica donde MAT es considerada la prueba de referencia (Musso y La Scola, 2013).

Un estudio que analizo el efecto de la temporada de lluvia en los casos de leptospirosis en ganado bovino en el trópico concluyo en existe un aumento de casos de Leptospirosis con un incremento en la seroprevalencia de serovariedades no comunes en bovinos (Correia *et al*, 2017).

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio realizado en estas UMAs cuyo objetivo fue detectar anticuerpos contra *Leptospira*. Se analizaron mediante MAT el suero de 39 roedores silvestres capturados entre las dos UMAs, de los cuales 79.49% aglutinaron para al menos una serovariedad de las 12 incluidas en la prueba.

Del trabajo realizado se concluye que hay una seroprevalencia de *Leptospira* del 80% en "Rancho El Salado" y 78.95% en el "C.E.R.Y." Las serovariedades con mayor número de sueros positivos fueron *Bataviae* seguida de *Wolffi*, *Canicola*, *Grippotyphosa* e *Icterohaemorrhagie* respectivamente. Estos resultados servirán como referencia para futuras investigaciones.

Debido a que no hay estudios previos sobre la bacteria en las áreas de muestreo, la prueba de aglutinación microscópica arroja un resultado aceptable hasta que no se puedan realizar otros estudios como el cultivo de la *Leptospira*.

Tomando en cuenta que existen áreas como asentamientos urbanos, tierras de cultivo y zonas de pastoreo cercanas a las áreas de muestreo (principalmente en "Rancho El Salado") sería importante monitorear la seroprevalencia en los animales domésticos y comprobar si existe una relación entre la cercanía

de la actividad humana y la seroprevalencia de *Leptospira* en roedores silvestres y animales domésticos.

A pesar de que los roedores son considerados el principal hospedero y diseminador de la bacteria, existe evidencia de que en poblaciones de roedores silvestres cercanas a asentamientos humanos la seroprevalencia de *Leptospira* es mayor que en aquellas poblaciones que están más alejadas de la presencia del hombre (Pérez *et al.*, 2017).

Condiciones como cuerpos de agua perennes y de temporal, precipitaciones pluviales de entre 800 a 1000 mm, con climas que presentan lluvia en verano y rangos de temperatura de 20 a 28°C presentes en ambas UMAs favorecen la presencia de la bacteria en el suelo y agua, aunado a la presencia del hospedero de mantenimiento como lo son los roedores silvestres y los domésticos presentes en aquellas zonas cercanas a asentamiento humanos.

Un monitoreo de la seroprevalencia a lo largo del año podría determinar todas las serovariedades presentes en los lugares de muestreo.

Estudios posteriores deberán considerar además de MAT otros métodos diagnósticos para corroborar los casos positivos y determinar el estadio de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Acha P., Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los animales, Volumen I. Bacteriosis y micosis. 3^a ed. Washington, DC, EUA: Organización Panamericana de la Salud. pp. 175-189.
2. Assenga J., Matemba L, Muller S., Mhamphi G., Kazwala R. 2015. Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania. PLoS Neglected Tropical Diseases 9 (3): doi:10.1371/journal.pntd.0003607.
3. Aznida M., Muhammad A., Muhammad H., Nor A., Mohammad S., Hasanain F., Mohd R. 2018. Animal Reservoirs for *Leptospira* spp. South-East Asia: A Meta-Analysis. Journal of Advance Research in Medecine. 5(3), pp. 23-31.
4. Barragan V., Olivas S., Keim P., Pearson T. 2017. Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. Applied and Environmental Microbiology 83(19): DOI: 10.1128/AEM.01190-17
5. Barrientos M. 2012. Prevalencia y determinación de ectoparásitos en murciélagos (chiroptera) y roedores (rodentia) en dos localidades de La Mixteca Poblana: Santo

- Domingo Tonahuixtla y Teotlalco, Puebla, México. [tesis de licenciatura]. D.F. México. FMVZ, UNAM.
6. Bauman R. 2012. Microbiology with diseases by body system. 3ª edición. San Francisco. CA. EUA: Pearson. pp. 743-744.
 7. Bertelloni F., Turchi B., Vattiata E., Viola P., Pardini S., Cerri D., Fratini F. 2018. Serological survey on *Leptospira* infection in slaughtered swine in North-Central Italy. *Epidemiology and Infection* 1-6. <https://doi.org/10.1017/S0950268818001358>
 8. Bogdanske J., Stelle S., Riley M., Schiffman B. 2010. Laboratory Mouse Procedure 45-48.
 9. Carrada G., Calderon E., Martínez C. 2002. Leptospirosis: pleomorfismo clínico en el síndrome febril. *Salud en Tabasco*. 8(3): 128-132
 10. Cervantes L, Puebla M, Rosas D, Serrania N, Barrnca J. 2002. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 54(1): 24-27.
 11. CoNaVe. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Leptospirosis. Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud. 52 pp.
 12. Correira L., Loureiro A. Lilenbaum. 2017. Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral

- infections in cattle in a tropical region. *The Veterinary Journal*. 220, 63-64.
13. Costa F., Wunder E., Oliveiral D., Bisht V, Rodrigues G., Reis M., Kol A., Begon M., Childs J. 2015. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(6): DOI:101371/journal.pntd.0003819.
 14. Degn S., Thiel S. 2013. Humoral Pattern Recognition and the Complement System. *Journal of Immunology*. 78 (2): 181-193.
 15. Evangelista K., Lourdault K., Matsunaga J., Haake D. 2017. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. *PLoS ONE*. 12(7): e0180004.
 16. Fortes G., Carreira T., Vieira M. 2016. First Isolates of *Leptospira* spp., from Rodents Captured in Angola. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 94(5): 955-958.
 17. Gasque R. 2008. *Enciclopedia Bovina*. Ciudad Universitaria, D.F., México: Comité editorial de la FMVZ. pp. 168-172.
 18. González M. 2004. Seroprevalencia de *Leptospira* spp en roedores silvestres de los bosques de pino-encino con

diferente manejo (con y sin pastoreo) en Chapa de Mota, Estado de México [tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias]. Distrito Federal. México: FMVZ, UNAM.

19. Guernier V., Allan K., Goarant C. 2017. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology*. 145(05) 596-607
<https://sci-hub.tw/10.1017/s0031182017001147>
20. Hartmann K., Egberink H., Pennisi M., Lloret A., Addie D., Belák S., Baralon C., Frymus T., Jones T., Hosie M., Lutz H., Marsilio F., Möstl K., Radford A., Thiry E., Truyen U., Horzinek C. 2013. *Leptospira* Species Infection in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 15, 576-581
21. Herman H., Mehta S., Cárdenas W., Ibarra A., Finkelstein J. 2016. Micronutrients and Leptospirosis: A Review of the Current Evidence. *PLoS Negl Trop Dis* 10(7): e0004652. doi:10.1371/journal.pntd.0004652
22. INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Jolalpan, Puebla, México. Clave geoestadística 21087.
23. INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. San Jerónimo Xayacatlán, Puebla, México. Clave geoestadística 21127.

24. Jacques, M., Aragon, V., Tremblay, Y. D. 2010. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal health research reviews*, 11(2), 97-121. DOI: 10.1017/S1466252310000149)
25. Khurana S., Dhama K., Prasad M., Gulati B., Malik Y., Karthik K. 2016. LEPTOSPIROSIS IN HORSES: SPECIAL REFERENCE TO EQUINE RECURRENT UVEITIS. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Science*. 4(4): 123-131
26. Ko A, Goarant C, Picardeau M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7(10): 736-747
27. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2014. *Microbiología médica*. 7ª edición. Barcelona. España: Elsevier Saunders. pp. 360-363.
28. Miotto B., Guilloux A., Tozzi B., Moreno L., da Hora A., Dias R., Heinemann M., Moreno A., Filho A., Lilenbaum W., Hagiwara M. 2018. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS ONE* 13(7): e0200384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200384>

29. Musso D., La Scola B. 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 46: 245-252.
30. OIE. 2014. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Volumen 1. 5ª edición. Paris. Francia: Comisión de Estándares Biológicos de la OIE. pp. 343-351.
31. Pérez A., Arroyo G., Atilano D., Galván A., Valdez C., Toyos D., Mendizabal D., Islas J., Suzán G. 2017. Presence of Antibodies to *Leptospira* spp. in Black-tailed Prairie Dogs (*Cynomys ludovicianus*) and Beavers (*Castor canadensis*) in Northwestern Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*. 53(4): DOI. 10.7589/2016-11-240
32. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses* 43(1):1-9.
33. Picardeau M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology* 15(5): DOI: 10.1038/nrmicro.2017.5
34. Rodrigues T., Isaac L., Barbosa A., 2016. Complement evasion by Pathogenic *Leptospira*. *Frontiers in Immunology* 7:623

35. Romero M., Sánchez J., Gonzáles L. 2011. REVISIÓN SOBRE LA IMPORTANCIA DE LA FAUNA SILVESTRE EN LA EPIDEMIOLOGIA DE LA LEPTOSPIROSIS. Biosalud. 10(2) 112-122
36. Samir A., Soliman R., El-Hariri M., Abdel-Moein K., Hatem M. 2015. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(3): 272-277.
37. Solecki M., Santecchia I., Werts C. 2017. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. Frontiers in Immunology 8:58
38. Sotomayor J. 2009. Asociación de Leptospira con los roedores nativos y exóticos de La Isla Cozumel, México. [Tesis de licenciatura]. D.F. México FMVZ. UNAM.
39. Tadin A., Tokarz R., Markotić A., Margaletić J., Turk N., Habuš J, Svoboda P., Vucelja M., Desai A., Jain K., Lipkin W. 2016. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 94(2): 466-473.
40. Torres-Castro M, Betancourt S., Flores P., Sierra E., Castro J., Puerto F. 2016. Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. Rev. Med. Del Inst. Mex. Seg Soc. 2016:54(5): 620-625.

41. Welder J., Frank A., Hornsby R., Olsen S., Alt D. 2016. Interaction of Bovine Peripheral Blood Polymorphonuclear Cells and *Leptospira* Species; Innate Responses in the Natural Bovine Reservoir Host. *Frontiers in Microbiology*. 7:1110 doi: 10.3389/fmicb.2016.01110
42. World Health Organization. 2010. Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group.
43. Wunder E., Slamti L., Suwondo D., Gibson K., Shang Z., Sindelar C., Trajtenberg F., Buschiazzo A., Ko A., Piacardeu M. 2018. FcpB Is a Surface Filament Protein of the Endoflagellum Required for the Motility of the Spirochete *Leptospira*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:130. doi: 10.3389/fcimb.2018.00130
44. Zhang Y., Bao L., Zhu H., Zhang H. 2010. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 42(1): 70-79.
45. Zhang X., Yu Y., He P., Zhang Y., Hu B., Yang Y., Nie Y., Jlang X., Zhao G., Guo X. 2005. Expression and Comparative Analysis of Genes Encoding Outer Membrane Proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in Epidemic Leptospire. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37(10): 649-656.

46. Zúñiga I., Caro J. 2013. Panorama epidemiológico de la leptospirosis, Estados Unidos Mexicanos 200-2010. *Enf. Inf. Microbiol.* 33 (2): 71-76.

Cuadro 1. ESPECIES DE *Leptospira* CON EJEMPLOS DE SEROGRUPOS, SEROVARIEDADES Y CEPAS

Especie	Serogrupo	Serovariedad	Cepa
Patógenas			
Subgrupo I			
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. mayottensis</i>	ND	ND	ND
Subgrupo II			
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Srjroe	M84
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L 60
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
Subgrupo III			
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79, 601
Subgrupo IV			
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermedias			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hursbrigge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Undesignated	ND	5399
Saprophytas			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	Waz Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo	Sao Paulo
<i>L. idonii</i>	ND	ND	Eri-1

Figura 1. MAPA DEL MUNICIPIO DE JOLALPAN, PUEBLA (INEGI 21087, 2009).

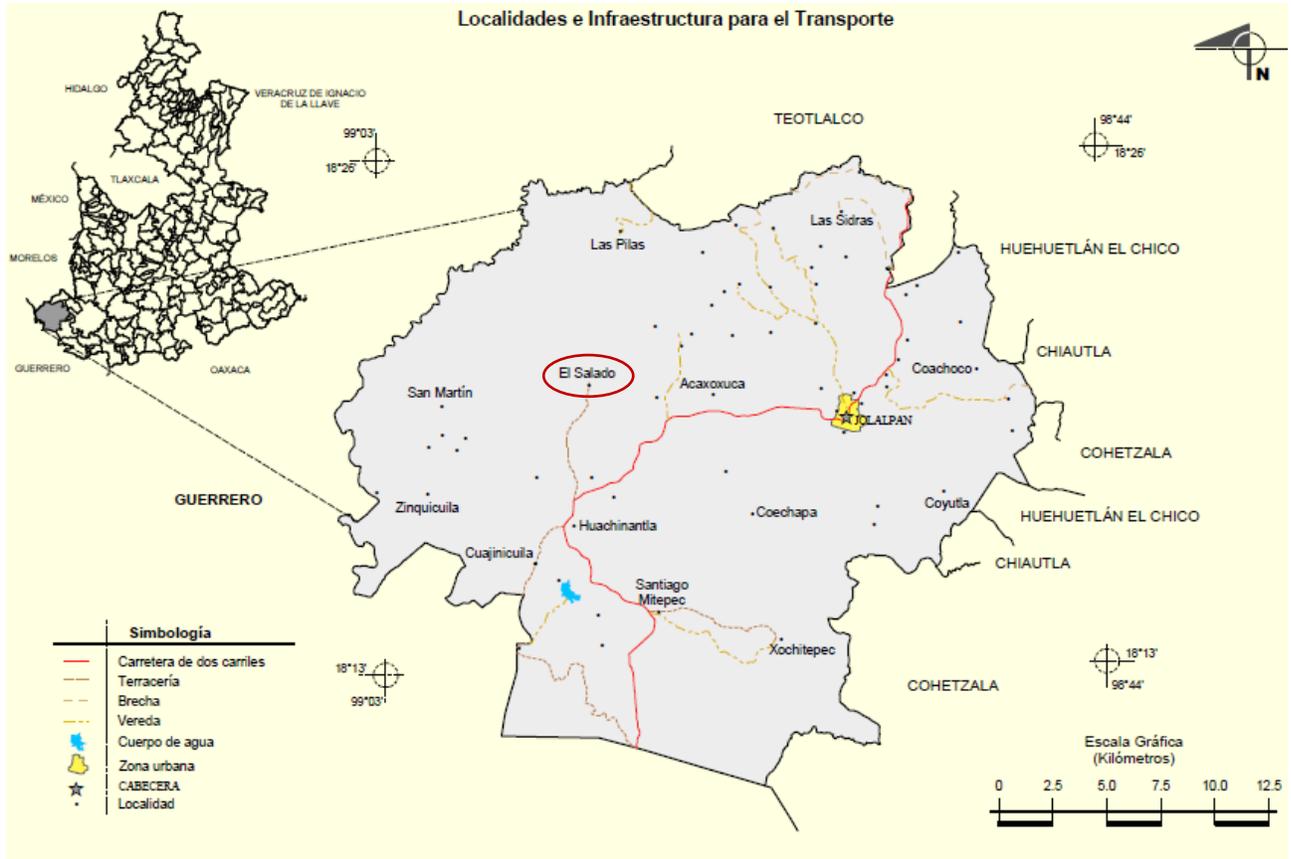


Figura 2. MAPA DEL MUNICIPIO DE SAN JERÓNIMO XAYACATLÁN, PUEBLA (INEGI 21127, 2009).

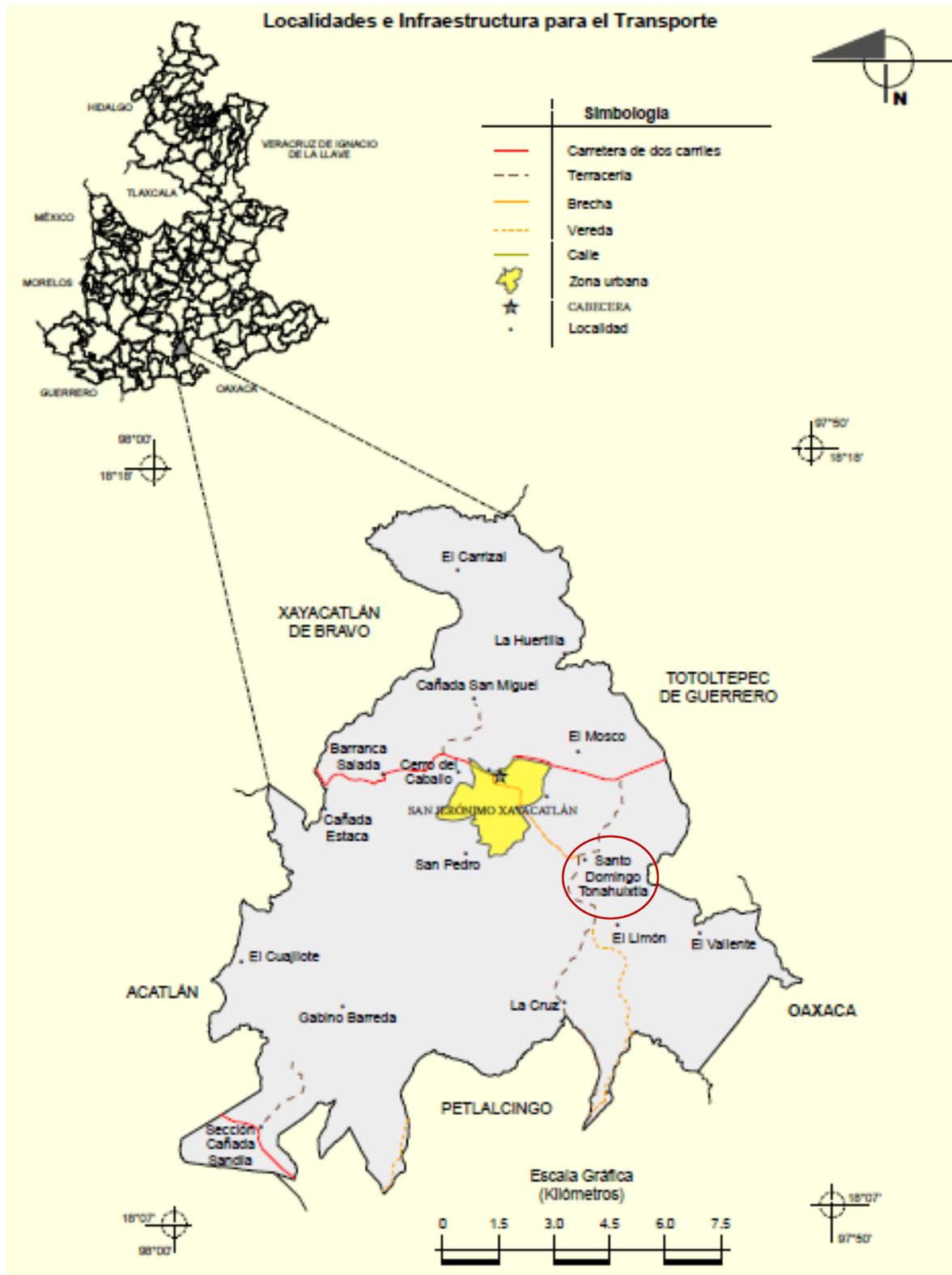


Figura 3. UBICACIÓN DE LA VENA MAXILAR EN *Mus musculus* (Bogdanske, 2010).

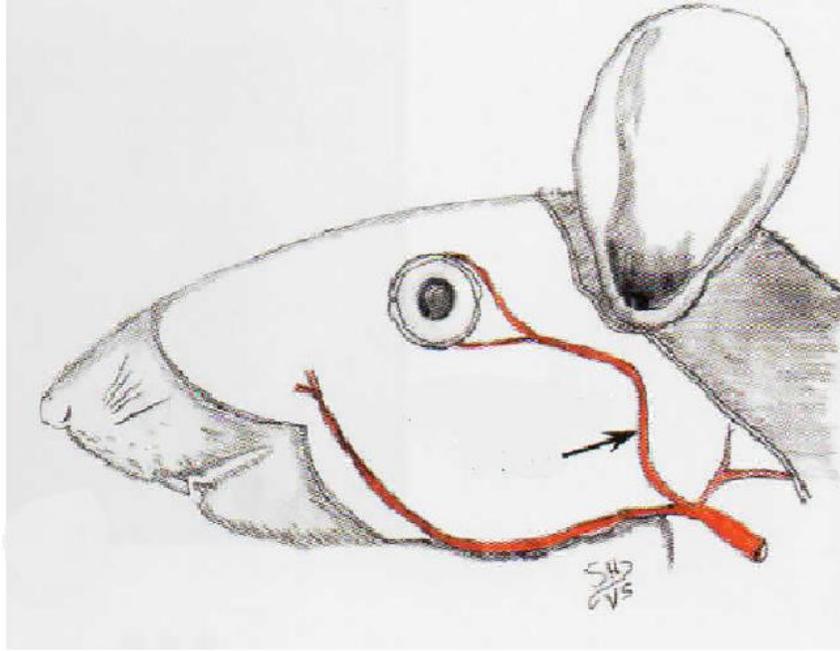
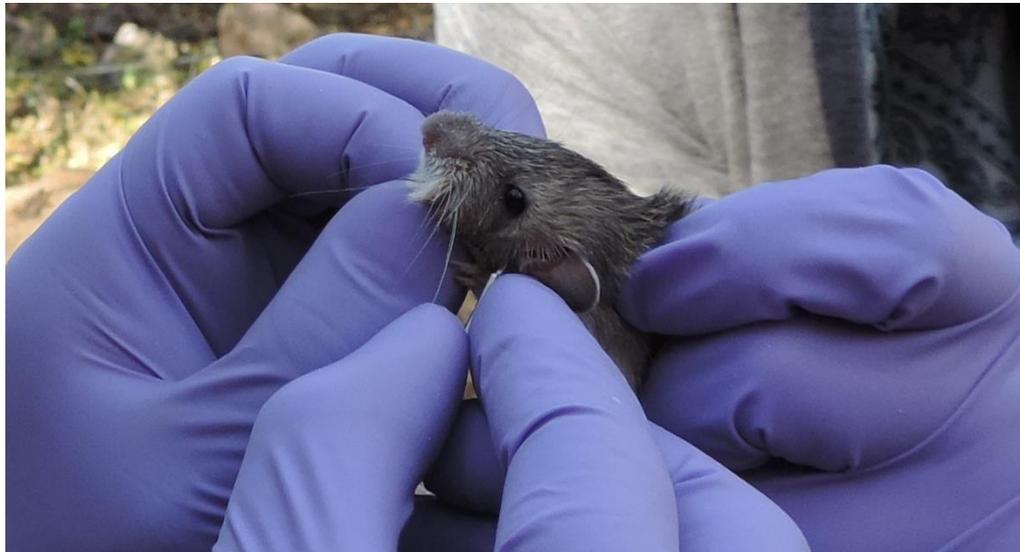


Figura 4. PUNCIÓN DE LA VENA MAXILAR EN *Heteromys irroratus*.

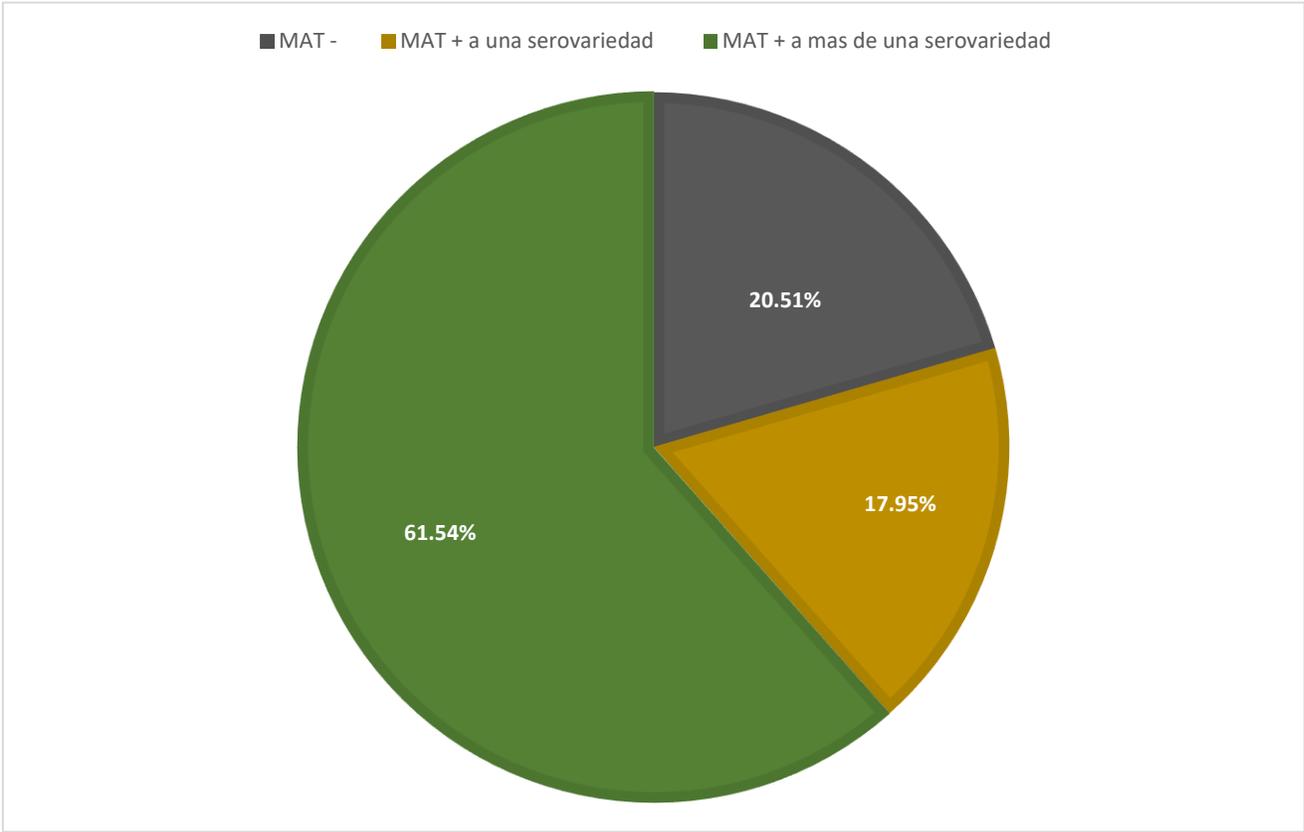


CUADRO 2. CEPAS DE *Leptospira* UTILIZADAS EN LA PRUEBA DE MAT

Especie	Serogrupo	Serovariedad	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjo prajitno
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. kirschner</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni

CUADRO 3. DATOS DE LOS ROEDORES MUESTREADOS.

FIGURA 5. RESULTADOS DE SUEROS PROCESADOS.



Cuadro 4. RESULTADOS DE MAT

SD: MAT no se corrió para esta serovariedad

Abreviaciones: Bat, Bataviae; Bra, Bratislava; Can, Canicola;
 Gri, Grippytyphosa; Har, Hardjo; Ict, Icterohaemorrhagiae;
 Pom, Pomona; Pyr, Pyrogenes; Tar, Tarassovi; Wol, Wolffii;
 Aut, Autumnalis y; Cel, Celledoni.

# Catalogo	Bat	Bra	Can	Gri	Har	Ict	Pom	Pyr	Tar	Wol	Aut	Cel
TOMA-15-03				1:50								
TOMA-15-04	1:100	1:100		1:50								
TOMA-15-06						1:50		1:50		1:50		
TOMA-15-07	1:50					1:50				1:50		
TOMA-15-08	1:50	1:50								1:100	1:50	
TOMA-15-09							1:50					
TOMA-15-11	1:100	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50						
TOMA-15-12												
TOMA-15-13	1:50		1:50	1:50			1:50			1:100		
TOMA-15-15												
TOMA-15-16						1:50						
TOMA-15-21			1:50	1:400								
TOMA-15-25		1:50	1:200		SD	1:50		SD	SD	1:50	SD	SD
TOMA-15-26												
TOMA-15-27	1:50											
TOMA-15-30		1:100	1:50		SD	1:50		SD	SD	1:50	SD	SD
TOMA-15-31		1:50	1:800		1:100							
TOMA-15-35												
TOMA-15-37								1:50		1:50		
SAMA-15-46	1:100	1:50	1:50	1:100		1:50	1:100	1:100		1:100	1:50	
SAMA-15-47				1:50			1:50	1:50				
SAMA-15-48	1:50	1:50	1:50			1:50	1:100			1:50	1:100	
SAMA-15-49	1:50		1:50		1:50	1:50				1:50	1:50	
SAMA-15-56								1:50		1:50		
SAMA-15-59				1:50						1:50		
SAMA-15-61				1:50								
SAMA-15-64												
SAMA-15-65	1:100			1:100		1:50						
SAMA-15-68												
SAMA-15-69	1:100	SD	1:100		SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
SAMA-15-70							1:50					
SAMA-15-71	1:50	SD	1:100		SD	SD		SD	SD	SD	SD	SD
SAMA-15-72	1:50	SD	1:800	1:50	SD		1:50	SD	SD	1:100	SD	SD
SAMA-15-73	1:50		1:50	1:50								
SAMA-15-83												
SAMA-15-89	1:50									1:50		
SAMA-15-91	1:50			1:50								
SAMA-15-95					SD			SD	SD		SD	SD
SAMA-15-96	1:50											

**Cuadro 5. TITULO DE MAT POR SEROVARIEDAD EN EL
"RANCHO EL SALADO".**

Serovariedad/titulo	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Icterohaemorrhagiae		4						4
Bataviae		8	3					11
Bratislava		2						2
Canicola		4	2			1		7
Pomona		3	2					5
Hardjo		1						1
Wolffi		5	2					7
Pyrogenes		2	1					3
Autumnalis		1						1
Grippotyphosa		6	2					8
Tarassovi								0
Celledoni								0

**Cuadro 6. TITULO DE MAT POR SEROVARIEDAD EN EL
"C.E.R.Y.".**

Serovariedad/titulo	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Icterohaemorrhagiae		6						6
Bataviae		4	2					6
Bratislava		4	2					6
Canicola		4		1		1		6
Pomona		2						2
Hardjo		1	1					2
Wolffi		5	2					7
Pyrogenes		2						2
Autumnalis		2	1					3
Grippotyphosa		4			1			5
Tarassovi								0
Celledoni								0

FIGURA 6. RESULTADOS DE MAT POR SEROVARIEDAD EN AMBAS COMUNIDADES.

