

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**Diagnóstico de Leptospirosis en caninos clínicamente sanos en la  
Comarca Lagunera**

**POR**

**ANAHÍ SÁNCHEZ CASTELLANOS**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**OCTUBRE DE 2017**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Diagnóstico de Leptospirosis en caninos clínicamente sanos en la  
Comarca Lagunera

POR

ANAHÍ SÁNCHEZ CASTELLANOS

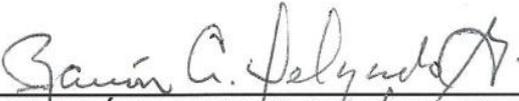
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

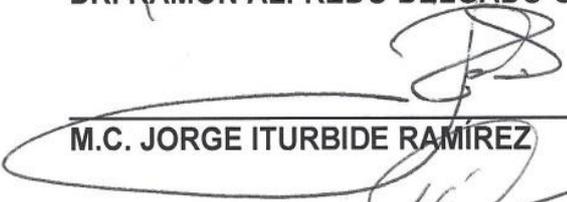
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

PRESIDENTE:

  
DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL:

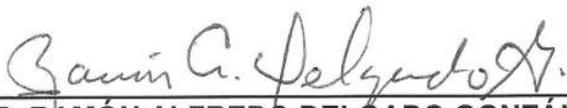
  
M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

VOCAL:

  
M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

VOCAL SUPLENTE:

  
M.V.Z. HILDA RUTH SAGREDO ULLOA

  
DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Diagnóstico de Leptospirosis en caninos clínicamente sanos en la  
Comarca Lagunera

POR

ANAHI SÁNCHEZ CASTELLANOS

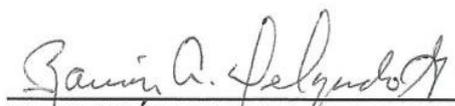
TESIS

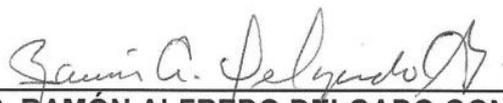
QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

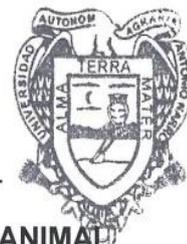
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL:

  
DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

  
DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi familia** por apoyarme y confiar en todo momento a lo largo de la carrera.

**A mi asesor M. C. Ramón Alfredo Delgado González** por ser un gran maestro y aguantarme durante todo este proceso.

**A los médicos veterinarios Jorge González Castañeda y Jorge Rodríguez** por ayudarme a perseguir mis sueños y por enseñarme lo bonito que es esta profesión.

**A mis maestros**, que me motivaron a seguir aprendiendo, a amar con más ganas la carrera y a querer superarme.

**A mi Alma Mater** por todas las facilidades que me brindó en estos 10 semestres, por la gente que conocí dentro de sus instalaciones y por los momentos tan bonitos que pasé y que me servirán para mi futuro profesional.

## **DEDICATORIA**

A mi abuela materna, que ya no está físicamente pero su presencia sigue aquí.

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad de distribución mundial que puede ser transmitida de los animales al hombre, incluyendo a los caninos que son portadores de serovares zoonóticas. Las serovares más frecuentes asociadas con la leptospirosis canina, y que pueden afectar al hombre, son *Canicola*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* y *Gryppothyphosa*. Estudios previos en perros callejeros de la Comarca Lagunera donde se analizaron 12 serovariedades, se encontraron resultados serológicos positivos en un 67%, por tal motivo la finalidad de la presente investigación es darle continuidad al estudio pero en este caso diagnosticar serológicamente leptospirosis en caninos “domiciliados” aparentemente sanos, de muestras tomadas en clínicas veterinarias. Se tomaron 40 muestras de sangre sin anticoagulante de caninos para la separación de suero y su análisis por la técnica de aglutinación microscópica para el diagnóstico de leptospirosis. Se utilizaron 9 serovariedades de leptospirosis de referencia internacional. Los resultados serológicos no mostraron casos positivos a leptospirosis por la técnica utilizada. Se discuten los resultados con otras investigaciones nacionales e internacionales.

**Palabras clave:** *Leptospira*, serología, MAT, caninos, Comarca Lagunera.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Hipótesis	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Historia	3
2.2 Fundamentos de Leptospirosis	4
2.3 Taxonomía	4
2.4 Epidemiología	5
2.5 Patogenia	7
2.6 Inmunología	9
2.7 Signos y lesiones	9
2.8 Diagnóstico	10
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 Localización	14
3.2 Toma de muestras	14
3.3 Principio de MAT	14
3.4 Procedimiento de MAT	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>16</b>
<b>5. CONCLUSIÓN</b>	<b>18</b>
<b>6. LITERATURA CITADA</b>	<b>19</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Las leptospiras pertenecen a la familia *Leptospiraceae* del phylum *Spirochaete*. Son espiroquetas delgadas móviles, con un extremo en forma de gancho, aeróbicas y de lento crecimiento que tienen un óptimo desarrollo a 30 °C. El organismo es sumamente sensible a los pH extremos, a la falta de humedad y a los desinfectantes suaves incluyendo al detergente. Existen especies saprófitas y patógenas en la naturaleza. Las especies saprófitas viven en el agua y suelo y no infectan a los animales (Sykes y col., 2011).

La meta del Proyecto de Genoma de *Leptospira*, iniciado en 2011, ha sido obtener y comparar toda la información del genoma para todas las especies conocidas de *Leptospira*. Entre los objetivos de este análisis están los siguientes: i) Identificar los mecanismos de patogénesis de *Leptospira* que podrían explicar la heterogenicidad en las manifestaciones clínicas de *Leptospira*, ii) comprender la relación del contenido genómico y el contexto con la patogénesis; iii) determinar la relación evolutiva definitiva de *Leptospira* hacia la comprensión de cómo la leptospira infecciosa diverge de las saprófitas; y iv) identificar los antígenos más comunes para mejorar el diagnóstico y las vacunas (Lehmann y col., 2014).

En el ambiente natural, los perros están expuestos a cepas virulentas de *Leptospira* que pueden presentar muchos (si pertenecen al mismo serogrupo), pocos o ningún epitopo en común con los utilizados como cepas vacunales. Así, las cepas infecciosas del mismo serogrupo pueden pertenecer a un serovar distinto de las cepas utilizadas en las vacunas o incluso a un serogrupo distinto (*Australis*, *Sejroë*, *Grippotyphosa*, etc.). Un perro puede, por lo tanto, ser afectado por leptospirosis a pesar de la vacunación previa. (André-Fontaine, 2013)

Estudios previos en caninos criollos callejeros de la Comarca Lagunera, muestran prevalencia de leptospirosis de 67% y sospechosas en un 21%, indicando que la presencia de la enfermedad en la región es alta.

## **1.1. Hipótesis**

Los caninos clínicamente sanos de la Comarca Lagunera presentan anticuerpos contra leptospirosis.

## **1.2. Objetivo General**

Determinar la prevalencia de leptospirosis en caninos clínicamente sanos, criados en casas, en la Comarca Lagunera.

### **1.2.1. Objetivos específicos**

1. Identificar caninos clínicamente sanos para el diagnóstico de leptospirosis.
2. Analizar muestras de suero para el diagnóstico de leptospirosis con la técnica de microaglutinación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Historia

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica que afecta una gran variedad de animales silvestres y domésticos. El primer reporte de leptospirosis se llevó a cabo en 1886 en Alemania por el Dr. Adolf Weil, quien reportó en humanos una enfermedad febril con ictericia asociada a un trastorno que afectaba los riñones, hígado y bazo. En 1887 una enfermedad similar fue descrita por Goldschmidt, quien la registró como “Síndrome de Weil”. La morfología de las leptospiras fue descrita en 1907 como un #organismos en espiral con extremos en forma de gancho” al cual nombraron *Spirochaeta interrogans*, sin embargo, el Dr. Hideyo Noguchi, en 1917, lo describió dentro de un nuevo género llamándolo “*Leptospira*” (Noguchi y Kligler, 1920).

En México los primeros casos de leptospirosis fueron reportados en 1920, en humanos, en Mérida, Yucatán (Noguchi y Kligler, 1920). Sin embargo, no fue sino hasta la década de los 30’s que se empezaron a reportar casos en animales, siendo en 1953, el primer reporte de leptospirosis en bovinos en México (Varela y Vázquez, 1953; Varela y col., 1954). Se ha reportado en reptiles, aves, anfibios y artrópodos (Levett, 2001). Es considerada una enfermedad infecciosa emergente en humanos, y por lo tanto, de gran importancia en salud pública (WHO, 2011).

El primer modelo animal de una infección aguda por *Leptospira spp.* fue reportado por Inada y col., 1916, inyectando sangre de un paciente con la enfermedad de Weil a un mono, conejo, rata y a un cobayo y observaron que a los 7 días post infección, solo el cobayo desarrolló signos y síntomas consistentes a la enfermedad de Weil. Siguieron con el examen microscópico del hígado y detectaron una bacteria morfológicamente idéntica a la espiroqueta que observaron en las muestras de sangre, paredes intestinales y glándulas adrenales obtenidas de pacientes que sucumbieron a la enfermedad. Concluyeron que esta espiroqueta era la causa patogénica de la enfermedad de Weil y la llamaron *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Inada y col., 1916).

## 2.2. Fundamentos de Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad febril aguda causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira* (Costa y col., 2015). Las leptospiras son espiroquetas móviles, delgadas y helicoidales de aproximadamente 6-20  $\mu\text{m}$  de longitud. Tienen estructuras de superficie que comparten características tanto de bacterias Gram-positivas como de Gram-negativas. La doble membrana y la presencia de LPS son característicos de bacterias Gram-negativas, mientras que la cercana asociación de la membrana citoplasmática con la pared celular de mureína es reminiscente a la arquitectura de la envoltura de las Gram-positivas (Haake, 2000; Ko y col., 2009; Vijayachari y col., 2008)

La leptospirosis ha sido reconocida como una zoonosis emergente a nivel mundial, la cual es endémica en áreas tropicales con inundaciones frecuentes y especialmente áreas con mala sanidad (Haake y Levett, 2015; Adler y de la Peña, 2010).

Las cepas patógenas de *Leptospira* infectan principalmente a mamíferos pero también pueden encontrarse en reptiles y anfibios (Levett, 2001; Adler y Moctezuma, 2010). La mayoría de los mamíferos puede infectarse con *Leptospira*, este género contiene cientos de serovares patógenos que están asociados con uno o más huésped de mantenimiento, los cuales sirven como reservorios a largo plazo (Bolin, 1996). Los mamíferos que mejor se conocen como huésped son los roedores, perros, cerdos y bovinos, pero los serovares tienen la capacidad de adaptarse a nuevos huéspedes (Hartskeerl y col., 2011).

## 2.3. Taxonomía

El género *Leptospira* está clasificado en 21 especies y cerca de 300 serovares organizadas en 29 serogrupos. Entre estas 21 especies establecidas, 9 se caracterizan como patogénicas y frecuentemente se han aislado de humanos y animales; 5 se consideran como medianamente patogénicas, con la habilidad de infectar humanos y animales, aunque con menor frecuencia y con signos clínicos variables; y 7 se consideran como especies saprófitas ambientales no

patógenas (Adler y de la Peña, 2010; Boonsilp y col., 2013; Victoria y col, 2008).

La clasificación tradicional especifica que todas las especies saprófitas están dentro de *Leptospira biflexa*, mientras *L. interrogans* incluye todas las especies patógenas de leptospira (Kmety y Dikken, 1993; Plank y Dean, 2000) Siete de las especies han sido establecidas como patogénicas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* y *L. alexanderi*. Dos especies, *L. alstonii* y *L. kmetyi*, son candidatas para ser asignadas al grupo patogénico (Smythe y col., 2013; Slack y col., 2009) Cinco especies, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. licerasiae* y *L. wolffii*, están clasificadas como intermedias y seis especies, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii* y *L. yanagawae* son no patogénicas (Cerqueira y Picardeau, 2009).

#### **2.4. Epidemiología**

La enfermedad es estacional, con incidencia máxima en verano o en otoño en regiones templadas, donde la temperatura es el factor limitante en la supervivencia de las leptospiras y durante las estaciones de lluvias en regiones de clima cálido, donde la desecación rápida evitaría la supervivencia (CDC, 1994).

La duración de la supervivencia de *Leptospira* en hábitat natural, es afectada por muchos factores, incluyendo factores bióticos y abióticos. Se cree que la persistencia de *Leptospira* en suelos húmedos y en agua dulce durante largos períodos, depende de un pH ligeramente alcalino y altos niveles de oxígeno. (Chang y col., 1948; Levett, 2001) Se ha reportado que *Leptospira* sobrevive hasta por 10 meses en condiciones adversas (4°C) y por encima de 20 meses cuando se almacena a 30°C (Barragan y col., 2011).

En el ambiente natural, los perros están expuestos a cepas virulentas de *Leptospira* que pueden presentar muchos (si pertenecen al mismo serogrupo), pocos o ningún epitopo en común con los utilizados como cepas vacunales. Así, las cepas infecciosas del mismo serogrupo pueden pertenecer a un

serovar distinto de las cepas utilizadas en las vacunas o incluso a un serogrupo distinto (*Australis*, *Sejroë*, *Grippotyphosa*, etc.). Un perro puede, por lo tanto, ser afectado por leptospirosis a pesar de la vacunación previa (André-Fontaine, 2013).

Los perros urbanos tienen un mayor riesgo de infección que los perros rurales debido a la mayor densidad de perros y roedores que aumentan el riesgo de exposición entre los animales susceptibles. Además, los perros que viven en zonas urbanas periféricas donde las condiciones sanitarias y la infraestructura son precarias, con basura biológica y no biológica, las alcantarillas abiertas y la cercanía con otras especies animales constituyen poblaciones particularmente en riesgo (Lelu y col., 2015).

Los patrones de distribución e infección pueden cambiar tanto por la adaptación de los serovares a otros huéspedes, y por la introducción de nuevos animales dentro de un área. También los cambios climáticos y ecológicos afectarán la distribución de los serovares de *Leptospira* y consecuentemente la prevalencia y las características clínicas de los casos en humanos, mientras que las prácticas antropogénicas y el manejo de los sistemas de gestión de animales, determinan los riesgos de exposición e infección (Levett, 2001; Bharti y col., 2003).

La leptospirosis infecta a más de 150 millones de animales domésticos y mamíferos salvajes y se difunde en todos los continentes, a excepción de la Antártida (Ko y col., 2009). Los portadores animales primarios de la enfermedad son perros, bovinos y cerdos (Guerra, 2009). Los serovares que circulan más frecuentemente en perros son *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Bratislava* y *Autumnalis* (Moore y col., 2006; Ellis, 2010).

Los pequeños roedores se consideran como los reservorios más importantes, sin embargo, es probable que todas las especies conocidas de roedores, marsupiales o mamíferos, incluidos los humanos, puedan actuar como reservorios de leptospiras patógenas (Ganoza y col., 2010). Los estudios

epidemiológicos confirman que las poblaciones de ratas pueden tener tasas de infección tan altas como 90% (Levett, 2001).

El contacto directo con animales infectados es la causa de la mayoría de las infecciones en agricultores, veterinarios, trabajadores en mataderos, inspectores cárnicos, trabajadores de control de plagas; además el contacto indirecto es importante para los trabajadores del alcantarillado, los mineros, soldados, trabajadores en campos de arroz, entre otras (Terry y col., 2000)

Aparte de los agricultores y el personal de matadero que adquieren leptospirosis, esta zoonosis tiene un impacto directo en el comercio de animales o carne (Ellis, 1994).

La relevancia de la leptospirosis es que plantea un problema existente y creciente de salud pública y veterinaria. Es poco probable que las leptospiras (y la leptospirosis) puedan ser erradicadas, ya que sus principales reservorios son roedores, con ratas que constituyen fuentes importantes de serovares altamente virulentos (Hartskeerl y col., 2011).

## **2.5. Patogenia**

La enfermedad clínica puede resultar cuando los perros son expuestos a organismos por contacto directo con orina infectada, o puede ocurrir la transmisión indirecta por contacto con agua o suelo contaminado. Otras formas menos comunes de transmisión directa son venérea, transplacentaria y a través de heridas de mordedura o ingestión de tejidos contaminados (Mastrorilli y col., 2007).

El período de incubación para leptospirosis puede ser tan corto como unos pocos días, los organismos se replican rápidamente dentro de la sangre, tan pronto como un día después de la infección antes de invadir los tejidos. El período de incubación en estudios experimentales ha sido de 7 días, pero varía dependiendo en la dosis infectante, la cepa y la respuesta del sistema inmune del huésped (Saravanan y col., 1999; Greenlee y col., 2005).

Durante los primeros días de la enfermedad en curso, las bacterias patógenas alcanzan el torrente sanguíneo y evaden el sistema inmune del huésped para diseminarse a órganos diana (Bharti y col., 2003; Fraga y col., 2011).

El endotelio vascular es así un actor clave durante la fase bacterémica de leptospirosis, permitiendo el reclutamiento de células inmunes en tejidos. El daño endotelial generalizado puede ser un posible factor contribuyente para explicar lesiones orgánicas, notablemente a nivel de pulmones (De Brito y col., 2013).

La entrada habitual es a través de abrasiones o cortes en la piel o a través de la conjuntiva; la infección puede tener lugar a través de la piel intacta después de una inmersión prolongada en agua, pero esto suele ocurrir cuando es probable que se produzcan abrasiones y, por lo tanto, es difícil de corroborar. Se ha documentado la transmisión a través del agua; la contaminación puntual de los suministros de agua ha dado lugar a varios brotes de leptospirosis. La inhalación de agua o aerosoles también puede resultar en infección a través de las membranas mucosas de las vías respiratorias. Rara vez, la infección puede ser por mordeduras (Barkin y col., 1974; de Souza, 1986; Gollop y col., 1993; Luzzi y col., 1987).

Las leptospiras colonizan los túbulos renales de los huéspedes de mantenimiento como perros, ratas y bovinos. Se excretan a través de la orina en el medio ambiente, donde pueden sobrevivir en condiciones húmedas adecuadas. Los huéspedes de mantenimiento son típicamente asintomáticos, mientras que los huéspedes accidentales pueden sufrir una gama de manifestaciones clínicas, incluyendo daño hepático y renal, y hemorragia pulmonar severa (Ko y col., 2009).

La leptospirosis en huéspedes de mantenimiento es de alta intensidad, constante y de larga duración en comparación con los huéspedes accidentales, donde es de baja intensidad, intermitente y de corta duración (Chernukcha y col., 1974).

## **2.6. Inmunología**

La fagocitosis es uno de los principales mecanismos para eliminar los patógenos invasores en fases tempranas de la infección, en individuos sin una inmunidad contra la infección adquirida (Gordon, 2016). Los macrófagos y neutrófilos son los principales fagocitos responsables de matar y eliminar a muchos patógenos invasivos (Kaufmann y Dorhoi, 2016). Se ha demostrado que los macrófagos mononucleares y neutrófilos fagocitan a las leptospiras, pero solo las primeras pueden matar a las leptospiras intracelulares fagocitadas, indicando que los macrófagos mononucleares son mucho más importantes que los neutrófilos en los mecanismos de defensa contra la infección de leptospira (Davis y col., 2009; Hu y col., 2013; Li y col., 2010).

Los receptores tipo Toll (TLRs) juegan un papel muy importante en restringir la diseminación de patógenos en el huésped. El acoplamiento de TLRs por productos microbianos da como resultado la homodimerización y reclutamiento de la molécula MyD88 que conduce a la activación de diversas vías de señalización intracelular tales como NF- $\kappa$ B y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP). La activación de estas vías regula la secreción de citoquinas, regulación positiva de las moléculas coestimuladoras, resultando en la activación, proliferación y diferenciación de células B y T, los cuales contribuyen a la activación de la respuesta inmune adaptativa, permitiendo así al huésped, erradicar los patógenos invasores del cuerpo (Kawai y Akira, 2005; Takeda y Akira, 2003)

Las leptospiras evaden la respuesta inmune del huésped por la interrupción de la señalización de TLR mediante la variación de expresión de lipopolisacáridos o la regulación de expresión de proteínas de superficie, por lo tanto establece la infección en varios órganos (Xue y col., 2010; Yang, 2007).

## **2.7. Signos y lesiones**

El síndrome asociado con la leptospirosis canina no solo se caracteriza por un amplia gama de características clínicas agudas, como anorexia, letargia, dolor

abdominal, vómito, pirexia, mialgia, fallo renal, hemorragia pulmonar e ictericia, sino también como portador crónico que puede resultar en pérdidas reproductivas y uveítis (Gallagher, 2011; Van de Maele y col., 2008).

Se han detectado cambios sugestivos a pancreatitis en algunos perros por medio de ultrasonografía abdominal. Puede ocurrir hematuria en infecciones naturales y experimentales. También pueden presentarse sangrados como hematemesis, hematoquezia, hemoptisis, melena, epistaxis y hemorragias petequiales (Birnbaum y col., 1998; Kohn y col., 2010; Mastroilli y col., 2007; Minke y col., 2009).

La mayoría de los perros infectados que presentan poliuria y/o polidipsia, son azotémicos y la poliuria puede ser atribuida a un daño tubular agudo, sin embargo hasta el 25% de los perros con orina diluida no son azotémicos. (Birnbaum y col., 1998) Hay evidencia de modelos animales experimentales, de que leptospira puede causar una forma de diabetes insípida nefrogénica adquirida, haciendo que los túbulos colectores sean resistentes a los efectos de la vasopresina (Magaldi y col., 1992).

En el riñón se generaliza necrosis tubular aguda, caracterizada por aplastamiento tubular cortical, basofilia incrementada y apariencia de moldes granulares dentro del lumen renal. Edema intersticial en forma de parches y difuso y en algunos casos inflamación intersticial linfocítica multifocal a difusa. En el hígado las lesiones son sutiles con una difusa marginación de neutrófilos (a veces entremezclado con linfocitos) a lo largo de los sinusoides, acompañado por hipertrofia de las células de Kupffer (Prescott y col., 1991).

## **2.8. Diagnóstico**

Durante la leptospirosis, la tasa de sedimentación de eritrocitos está elevada, el rango de recuento de glóbulos blancos va desde por debajo de lo normal a moderadamente elevado. Las pruebas de funcionamiento hepático muestran una elevación de las Alanina Aminotransferasas, bilirrubina y la fosfatasa alcalina, la hiperbilirrubinemia está fuera de proporción a la ictericia en casos

de leptospirosis icterica. Las pruebas de función renal generalmente se deterioran según lo indicado por el incremento de creatinina plasmática. El análisis de orina demuestra proteinuria, piuria, hematuria microscópica, cilindros hialinos y granulares. La punción lumbar revela presión elevada de LCR, un predominio de linfocitos y polimorfonucleares. El espectro de sangre periférica muestra leucocitosis periférica con desviación a la izquierda y trombocitopenia (Budihal y Perwez, 2014).

El test de aglutinación microscópica (MAT) es actualmente la prueba serológica estándar de oro para detectar leptospirosis en humanos y animales. Sin embargo, se han descrito más de 250 serovares hasta la fecha y, por lo tanto, el uso de MAT requiere el panel de serovares más geográficamente relevante. (André-Fontaine, 2016). Las diluciones seriadas del suero del paciente son incubadas con una selección de serovares patógenos de *Leptospira* y la aglutinación de los organismos se evalúa con microscopio de campo oscuro (Schuller y col., 2015). Debido a que el test es difícil de realizar e interpretar, el suero debe enviarse a un laboratorio de referencia (Levett, 2004).

La serología no distingue entre exposición natural y vacunación, a pesar de que los títulos postvacunales usualmente son bajos (< 1:400) y típicamente están presentes por menos de 3 meses (Van de Maele y col., 2008) Un título de  $\geq 1:800$  en un perro con signos clínicos compatibles y sin historial de vacunación contra leptospirosis, a menudo se considera sugestivo de leptospirosis (Langston y Hauter, 2003).

Los títulos de 1:600 o más altos, pueden ser detectados postvacunación temprana en algunos perros vacunados contra leptospirosis, un corte de 1:600 puede ser utilizado para incrementar la especificidad de un título alto de MAT para el diagnóstico de leptospirosis, particularmente si el historial de vacunación es desconocido. Un cambio cuatro veces mayor en los títulos de anticuerpos dentro de 2 a 4 semanas también pueden ser utilizados para confirmar el diagnóstico (Barr y col., 2005).

Como tal, MAT tiende a ser el último recurso en la práctica ya que se han desarrollado diversas técnicas de diagnóstico (inmunocromático) ofreciendo la ventaja de obtener un resultado en 10 minutos. El test utiliza los extractos antigénicos a partir de sangre completa, de *L. kirschneri* serovar *Grippotyphosa* y *L. interrogans* serovar *Bratislava* para detectar IgM canina producida en respuesta a la infección. Estos serovares fueron seleccionados ya que son de relevancia clínica y tienen una prevalencia relativa a nivel mundial (Blazius y col., 2005; Stokes y col., 2007).

La prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA) es un método de diagnóstico rápido y fácil que se basa en anticuerpos específicos del género. Sin embargo, se han obtenido resultados contrastantes a través de varios estudios realizados para encontrar la sensibilidad y especificidad de la IHA en infecciones tempranas. Se ha demostrado tener una sensibilidad del 92% y especificidad de 95% en comparación con MAT, sin embargo la IHA tiene un alcance muy limitado en el diagnóstico de infecciones por leptospira antes de los 8 días de infección (Imamura y col., 1974)

Recientemente, los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han utilizado cada vez más en el diagnóstico de leptospirosis debido a su rapidez, alta sensibilidad y especificidad, así como una detección contundente de *Leptospira* en una amplia gama de especímenes, incluyendo muestras ambientales, clínicas y animales (Bomfim y col., 2008). La reacción detecta el ADN de leptospira en muestras con cantidades extremadamente pequeñas equivalentes al ADN contenido de aproximadamente 10 leptospiras o menos. Una limitación del PCR basado en el diagnóstico de Leptospirosis, es la incapacidad de la mayoría de identificar el serovar infectante (Bal y col., 1994).

El cultivo de *Leptospira* es difícil por una variedad de razones. El proceso es laborioso, y puede tomar hasta tres meses (Pike, 1976). Por lo tanto, el aislamiento y el cultivo se utilizan principalmente para el diagnóstico retrospectivo. Además, para cultivar el organismo a partir de tejidos o fluidos corporales, el conocimiento del estadio de infección es crítico. En la fase

aguda, que dura aproximadamente 10 días, las leptospiras a menudo pueden cultivarse de sangre o líquido cefalorraquídeo. Por lo general, cuando se detecta la respuesta de anticuerpos (aproximadamente a los 10 días), las leptospiras desaparecen de la sangre. Durante la segunda fase, que puede durar hasta varios meses, la bacteriuria es a menudo intermitente (Budihal y Perwez, 2014).

Las tinciones de plata por lo regular son utilizadas para identificar leptospiras en tejido fijado en formol, sin embargo, surgen dificultades con este método por la extensa tinción de reticulina y la incapacidad para reconocer los fragmentos de leptospira, especialmente si solo están presentes pocos organismos están presentes (Adin y Cowgill, 2000).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización**

La Comarca Lagunera, región ubicada en el centro-norte de México, está conformada por parte de los Estados de Coahuila y Durango y debe su nombre a los cuerpos de agua que se formaban alimentados por dos ríos: el Nazas y el Aguanaval, hasta antes de la construcción de las presas Lázaro Cárdenas y Francisco Zarco, que en la actualidad regulan su afluente.

La Laguna, como comúnmente es conocida, está integrada por 16 municipios, 11 del Estado de Durango y 5 del Estado de Coahuila: En la Comarca Lagunera, la población se encuentra principalmente concentrada en las ciudades contiguas de Torreón, Gómez Palacio y Ciudad Lerdo (Comarca Lagunera.com).

#### **3.2. Toma de muestras**

Se tomaron 40 muestras de sangre sin anticoagulante de caninos clínicamente sanos, de 8 clínicas veterinarias de los municipios de Torreón, Coahuila, Gómez Palacio y Lerdo, Durango. Se separó el suero de las muestras para su análisis por la técnica de MAT, la cual se realizó en el Centro de Diagnóstico Integral y de Investigación en Salud Animal del Estado de Chihuahua, A.C. donde se utilizaron 9 serovariedades de leptospiras de referencia internacional.

#### **3.3. Principio de MAT**

La MAT es una prueba que determina los anticuerpos aglutinantes en el suero de un paciente mediante la mezcla de varias diluciones de éste con leptospiras vivas o muertas. Los anticuerpos antileptospiras presentes en el suero hacen que las leptospiras se peguen unas a otras formando grumos. Este proceso de agrupamiento es llamado aglutinación y es observado usando microscopía de campo oscuro. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de las clases IgM e IgG (OMS, 2008).

### 3.4. Procedimiento de MAT

El método consistió en mezclar el suero a estudiar con leptospiras cultivadas para luego evaluar el grado de aglutinación usando un microscopio de campo oscuro. El punto de corte se definió como la dilución del suero que muestre el 50% de aglutinación, dejando 50% de células libres, cuando se le comparó con un control que consistió en un cultivo diluido 1:2 en una solución amortiguada con fosfatos (OMS, 2008). Los sueros con dilución 1:50 o superior se consideraron positivos al observar con un aumento de 10X, una aglutinación o desaparición de células en el campo.

Se usaron placas plásticas para microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. Las serovariedades utilizadas para el estudio fueron *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Bratislava*, *Pyrogenes*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Wolffi*, *Hardjo*, y *Tarassovi*.

Las muestras se consideraron positivas cuando se encontró aglutinación en los sueros que a la dilución 1:50 o superior, mostraron 50% de aglutinación o desaparición de células del campo a la observación con el microscopio de campo oscuro (10X)

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó un total de 40 animales de los cuales 14 fueron hembras y 26 machos, con un promedio de edad de 4 años; 13(32.5%) Poodle, 6(15%) Chihuahueños, 5(12.5%) mestizos, 2(5%) Pastor Alemán, 2(5%) Schnauzer, 2(5%) Yorkshire, 2(5%) Maltés, 2(5%) Cocker Spaniel, 1(2.5%) Pug, 1(2.5%) Pomerania, 1(2.5%) Bulldog francés, 1(2.5%) Boxer, 1(2.5%) Labrador y 1(2.5%) Bulldog inglés. 11(27.5%) caninos presentaron vacunación que incluía *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*. Los restantes no tuvieron información sobre vacunaciones.

El estudio serológico de las cuarenta muestras del presente estudio resultaron negativas a leptospirosis por la técnica de microaglutinación. Al respecto, se sabe que la incidencia de leptospirosis, depende de las condiciones ambientales y climáticas que influyen en las dinámicas de población (Yusti y col., 2013). La información epidemiológica sobre la leptospirosis canina en México es limitada, no se dispone de un análisis real de la situación, los casos se estudian de manera independiente y la existencia de brotes es desconocida (Luna y col., 2008).

Desde 1963 a la fecha, los reportes de leptospirosis en caninos en México muestran prevalencias que van desde 17% hasta 81%. En centros de control canino (Centros antirrábicos) las prevalencias varían de 28% a 77% y en perros domiciliados de 19% a 81% (Luna y col., 2008), muy diferentes a los resultados del presente estudio, pero similar a otro estudio realizado en Malasia, ya que en caninos aparentemente sanos solo uno de 38 (2.6%) fue positivo serológicamente a leptospira (Lau y col., 2016).

Los más recientes estudios en México, en la zona metropolitana de la Cd. de México, se demostró una seropositividad del 28% y es indicativo de que la leptospirosis está comenzando a circular entre la población de perros callejeros de la metrópolis, significando un problema de salud pública (Martínez-Barbabosa y col., 2016).

También nuevos estudios, en este caso en la ciudad de Veracruz, realizados para determinar la frecuencia de leptospirosis canina en albergues caninos encontraron un 9.0% de seropositividad (Cruz-Romero, 2013). En Campeche, se muestrearon 323 perros, 142 eran perros callejeros y 181 perros (caseros) domiciliados, encontrándose una positividad del 21.3% de perros domiciliados y 26.7% de perros callejeros (Blum y col., 2013).

En otros países, como Brasil, estudios realizados con MAT muestran una prevalencia de leptospirosis en todo el país de 26% (de Castro y col., 2011). En Buenos Aires, Argentina se encontró una seropositividad en 57% de perros examinados; 82% de los sueros positivos coaglutinaron con dos o más serotipos (Rubel y col., 1997).

Previos resultados obtenidos en la Comarca Lagunera, muestran 67% de seropositividad a la presencia de anticuerpos en contra de *Leptospira* spp en perros callejeros de Torreón, Coahuila, siendo las principales serovariedades, *Icterohaemorrhagiae Canicola*, *Portland-vere*, *Bratislava*, *Palo Alto*, y *Pyrogenes*. Las serovariedades *Canicola* y *Portland-vere*, mostraron títulos altos de hasta 1:1600 (Ahuejote, 2012).

Es necesario considerar a la leptospirosis canina como una enfermedad frecuente e importante, presente en muchas áreas urbanas, de difícil diagnóstico y tratamiento, que en cualquier momento se puede llegar a manifestar clínicamente en los perros, inclusive los vacunados; por lo cual se debe incluir en el diagnóstico clínico diferencial de enfermedades infecciosas y establecer criterios en su tratamiento, manejo y control (Luna y col., 2008). Un perro puede, por lo tanto, ser afectado por leptospirosis a pesar de la vacunación previa. (André-Fontaine, 2013)

Los perros urbanos tienen un mayor riesgo de infección que los perros rurales debido a la mayor densidad de perros y roedores que aumentan el riesgo de exposición entre los animales susceptibles. Además, los perros que viven en zonas urbanas periféricas donde las condiciones sanitarias y la infraestructura son precarias, con basura biológica y no biológica, las alcantarillas abiertas y la

cercanía con otras especies animales constituyen poblaciones particularmente en riesgo (Lelu y col., 2015).

## **V. CONCLUSIÓN**

En base al historial clínico de los perros muestreados en el estudio, es probable que éstos hayan resultado negativos a la prueba serológica de leptospirosis debido a que eran perros domiciliados, que no se encontraban en situación de riesgo

El hecho de que los perros estuvieran vacunados o no, no determinan un factor de riesgo de infección por *Leptospira spp.*

Es recomendable realizar más estudios serológicos de leptospirosis en perros domiciliados con la finalidad de mantener una vigilancia epidemiológica

## VI. LITERATURA CITADA

1. **Adin, C.A. y Cowgill, L.D. (2000).** Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). *J. Am. Med. Assoc.* 216:371-375.
2. **Adler, B. y de la Peña, M.A. (2010).** Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140:287-296
3. **Ahujote, R.A.B. (2012).** Análisis serológico e histopatológico de leptospirosis en caninos del municipio de Torreón, Coahuila, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Torreón,, Coahuila.
4. **André-Fontaine, G. (2013).** Diagnosis algorithm for leptospirosis in dogs: disease and vaccination effects on the serological results. *Vet. Rec.* 11;172(19):502.
5. **André-Fontaine, G. (2016).** Leptospirosis in domestic animals in France: serological results from 1988 to 2007. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 35(3):913-923.
6. **Bal, A.E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R.A., MezaBrewster, J.D., Korver, H. y Terpstra, W.J. (1994).** Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospires. *J. Clin. Microbiol.* 32:1894-1898.
7. **Barkin, R.M., Guckian, J.C. y Glosser, J.W. (1974).** Infection by *Leptospira ballum*: a laboratory-associated case. *South. Med. J.* 67:155–156.
8. **Barragan, V.A., Mejia, M.E., Travez, A., Zapata, S. y Hartskeerl, R.A. (2011).** Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Curr. Microbiol.* 62:1802-1806.
9. **Barr, S.C., McDonough, P.L., Scipioni-Ball, R.L. y Starr, J.K. (2005).** Serologic response of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* and *Leptospira kirschneri* serovar *Grippotyphosa*. *Am. J. Vet. Res.* 66:1780-1784.
10. **Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M. y Lovett, M.A. (2003).** Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3:757-771.
11. **Birnbaum, N., Barr, S.C., Center, S.A., Schermerhorn, T., Randolph, J. F. y Simpson, K.W. (1998).** Naturally acquired leptospirosis in 36

- dogs: serological and clinicopathological features. *J. Small. Anim. Pract.* 39:231-236.
12. **Blazius, R.D.P., Romao, P.R.T., Blazius, E.M.C.G. y da Silva, O.S. (2005).** Occurrence of *Leptospira* spp. Soropositive stray dogs in Itapema, Santa Catarina, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública.* 21(6):1952-1956.
  13. **Blum, S.C., Chi, M.Y., Maldonado, M.G., Núñez, L.A., Gómez, M.I., Caballero, R.I. y Tamay, P. (2013).** Detection of reactive canines of *Leptospira* in Campeche City, Mexico. *Rev. Argentina Microbiol.* 45:34-38.
  14. **Bolin, C.A. (1996).** Diagnosis of leptospirosis. A remerging disease of companion animals. *Sem. Vet. Med. Surg.* 11:166-171.
  15. **Bomfim, M.R.Q., Barbosa-Stancioli, E.F. y Koury, M.C. (2008).** Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet. J.* 178(2):251-256.
  16. **Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J. y Amornchai, P. (2013).** A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e1954.
  17. **Budihal, SV. y Perwez, K. (2014).** Leptospirosis Diagnosis: Competancy of various laboratory tests. *J. Clin. Diagn. Res.* 8:199-202.
  18. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 1994).** Summary of notifiable diseases, United States 1994. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 43(53):1-80.
  19. **Cerqueira, G.M. y Picardeau, M. (2009).** A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genetic. Evol.* 9(5):760-768.
  20. **Chang, S.L., Buckingham, M. y Taylor, M.P. (1948).** Studies on *Leptospira icterohaemorrhagiae*; survival in water and sewage; destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *J. Infect. Dis.* 82:256-266.
  21. **Chernukcha, Y.G., Ananyina, Y.V. y Zenkovitch, N.S. (1974).** Pathogenicity of leptospire of various serological types for some species of wild rodents. *Zentralbl Bakteriolog.* 228(3):388-395.

22. **Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P. (2015).** Global morbidity and mortality of Leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0003898.
23. **Cruz-Romero, A., Romero-Salas, D., Ahuja, C., Aguilar-Dominguez, M., Bautista-Piña, C. (2013).** Frequency of canine leptospirosis un dog shelters un Veracruz, Mexico. 7(16): 1518-1521
24. **Davis, J.M., Haake, D.A. y Ramakrishnan, L. (2009).** *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. *PLoS neglected tropical dis.* 3(6):e463.
25. **De Brito, T., Aiello, V.D., da Silva, L.F.F., Goncalves da Silva, A.M., Ferreira da Silva, W.L. y Castelli, J.B. (2013).** Human hemorrhagic pulmonary leptospirosis: pathological findings and pathophysiological correlations. *PLoS One.* 8: e71743.
26. **De Castro, J.R., Sampaio-Salaberry, S.R., de Souza, M.A. y Correia Lima-Ribeiro, A.M. (2011).** Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44(2):217-222
27. **De Souza, D. (1986).** Consideracoes sobre enchentes e leptospirose humana no municipio de Sao Paulo. *Rev. Esc. Enferm.* 20:243–250.
28. **Dikken, H. y Kmety, E. (1978).** Serological typing methods of Leptospire. In: Bergan T, Norris JR, editors. *Methods in Microbiology.* New York: Academic Press; pp 268-307
29. **Ellis, W.A. (1994).** Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. Nor. Am. Food Anim. Pract.* 10:463–478.
30. **Ellis, W.A. (2010).** Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change. *Vet. Rec.* 167:602-605.
31. **Fraga, T.R., Barbosa, A.S. y Isaac, L. (2011).** Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand. J. Immunol.* 73: 408-419.
32. **Gallagher, A. (2011).** Leptospirosis in a dog with uveitis and presumed cholecystitis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47:e162-e167

33. **Ganoza, G.A., Matthias, M.A., Saito, M., Céspedes, M., Gotuzzo, E. y Vinetz, J.M. (2010).** Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(2):e612.
34. **Gollop, J.H., Katz, A.R., Rudoy, R.C. y Sasaki, D.M. (1993).** Rat-bite leptospirosis. *West. J. Med.* 159:76–77.
35. **Gordon, S. (2016).** Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity.* 44(3):463-75.
36. **Greenlee, J.J., Alt, D.P. y Bolin, C.A. (2005).** Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars *pomona* and *bratislava*. *Am. J. Vet. Res.* 66:1816-1822.
37. **Guerra, M.A. (2009).** Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234:472e8. 30.
37. **Haake, D.A. (2000).** Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology.* 146(7):1491-1504.
38. **Haake, D.A. y Levett, P.N. (2015).** Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387:65-97.
39. **Hartskeerl, R.A., Collares-Pereira, M. y Ellis, W.A. (2011).** Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 494-501.
40. **Hu, W., Ge, Y., Ojcius, D.M., Sun, D., Dong, H. y Yang, X.F. (2013).** P53 signalling controls cell cycle arrest and caspase-independent apoptosis in macrophages infected with pathogenic *Leptospira* species. *Cellular Microbiol.* 15(10):1642-59.
41. **Imamura, S., Matsui, H. y Ashizawa, Y. (1974).** Indirect hemagglutination test for detection of leptospiral antibodies. *Jpn. J. Exp. Med.* 44:191–197.
42. **Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Kaneko, R. y Ito, H. (1916).** The etiology, mode of infection, and specific therapy of weill's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *J. Exp. Med.* 23(3):377-402.
43. **Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 205).**
44. **Kaufmann, S.H. y Dorhoi, A. (2016).** Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. *Immunity.* 44(3):476-91.
45. **Kawai, T. y Akira, S. (2005).** Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 17:338-344.

46. **Kmety, E. y Dikken, H. (1993).** Classification of the Species *Leptospira interrogans* and history of its serovars, University Press Gronigen; The Netherlands.
47. **Ko, A., Goarant, C. y Piccardeau, M. (2009).** *Leptospira*: the dawn of molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev Microbiol.* 7:736-746.
48. **Kohn, B., Steinicke, K., Arndt, G. (2010).** Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *J. Vet. Intern. Med.* 24:1277-1282.
49. **La Comarca Lagunera.** Información General.  
<http://www.comarcalagunera.com/portal/laguna/comarca.php>
50. **Langston, C.E. y Heuter, K.J. (2003).** Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet. Clin. North Am: Small Animal Practice.* 33:791-807.
51. **Lau, S.F., Low, K.N., Khor, K.H., Radzi, R., Roslan, M.A., Bejo, S.K. y Bahaman, A.R. (2016).** Prevalence of leptospirosis un Health fotos and dogs with kidney disease in Klang Valley, Malaysia. *Tropical Biomedicine.* 33(3):469-475.
52. **Lehmann, J.S., Matthias, M.A., Vinetz, J.M. y Fouts, D.E. (2014).** Leptospiral pathogenomics. *Pathogens.* 3(2):280-308.
53. **Lelu, M., Muñoz-Zanzi, C., Higgins, B. y Galloway, R. (2015).** Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BMC Vet. Res.* 11:31.
54. **Levett, P.N. (2001).** Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:296-326.
55. **Levett, P.N. (2004).** Leptospirosis: a forgotten zoonosis?. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* 4(6):435-448.
56. **Li, S., Ojcius, D.M., Liao, S., Li, L., Xue, F. y Dong, H. (2010).** Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human mouse origin. *Innate Immun.* 16(2):80-92.
57. **Luna, A.M.A., Moles, C.L.P., Gavaldon, R.D., Nava, V.C. y Salazar G.F. (2008).** La leptospirosis canina y su problemática en México. *Rev. Salud Anim.* 30(1):1-11.
58. **Luzzi, G.A., Milne, L.M. y Waitkins, S.A. (1987).** Rat-bite acquired leptospirosis. *J. Infect.* 15:57-60.

59. Magaldi, A.J., Yasuda, P.N., Kudo, L.H., Seguro, A.C., Rocha, A.S. (1992). Renal involvement in leptospirosis: a pathophysiologic study. *Nephron*. 62:332-339.
60. Martínez-Barbabosa, I., Alpizar-Sosa, E.A., Gavaldón-Rosas, D.G., Moles-Cervantes, L.P., Gutiérrez, M., García-González, R., Shea, M. y Fernández-Presas, A.M. (2016). Canine leptospirosis serology in southern Mexico City. *J. Med. Microbiol.* 6:171-180.
61. Mastrorilli, C., Dondi, F. y Agnoli, C. (2007). Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: A retrospective study of 20 cases (2001-2004). *J. Vet. Intern. Med.* 21: 3-10
62. Minke, J. M., Bey, R. y Tronel, J.P. (2009). Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet. Microbiol.* 137:137-145.
63. Moore, G.E., Guptill, L.F., Glickman, N.W., Caldanaro, R.J., Aucoin, D. y Glickman, L.T. (2006). Canine Leptospirosis, United States, 2002-2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12:501-503.
64. Noguchi, H. y Kliger, J. (1920). Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Mérida, Yucatan. *J. Exp. Med.* 32:32-67.
65. Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008). Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control / Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa – VP/OPS/OMS, 2008. 127p.: il. (Serie de Manuales Técnicos, 12)
66. Pike, R.M. (1976). Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. *Health Lab. Sci.* 13:105–114.
67. Plank, R. y Dean, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. In humans. *Microbes Infect.* 2(10):1265-1276.
68. Prescott, J.F., Ferrier, R.L. y Nicholson, V.M. (1991). Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. *Can. Vet. J.* 32:481-486.

69. Rubel, D., Seijo, A., Cernigoi, B., Viale, A. y Wisnivesky-Colli, C. (1997). *Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public. Health.* 2(2):102-105.
70. Saravanan, R., Rajendra, P. y Garajan, S. P. (1999). Clinical, bacteriologic and histopathologic studies on induced leptospirosis in stray dog pups. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 42:463-469.
71. Schuller, S., Francey, T., Hartmann, K., Hugonnard, M., Kohn, B. y Nally, J.E. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 56(3):159-79.
72. Slack, A.T., Khairani-Bejo, S. y Symonds, M.L. (2009). *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from environmental source in Malaysia. *Internal. J. System. Evol. Microbiol.* 59(4):705-708.
73. Smythe, L., Adler, B., Hartskeerl, R.A., Galloway, R.L., Turenne, C.Y. y Levett, P.N. (2013). Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Internal. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(5):1859-1862.
74. Stokes, J.E., Kaneene, J.B. y Schall W.D. (2007). Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230(11):1657-1664.
75. Sykes, J.E., Hartmann, K., Lunn, K.F., Moore, G.E., Stoddard, R.A. y Goldstein, R.E. (2011). 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: Diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J. Vet. Intern. Med.* 25(1):1-13.
76. Takeda, K. y Akira, S. (2003). Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol.* 5:143-153.
77. Terry, J., Trent, M. y Bartlett, M. (2000). A cluster of leptospirosis among abattoir workers. *Commun Dis. Intell.* 24:158–160.
78. Van de Maele, I., Claus, A., Haesebrouck, F. y Daminet, S. (2008). Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet. Rec.* 163:409-413.
79. Varela, G. y Vásquez, A. (1953). Nota Preliminar acerca de la leptospirosis en la Ciudad de México. *Medicina (Mex).* 10;33(679) 291.

80. **Varela, G., Curbelo, A., Vasquez, A. y Neira, E. (1954).** Estudios de leptospirosis en las ciudades de Veracruz, Tampico y México, de la República Mexicana. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.* 14(3):123-131.
81. **Victoria, B., Ahmed, A. y Zuerner, R. L. (2008).** Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus. *Leptospira. PLoS One.* 3:e2752
82. **Vijayachari, P., Sugunan, A.P. y Shriram, A.N. (2008).** Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* 33(4):557-569.
83. **World Health Organization (WHO, 2003).** Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Available at: <http://www.who.int/zoonoses/resources/Leptospirosis/en/>
84. **World Health Organization (WHO, 2011).** Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group.
85. **Xue, F. (2010).** Transcriptional responses of *Leptospira interrogans* to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e857, doi:10.1371/journal.pntd.0000857
86. **Yang, C.W. (2007).** Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney International.* 72:918-925.
87. **Yusti, D., Arboleda, M. y Agudelo-Flórez, P. (2013).** Factores de riesgo sociales y ambientales relacionados con casos de leptospirosis de manejo ambulatorio y hospitalario, Turbo, Colombia.  
<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1457>