

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Análisis serológico e histopatológico de leptospirosis en
caninos del municipio de Torreón, Coahuila, México”**

POR

ALEJANDRA BERENICE AHUEJOTE RODRIGUEZ

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Junio de 2012

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

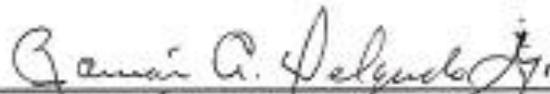
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS

**"Análisis serológico e histopatológico de leptospirosis en
caninos del municipio de Torreón, Coahuila, México"**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN

ASESOR PRINCIPAL



M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

ASESOR EXTERNO



DR. VICTOR MANUEL BANDA RUIZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

Torreón, Coahuila, México

Junio de 2012

"Análisis serológico e histopatológico de leptospirosis en caninos del municipio de Torreón, Coahuila, México"

TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE



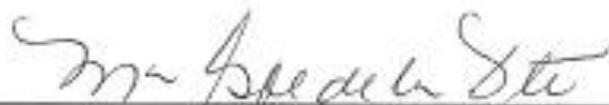
M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL



M.V.Z. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL



M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

VOCAL SUPLENTE



DR. VICTOR MANUEL BANDA RUIZ

INDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
2.1 Historia	2
2.2 Fundamentos de Leptospirosis	2
2.3 Taxonomía	3
2.4 Epidemiología	4
2.5 Patogenia	5
2.6 Inmunología	11
2.7 Signos y lesiones	12
2.8 Diagnóstico	14
2.9 Profilaxis y tratamientos	16
III. Justificación	17
IV. Objetivos	17
4.1. Objetivo General	17
4.2. Objetivos específicos	17
V. Material y métodos	18
VI. Resultados	21
VII. Discusión	26
VIII. Conclusiones	28
IX. Literatura citada	29

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a mis hermanos, por ser un ejemplo a seguir, por su infinito amor, apoyo y consejos.

A mis asesores M.C. Ramón Alfredo Delgado González, Dr. Victor Manuel Banda Ruiz, M.C. Lizsully Concepción Cedillo Sánchez, por su gran paciencia y ayuda para poder realizar mi tesis.

A mis maestros por compartir sus conocimientos.

A mis amigos por su fiel amistad, consejos y confianza.

A mi Alma Terra mater por permitirme conocer a mis amigos, maestros y enseñarme a respetar y querer mi carrera como M.V.Z.

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica distribuida por todo el mundo y se sabe que el perro es portador de serovares que afectan a los humanos. El diagnóstico de la enfermedad es difícil debido a que se confunde con una gran variedad de enfermedades ya que produce trastornos, renales, hepáticos, y multisistémicos. De acuerdo a diversos investigadores, las serovares más frecuentes asociadas con la leptospirosis canina son *Canicola*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* y *Gryppothyphosa*, sin embargo en la Comarca Lagunera no se conocen las serovariedades involucradas en la leptospirosis de caninos, por lo cual la presente investigación tiene la finalidad de estudiar la serología e histopatología renal en perros callejeros del municipio de Torreón, Coah. Se analizaron 62 perros criollos, callejeros, machos y hembras, mayores de 1 año de edad, en malas condiciones corporales, colectados por el Centro de Control Canino del municipio de Torreón, Coahuila, México. Se tomaron 43 muestras de sangre sin anticoagulante para la separación de suero, para su análisis por la técnica de aglutinación microscópica. Se utilizaron 12 serovariedades de leptospiras de referencia nacional e internacional. Se sacrificaron los 62 perros y se les practicó la necropsia e histopatología. Los resultados serológicos mostraron 29/43 (67.44%) muestras positivas a leptospirosis, 9/43 (20.93%) sospechosas y 5/43 (11.62%) negativas. Los resultados del análisis histológico de los riñones mostraron 25.81% (16/62) sin alteraciones significativas, 74.19% (46/62) presentaron nefritis con la siguiente clasificación: 32.25% (20/62) incipiente, 19.35% (12/62) leve, 11.29% (7/26) moderada, y 3.22% (2/62) severa.

Palabras clave: *Leptospira*, serología, MAT, histopatología, caninos, nefritis intersticial.

I. Introducción

La leptospirosis es causada por espiroquetas del género *Leptospira* y es considerada una enfermedad zoonótica mundial que afecta a humanos y a una gran variedad de animales. La infección principalmente se adquiere por exposición del agua, comida o suelo contaminado con orina de animales infectados. Los principales portadores de leptospiras son ratas, cerdos, perros, caballos, bovinos.

El género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae* del phylum *Spirochaete*. Humanos y animales susceptibles adquieren la infección de forma directa, al contacto con orina u otros fluidos del cuerpo, de animales infectados especialmente roedores o contacto indirecto con entornos contaminados, los roedores especialmente ratas son consideradas los reservorios más importantes u hospedadores de mantenimiento de *Leptospira*. Las leptospiras patógenas que infectan a los hospederos de mantenimiento persistentes en sus riñones pueden causar o no un daño leve. Como sea son causa de enfermedad leve o severa, incluso son susceptibles a la muerte de los hospederos tal como humanos y otros animales, también llamados hospederos accidentales o incidentales.

Se conoce que en perros callejeros la leptospirosis se ha extendido en todo el mundo, sin embargo, el reconocimiento clínico de la enfermedad no es fácil, debido a que se puede confundir con una diversidad de enfermedades, ya que produce trastornos, renales, hepáticos, y multisistémicos. Las serovares más frecuentes asociadas con la leptospirosis canina son *canicola*, *pomona*, *icterohaemorrhagiae* y *gryppothyphosa*.

En la Comarca Lagunera no se conocen las serovariedades involucradas en la leptospirosis de caninos, por lo cual la presente investigación tiene la finalidad de estudiar la serología e histopatología renal en perros callejeros.

II. Antecedentes

2.1. Historia

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, Goldschmidt lo registró como “Síndrome de Weil”. La morfología fue descrita en 1907 como “organismos en espiral con extremos en forma de gancho” al cual nombraron *Spirochaeta interrogans*, agente causal de la fiebre amarilla, pero el Dr. Hideyo Noguchi, en 1917, lo describió dentro de un nuevo género llamándolo *Leptospira* (Noguchi, 1918) 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 caninos y bovinos en México (Varela y Vázquez, 1953).

2.2. Fundamentos de Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana zoonótica de distribución mundial, es endémica en climas tropicales y templados (Bharti y col., 2003; Jha y Ansari, 2010; Lindahl, 2011). Afecta a la mayoría de los animales domésticos (Draghi y col., 2011), y 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 género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae* del phylum *Spirochaete*. Son delgadas espiroquetas 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 (Scanziani y col., 1995; Sykes y col., 2011).

Humanos y animales susceptibles adquieren la infección de forma directa, al contacto con orina u otros fluidos del cuerpo, de animales infectados especialmente roedores o contacto indirecto con entornos contaminados. Las leptospiras patógenas que infectan a los hospederos de mantenimiento persistentes en sus riñones pueden causar o no un daño leve. Como sea son causa de enfermedad leve o severa, incluso son causa de muerte de los hospedadores accidentales o incidentales (WHO, 2003).

2.3. Taxonomía

El género *Leptospira* incluye 19 especies genéticamente identificadas (Pinto-Jorge y col., 2011), y alrededor de 260 serovariedades patógenas, de acuerdo a los patrones de antígenos de superficie (Bharti y col., 2003; Ko y col., 2009), y están combinadas en 24 serogrupos (Levett y col., 2001). No existe correlación entre las clasificaciones serológica y genética (Patarakul y col., 2010).

El género *Leptospira* es bastante heterogéneo, se clasifica de acuerdo a sus características genéticas y se divide en tres grupos, como patógenas, no patógenas, y oportunistas posiblemente patógenas. Las *Leptospiras* patógenas incluyen ocho genopecies: *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilii*, *Leptospira alexanderi*, *Leptospira noguchii* y *Leptospira alstonii* (Brenner y col., 1999). El grupo de especies saprófitas incluye seis microorganismos de vida libre que se encuentran en la superficie de aguas como *Leptospira biflexa*, *Leptospira wolbachii*, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira yanagawae*, *Leptospira terpstrae* y *Leptospira vanthiellii*. Otro grupo comprende especies de “comportamiento intermedio”, cuyo papel en su patogenicidad no ha sido demostrado: *Leptospira*

inadai, *Leptospira broomii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira wolfii* y *Leptospira licerasiae* (International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008).

2.4. Epidemiología

Las leptospiras que causan enfermedad se pueden clasificar como 1) adaptadas al hospedador, las que infectan a los animales hospedadores de mantenimiento, 2) no adaptadas al hospedador, las que infectan a los animales hospedadores accidentales (Leanne y col., 2011). Las diversas serovariedades se adaptan a diferentes hospedadores reservorios animales, silvestres o domésticos y el reconocimiento de estas serovariedades tiene importancia epidemiológica. Los animales pueden servir como reservorios de algunas serovariedades y convertirse en hospedador incidental de otras (Natarajaseenivasan y col., 2011).

Muchas especies de animales, domésticos y silvestres, sirven como hospedadores reservorios (portadores), resultando en una diseminación global de la enfermedad, probablemente los reservorios silvestres sean los hospedadores de mantenimiento de la mayoría de las leptospiras patógenas. Los humanos son hospedadores incidentales (Patarakul y col., 2010). Los humanos y los animales pueden infectarse por contacto directo con líquidos corporales de animales que están eliminando las leptospiras por la orina, secreciones uterinas, y leche (Leonard y col., 2004), por tejidos de animales infectados, después de la ingestión de agua y alimentos e inhalación de gotas en aerosol contaminadas por orina, o indirectamente a través de la exposición de suelos húmedos, aguas y vegetación (Gilman y col., 2003; Daher y col., 2010; WHO, 2011). Las leptospiras patógenas pueden sobrevivir por periodos prolongados de tiempo en el ambiente (Trueba y col., 2004).

Las encuestas serológicas han demostrado que la leptospirosis se ha extendido en todo el mundo en perros callejeros (Alton y col., 2009), pero el reconocimiento clínico de la enfermedad es menos frecuente. Las serovares más frecuentes

asociadas con leptospirosis canina son *canicola*, *pomona*, *grippotyphosa*, *bratislava* e *icterohaemorrhagiae*, aunque han sido reportadas infecciones con otras serovares con insuficiencia renal aguda, en perros de Norteamérica, incluyendo a Canadá (Prescott, 2008; Heater y col., 2011).

Los perros se asocian a la serovar *canicola* como hospedadores de mantenimiento, mientras que las ratas son reservorios de la serovar *icterohaemorrhagiae* (Prescott, 2008; Alton y col., 2009; Bryan y col., 2011). *Leptospira interrogans* es causa de infección en caninos salvajes (Miller y col., 2009). La leptospirosis en perros es reconocida como un factor de riesgo para el humano (Romero y Sánchez, 2009). El aumento de lluvias se asocia con la prevalencia de leptospirosis en perros (Ko y col., 1999; Pinto-Jorge y col., 2011). Un perro infectado puede ser un portador asintomático de leptospira y arroja microorganismos a través de la orina por toda su vida (Breiner y col., 2009).

2.5. Patogenia

La infección es transmitida vía directa o indirecta al contacto con las leptospiras, la invasión patógena de la espiroqueta es alta, infecta a través de animales o medios contaminados (Farr, 1995). Un animal infectado puede permanecer asintomático y eliminar organismo infecciosos a través de la orina durante toda la vida (Lee y col., 2002).

Las fuentes de leptospiras son esencialmente mamíferos domésticos y silvestres que albergan las espiroquetas en los túbulos contorneados proximales de los riñones y eliminan intermitentemente las leptospiras en grandes números (10^6 /mL) a través de la orina hacia el ambiente, alrededor del séptimo día post-infección (Ellis y Michna, 1976). Por consiguiente, la orina de los animales infectados presenta una potencial fuente de infección (Zuerner y col., 2011).

La leptospirosis tiene un período de incubación de 3 a 20 días, variable según la virulencia y cantidad de microorganismos y el estado fisiológico e inmunológico del hospedador (Cinco, 2010). Para sobrevivir en el ambiente, la bacteria necesita ser capaz de detectar y moverse hacia condiciones favorables y lejos de condiciones desfavorables. La quimiotaxis y motilidad, que permite a las bacterias detectar y responder a numerosos cambios en su ambiente, son críticos para la virulencia de las leptospiras patógenas. La quimiotaxis permite a la bacteria penetrar las barreras de los tejidos del hospedador durante la infección, ésta se basa en un movimiento direccional hacia un atrayente o lejos de un repelente (Dong y col., 2010). La adaptación a diversos estímulos ambientales fuera y dentro del hospedador y la habilidad para sobrevivir en el torrente sanguíneo contribuyen para que las leptospiras puedan causar enfermedad, al migrar a través de los espacios intercelulares (Patarakul y col., 2010).

Las leptospiras entran al cuerpo a través de membranas mucosas de los ojos, nariz o garganta y a través de cortes o abrasiones de la piel, e invaden los tejidos y líquidos del hospedador (Cinco, 2010). Después del contacto, las espiroquetas se diseminan por vía sanguínea y se mueven hacia la hemoglobina, movimiento que está relacionado con su virulencia (Yuri y col., 1993), para multiplicarse en los órganos blanco tales como los riñones, hígado, pulmones y útero resultando en un amplio espectro de manifestaciones clínicas (WHO, 2011). La fase septicémica o leptospiremia, se caracteriza por la aparición de anticuerpos y leptospiras en sangre (Bourhy y col., 2011).

Cuando penetran por abrasiones de la piel, las leptospiras se encuentran en sangre a las 2 horas post-infección (p.i.), las cuales van aumentando entre las 8 y 96 horas p.i. llegando a su pico y empiezan a disminuir a las 144 h p.i. Las leptospiras son detectadas engolfadas por las células endoteliales vasculares, las cuales se hinchan, causando daño de la membrana basal vascular y frecuentemente agregadas alrededor de los capilares en la dermis y tejido subcutáneo bajo el sitio de infección. Se pueden encontrar hemorragias en la

dermis alrededor del sitio de infección antes de la aparición de hemorragias en órganos internos. La capa de queratinocitos intactos es una barrera muy eficiente que puede prevenir la infiltración de leptospiras al hospedador. En las capas musculares, las leptospiras son detectadas agregadas alrededor de los capilares a las 24 h p.i., las cuales son frecuentemente fagocitadas por neutrófilos y macrófagos. Después se diseminan al hígado, pulmones, riñones, útero, glándula mamaria y otros tejidos, de casi todos los animales dentro de las 96 horas p.i. En el hígado las leptospiras son encontradas en las membranas de los hepatocitos, también como un depósito granular en las células de Kupffer después de las 24 h p.i. Los pulmones pueden mostrar leptospiras en los focos de hemorragias y rara vez alrededor o fuera de éstas. En los riñones, un gran número de leptospiras típicas son vistas en los espacios glomerulares (96 h p.i.). Se pueden encontrar leptospiras alineadas rodeando los capilares peritoneales 72 h p.i. (Yan Zhang y col., 2012).

Es evidente que las leptospiras penetran la piel erosionada y rápidamente establecen una infección sistémica por atravesar las barreras de los tejidos. Es probable que *Leptospira interrogans* pueda moverse a través de la barrera de los tejidos por asociación con los vasos sanguíneos, ya que las leptospiras son detectadas agregadas alrededor de los capilares en la capa muscular. Las leptospiras como otras espiroquetas, se diseminan a través de las uniones intercelulares y también se pueden detectar en el citoplasma de las células endoteliales del hospedador (Merien y col., 1997; Barocchi y col., 2002). *L. interrogans* puede alterar la dinámica del citoesqueleto de actina en las líneas de células endoteliales microvasculares y rápidamente trasladarse hacia las capas de células adyacentes (Martinez-Lopez y col., 2010).

La adherencia a las células y a componentes de las matrices extracelulares (MEC) del hospedador es probablemente un paso necesario para que las leptospiras penetren, se diseminen y persistan en los tejidos de los hospedadores mamíferos. Se han encontrado un amplio rango de moléculas de adhesión en las leptospiras

que le dan la habilidad para migrar a través de los tejidos, muchas proteínas leptospirales tienen afinidad por las MEC y superficies de las células (Choy y col., 2007; Atzingen y col., 2008; Lin y Chang, 2008). Se produce una fuerte afinidad de unión por la elastina de la piel y de las estructuras vasculares (Longhi y col., 2009; Verma y col., 2010; Lin y col., 2008). Algunas de estas proteínas tienen una fuerte afinidad de adherencia a la elastina de la piel y la elastina de la aorta, y puede facilitar la adherencia de leptospiras en la capa interna de la piel rica en elastina también como en las estructuras vasculares (Pinne y col., 2010).

No se producen hemorragias en piel si la vía de infección es por mucosas; los mecanismos de las hemorragias causadas por *Leptospira* no han sido dilucidadas, sin embargo, los factores que contribuyen con estas pueden involucrar la acción directa de toxinas y procesos autoinmunes. El daño es directamente provocado por leptospiras intactas en las células endoteliales capilares, y/o por sus productos tóxicos. El depósito de anticuerpos y complemento en las membranas basales puede ser llevado a cabo por procesos autoinmunes (Nally y col., 2004). Una gran carga de bacterias es un factor importante para causar hemorragias. La respuesta inmune humoral parece no estar asociada con la patogénesis de las hemorragias de la piel. Los animales infectados con leptospiras, vía conjuntival y por heridas de piel, desarrollan signos clínicos y cambios patológicos similares (Lourdault y col., 2009). Las leptospiras patógenas son capaces de sobrevivir y ser más resistentes a la acción del sistema del complemento (Barbosa y col., 2009; Barbosa y col., 2010), los neutrófilos, los cuales constituyen la mayor población de fagocitos intravasculares, juegan un importante papel en el control de las leptospiras. Una vez fagocitadas las leptospiras por los neutrófilos, la muerte intracelular ocurre a través de la maquinaria oxígeno-dependiente, incluyendo principalmente el efecto de H₂O₂ (Murgía y col., 2002). Sin embargo, algunos modelos experimentales han demostrado que la fagocitosis de leptopiras patógenas por neutrófilos y macrófagos es solo efectiva si el patógeno es opsonizado por IgG (Wang y col., 1984a; Wang y col., 1984b; Banfi y col., 1982). También se ha observado en los macrófagos humanos que las leptospiras fagocitadas son capaces de escaparse

de los fagosomas hacia el citosol, donde proliferan y activan apoptosis (Evangelista y Coburn, 2010).

Las leptospiras patógenas llevan a cabo diferentes estrategias para la invasión. Una es la capacidad para adherirse a las células del hospedador y a la matriz extracelular (ECM) como muchos otros patógenos lo hacen. Las leptospiras patógenas virulentas se adhieren al endotelio, fibroblastos, epitelio renal y monocitos/macrófagos en cultivos de líneas celulares *in vitro* pero no los organismos atenuados en cultivo (Merien y col., 1997). No son parásitos intracelulares pero pueden introducirse en las células residiendo en estas transitoriamente, en células no fagocíticas normales los microorganismos entran y se encuentran en fagosomas en el citoplasma (Barocchi y col., 2002). Al utilizar éste mecanismo de entrada a la célula, le permite a las leptospiras diseminarse a órganos blanco, evadiendo la respuesta inmunológica, el microorganismo parece sobrevivir a menos que estén presentes anticuerpos específicos (Cinco, 2010).

Al llegar al hígado o riñones las bacterias se adhieren a componentes de la ECM entre los intersticios de los hepatocitos y las células epiteliales tubulares. Las cepas infecciosas de *Leptospira* se adhieren a los componentes de la ECM tales como colágeno tipo I, tipo IV, laminina y fibronectina (Atzingen y col., 2008; Barbosa y col., 2010). Se han estudiado más de 200 proteínas de la membrana externa implicadas en la patogenia de la leptospirosis que se adhieren a las ECM mencionadas. Debido a que las células epiteliales de los túbulos proximales del riñón producen proteoglicanos, éstas pueden facilitar la colonización del riñón, especialmente en animales hospedadores (Farr, 1995; Sitprija y col., 1980; Ristow y col., 2009).

Uno de los receptores involucrados en la adhesión a los neutrófilos, en condición no opsónica, es un receptor del complemento, a través de su dominio de unión a fibronectina, esto confirma la capacidad de las leptospiras de absorber fibronectina (Murgia y col., 2002). En cambio, las leptospiras parecen más susceptibles a la

actividad bactericida de los péptidos catiónicos de los neutrófilos, que desempeñan un papel importante en la muerte oxígeno independiente. En general las leptospiras son escasamente fagocitadas y la muerte ocurre solo en presencia de anticuerpos específicos.

Más que resistencia a la fagocitosis la invasión de leptospiras parece estar relacionada a otra defensa innata que es el complemento. El complemento es el mayor componente del sistema inmune innato, y está involucrado en la protección contra microorganismos invasores debido a su actividad de opsonización, inflamatoria y lítica. Una vez activado el complemento puede destruir microorganismos en pocos minutos, a menos que éstos inhiban la actividad del complemento mediante la adquisición de las proteínas de control del complemento del hospedador o expresando sus propias moléculas inhibitorias del complemento (Cinco, 2010).

Los antígenos de leptospiras son encontrados en las células de los túbulos proximales renales en grandes cantidades en los intersticios. La membrana externa de las leptospiras contiene componentes antigénicos que incluyen lipoproteínas, lipopolisacáridos y peptidoglicanos, endotoxinas que pueden causar daño renal, disfunción tubular e inflamación (Alves y col., 1991).

Durante la leptospiremia, la migración de las leptospiras al útero y oviducto de animales no gestantes, y a la placenta en gestantes, producen congestión capilar, y células endoteliales vacuoladas y efectos de necrobiosis y apoptosis (Brihuega y col., 2011), además se observan leptospiras en las células endoteliales. Estos daños son capaces de producir muerte embrionaria temprana y aborto en todos los estadios de gestación y las leptospiras pueden encontrarse en riñones, adrenales e hígado de fetos abortados (Kingscote y Wilson, 1986). La inflamación que pueda producirse a nivel de cotiledones trae como consecuencia retención de placenta, además de que puede causar infertilidad, e incluso esterilidad en casos extremos.

2.6. Inmunología

Las lipoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) de las leptospiras estimulan una respuesta celular de linfocitos T. La leptospirosis puede ser persistente a pesar de una fuerte respuesta inmune, esto sugiere que las leptospiras son capaces de evadir la respuesta innata y adaptativa y la respuesta inmune provocada por las leptospiras en forma natural no es efectiva en la eliminación del patógeno. Las leptospiras presentan determinantes antigénicos de Linfocitos T y B de las proteínas de membrana externa (Lin y col., 2011).

Los microorganismos patógenos inducen una respuesta inmune humoral durante la infección, la cual específicamente responde a los antígenos a través de una interacción específica entre los anticuerpos y los epitopos de los antígenos. Se ha demostrado que epitopos combinados de células B y T de proteínas de membrana externa leptospiral (OmpL1 y LipL41) inducen una respuesta inmune Leptospira-específica, lo cual sugiere que estos epitopos en lugar de proteínas enteras pueden ser usados para desarrollar vacunas de Leptospiras.

Los linfocitos T CD4⁺ juegan un papel crítico en la respuesta inmune durante la infección bacteriana. Se ha demostrado que los linfocitos T CD4⁺ se diferencian en células Th1, Th2 y últimamente en Th17 (importante para bacterias intracelulares). Las células Th1 se caracterizan por su producción de IFN γ y están involucradas en la inmunidad celular y las células Th2 producen IL-4 y son requeridas para la inmunidad celular. Los epitopos de proteínas de membrana externa pueden inducir una fuerte respuesta inmune mediada por células también como una respuesta humoral. La identificación de epitopos inmunodominantes pueden facilitar enormemente el desarrollo de nuevas vacunas para leptospiras que puedan proporcionar protección cruzada de los diferentes serogrupos o serovares (Lin y col., 2011).

2.7. Signos y lesiones

Los signos clínicos de la leptospirosis están influenciados directamente por la virulencia de la serovar infectante, la dosis del inóculo, la edad, susceptibilidad y condición física de los animales. El período de incubación promedio de la leptospirosis es de 3 a 20 días. La infección aguda puede ser potencialmente letal o en hospedadores de mantenimiento puede causar una enfermedad crónica con escasa signología clínica; la mayoría de las infecciones resultan en ligera enfermedad con signos inespecíficos como fiebre y debilidad muscular. El cuadro clínico de una leptospirosis severa se caracteriza por disfunción hepática, renal y hemorragias. Ocasionalmente se puede observar orina con sangre, decaimiento, anorexia y muerte en pocas horas (Draghi y col., 2011). Los animales por lo general mueren de choque séptico con falla multiorgánica (Goris y col., 2011). La infección puede producir hemorragia pulmonar, renal y hepática (Levett, 2001).

En la infección leptospiral los animales muertos pueden mostrar a la necropsia hepatomegalia, esplenomegalia, e ictericia en mucosas y tejido subcutáneo, y hemorragias petequiales diseminadas en casi todos los órganos y tejidos. Los hallazgos histológicos muestran infiltrados inflamatorios difusos y las leptospiras se encuentran en muchos órganos, incluyendo pulmón, hígado y riñones (Areal, 1962). La leptospirosis causa una vasculitis infecciosa. En la forma severa hay alteraciones hemodinámicas e hipovolemia debido a deshidratación y al efecto directo de las toxinas que dañan el endotelio vascular e incrementan la permeabilidad (Daher y col., 1999).

En la lesión cutánea y de mucosas se encuentra una alteración inflamatoria aguda, alrededor del tejido dañado, caracterizada por infiltración de neutrófilos, macrófagos, linfocitos e histiocitos (48 h p.i.). En el estadio tardío, después de las 72-144 h p.i., las células inflamatorias en el tejido subcutáneo y en las capas musculares disminuyen gradualmente y son remplazadas por proliferación de fibroblastos.

En los riñones se detectan áreas de necrosis cortical con marcado edema intersticial, glomerulitis, nefritis intersticial (Oois y col., 1972) con infiltración de neutrófilos, linfocitos, monocitos, células plasmáticas y ocasionalmente infartos, la nefritis tubulointersticial y necrosis tubular aguda son los hallazgos histológicos más comunes, pero se puede desarrollar una fibrosis tubulointersticial caracterizada por el depósito de proteínas de matriz extracelular como colágenos tipo I y tipo IV si la infección leptospiral crónica no es tratada (Tian y col., 2006; Tian y col., 2011). Varios factores están involucrados en el daño renal agudo en la leptospirosis, incluyendo acción nefrotóxica directa de las leptospiras, hiperbilirrubinemia, rabdomiolisis, e hipovolemia. Las anomalías en la función tubular preceden una disminución en la tasa de filtración glomerular, lo cual podría explicar la alta frecuencia de hipokalemia. En hígado se observan focos de necrosis con infiltración de células mononucleares y neutrófilos. En bazo los centros germinativos son escasos y se encuentran focos de hemorragias. Los linfonódulos muestran hemorragias severas (Draghi y col., 2011).

Inicialmente al penetrar las leptospiras por piel se observan hemorragias que se caracterizan por petequias y placas coalescentes, diseminadas en la lesión hasta el tejido subcutáneo y músculo que progresan con el tiempo. Posteriormente se pueden desarrollar hemorragias petequiales en pulmones (a las 72 horas p.i.), a nivel alveolar, que se manifiestan más severas después de los 4-6 días p.i. En el hígado se aprecian hemorragias, edema y focos de necrosis en hígado a los 4 días p.i. Los riñones también muestran hemorragias extensivas en la superficie peritoneal a los 4-6 días p.i. Además las células del epitelio tubular presentan necrosis e infiltración de eritrocitos en su luz, presentando hematuria después de los 4-6 días p.i. (Yan Zhang y col., 2012).

En las infecciones por *Leptospira* de animales preñados se producen alteraciones en los tejidos placentarios, lo que provoca aborto y muerte embrionaria. Las leptospiras producen congestión de los capilares placentarios y células

endoteliales con vacuolas citoplasmáticas, células en necrobiosis e indicios de apoptosis. Se presenta pérdida de la integridad de las uniones intercelulares endoteliales, alteraciones de la estructura celular y ruptura de la membrana celular. *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* concurre con procesos de necrosis y apoptosis (Barocchi y col., 2002; Jin y col., 2009; Brihuega y col., 2011).

En animales en general, la infección por *Leptospira* es una frecuente causa de insuficiencia renal y hepática (perros), abortos, muerte fetal, infertilidad (cerdos, vacas y equinos), uveítis (caballos) anemia hemolítica (ovinos y bovinos) y ocasionalmente la muerte (Davidson y col., 1987; Donahue y col., 1991; Smyth y col., 1999).

Como dato adicional, se sabe que en la mayoría de los casos de la leptospirosis humana, los pacientes desarrollan una enfermedad parecida a la influenza mientras que la diarrea, vómitos, meningitis o la uveítis pueden ocurrir en algunos casos (Ciceroni y col., 1995). Del 5 al 15% de los casos, las complicaciones multisistémicas graves pueden desarrollar, insuficiencia renal, ictericia y en ocasiones falla pulmonar.

2.8. Diagnóstico

Las leptospiras son bacterias difíciles de cultivar, el método de diagnóstico más utilizado actualmente es sobre la base de respuesta serológica del huésped a la infección del organismo, detectado por la prueba de aglutinación microscópica (Wagenaar y col., 2000).

La mayoría de los casos de leptospirosis son diagnosticados por serología para detectar anticuerpos, debido a que el cultivo de leptospiras a partir de líquidos biológicos (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, leche) toma varias semanas, además de ser costoso (Raizi y col., 2010; Bourhy y col., 2011).

La prueba de aglutinación microscópica (MAT), conocida como la prueba de oro, es la técnica de referencia más utilizada (Ahmad y col., 2005), a pesar de que se ha encontrado que la tasa de resultados falsos negativos es de 13%. La MAT Está basada en la evaluación de muestras de sueros pareados y tiene la habilidad de aglutinar cepas de serovares de referencia con una batería de antígenos vivos de *Leptospira*, identificando diferentes serogrupos, subdivididos en serovares (WHO, 2003).

El diagnóstico de la leptospirosis es complicado por el alto grado de reacción cruzada que hay entre las diferentes serovares. Además, las serovares no patógenas de leptospiras como *Leptospira biflexa*, son consideradas contaminantes ambientales y reaccionan de forma cruzada con suero de conejo contra serovares patógenas de leptospiras (Taniyama y col., 1972). En la actualidad la MAT es laboriosa, por lo cual la prueba inmunoabsorbente liagada a enzimas (ELISA) puede ser un método alternativo para el diagnóstico de leptospiras patógenas, mas sin embargo está muy limitado su uso en perros (Levett, 2001; Sykes y col., 2011). El inconveniente con MAT y ELISA es que no se puede diferenciar entre animales infectados o vacunados. La identificación de antígenos de *Leptospira* se puede realizar durante la infección de animales vacunados o animales infectados.

La técnica de aglutinación microscópica (MAT), conocida como la prueba de oro, es la técnica de referencia más utilizada (Ahmad y col., 2005), a pesar de que se ha encontrado que la tasa de resultados falsos negativos es de 13%. La MAT Está basada en la evaluación de muestras de sueros pareados y tiene la habilidad de aglutinar cepas de serovares de referencia con una batería de antígenos vivos de *Leptospira* (WHO, 2003). La identificación de serovares de leptospiras aisladas se identifican por la cruz de aglutinación, a través de la prueba de absorción (CAAT). Aunque este método y el MAT son laboriosos por cuestión de tiempo, y se requiere una colección extensa de cepas de referencia y de antisueros de conejo (Cerquiera y col., 2009). Por esta razón las diferentes técnicas moleculares están

creando la forma de aislar rápidamente y en menos tiempo. Las técnicas moleculares y MAT y CAAT deben usarse en el aislamiento de *Leptospira* y en la vigilancia de la leptospirosis.

La prueba de MAT es altamente específica, pero su baja sensibilidad (30-60%) la hace inadecuada para el diagnóstico de leptospirosis aguda (Cumberland y col., 1999). Otras pruebas serológicas como hemaglutinación indirecta (Levett y Whittington, 1998), aglutinación en microcápsula, aglutinación en látex (Arimitsu y col., 1998), y ELISA (Winslow y col., 1997) no ofrecen niveles satisfactorios de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico en fase temprana de leptospirosis, en la detección de anticuerpos IgM (Guerreiro y col., 2001). La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa es precoz y sensible, pero su alto costo y la necesidad de tener un buen control de calidad son los mayores inconvenientes para su aplicación (Daher y col., 2010).

Hay varios problemas potenciales asociados con el mantenimiento de las cepas de referencia de *Leptospira*; La contaminación de cepas con otras bacterias o leptospirosas saprofitas de rápido crecimiento, el etiquetado incorrecto o el cambio de cepas (Chappel y col., 2004). La contaminación por otras bacterias se reconoce fácilmente pero el cambio de cepas es un grave error. Además, si no hay un adecuado control de calidad que se lleve a cabo sobre las cepas de referencia, estos problemas no pueden ser identificados de manera oportuna. Esto podría afectar adversamente la investigación de brotes y estudios epidemiológicos (Cerqueira y col., 2010).

2.9. Profilaxis y tratamientos

La inmunidad a las leptospirosas es serogrupo específica, y el conocimiento de los serogrupos, que comúnmente causan enfermedad en una región geográfica particular, es importante para el desarrollo de vacunas (Sykes y col, 2011).

Los tratamientos que en la actualidad actúan sobre las leptospiras son doxyciclina, amoxicilina, ampicilina, eritromicina, azitromicina, fluoroquinolona, cefalosporinas (Harris y col., 2011).

III. Justificación

De acuerdo a los antecedentes descritos y considerando que en el municipio de Torreón, Coahuila, no hay estudios de leptospirosis en perros, la finalidad del presente trabajo de investigación es dar a conocer las diferentes serovariedades de leptospiras que están presentes en suero de perros, así como describir las lesiones de los riñones y su asociación con anticuerpos de leptospiras.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo General

a) Analizar la frecuencia de leptospirosis en caninos del municipio de Torreón, Coahuila, México.

4.2. Objetivos específicos

a) Identificar las serovariedades de leptospiras más frecuentes que afectan a los caninos del municipio de Torreón, Coahuila, México, utilizando la prueba de microaglutinación.

b) Identificar lesiones histológicas en riñón compatibles con infección por leptospirosis.

c) Relacionar los hallazgos histopatológicos con los resultados serológicos

V. Material y métodos

Marco de referencia. El municipio de Torreón se encuentra en la zona norte en el estado de Coahuila y está ubicado en las coordenadas 25° 32´ 40" latitud norte y 103° 26´ 30" longitud oeste, a una altitud promedio de 1.140 metros sobre el nivel del mar. Colinda con el municipio de Matamoros al Norte, Viesca en la zona oriente y con el estado de Durango al suroeste.

El clima en Torreón, Coahuila, es árido, muy seco, cálido tanto en primavera como en verano, con invierno fresco. La precipitación es escasa, encontrándose la atmosfera desprovista de humedad, con una precipitación media anual de 239.4 mm, siendo el periodo de máxima precipitación entre los meses de agosto, septiembre y octubre.

Toma de muestras. Se analizaron 62 perros criollos, callejeros, machos y hembras, mayores de 1 año de edad, en malas condiciones corporales, colectados por el Centro de Control Canino del municipio de Torreón, Coahuila, México. Se tomaron 43 muestras de sangre sin anticoagulante para la separación de suero, se mantuvieron en congelación hasta su análisis por la técnica de aglutinación microscópica (MAT) que se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Palo Alto, Del. Cuajimalpa, México, D.F.), donde se utilizaron 12 serovariedades de leptospiros de referencia nacional e internacional. Se sacrificaron los 62 perros y se les practicó la necropsia e histopatología en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Regional Laguna.

Principio de MAT. El método es simple y consiste en mezclar el suero a estudiar con leptospiros cultivadas y para luego evaluar el grado de aglutinación usando un microscopio de campo oscuro. De acuerdo con el Subcomité de Taxonomía en *Leptospira*, el punto de corte se define como la dilución del suero que muestre el 50% de aglutinación, dejando 50% de células libres, cuando se le compara con un

control que consiste en un cultivo diluido 1:2 en una solución amortiguadora de fosfato salino (OMS, 2008).

Procedimiento de MAT. La MAT se basa en la antigua prueba de lisis aglutinación desarrollada por Martín y Petit (1918) y modificada posteriormente por varios investigadores. La MAT permanece como prueba de referencia y es usada para detectar anticuerpos y determinar sus títulos. Esta prueba puede ofrecer una indicación del serogrupo al cual pertenece el serovar infectante, pero raramente lo identifica. La MAT detecta tanto los anticuerpos tipo IgM como IgG. La prueba no puede ser estandarizada ya que utiliza antígenos vivos y factores como la edad y densidad del antígeno en el cultivo puede influir en el título de aglutinación (OMS, 2008).

Materiales y reactivos. Se usaron placas plásticas para microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. No se requiere un tipo particular de placa si los resultados se leen después de transferir una pequeña gota del contenido con un asa metálica a un portaobjetos de vidrio. Sin embargo, si se va a observar la placa directamente bajo un microscopio invertido de campo oscuro, se necesita de una placa plástica de buena calidad óptica.

Las serovariedades utilizadas para el estudio fueron tres cepas de aislamiento nacional, *Portland-vere* (Cepa Sinaloa ACR), *Hardjo* (Cepa Inifap) e *Icterohaemorrhagiae* (Cepa Palo Alto) (Navarrete-Espinosa y col., 2006), y cepas de reconocimiento internacional como *Canicola*, *Bratislava*, *Pyrogenes*, *Icterohaemorrhagiae*, *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).

Estudio histopatológico. Se tomaron muestras de riñón de 0.5 cm de grosor que abarcaban la corteza, médula y pelvícula, se fijaron en una solución de formalina al 10% amortiguada con fosfatos a pH 7.4, en una relación 1:10 (muestra:formol), se procesaron con la técnica de rutina de inclusión en parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron con un microscopio de luz visible para su descripción e interpretación.

Se evaluaron los riñones cualitativamente y cuantitativamente, de acuerdo al grado de la lesión, clasificándolos en las siguientes categorías de nefritis: Grado 0, Negativo: Sin alteraciones histológicas significativas. Grado 1, Incipiente: Infiltración linfocitaria focal o multifocal, apenas perceptible, que involucra los intersticios sin alterar la estructura de los túbulos. Grado 2, Leve: Infiltración linfocitaria focal o multifocal, que involucra los intersticios con alteración, apenas perceptible, de la estructura de los túbulos. Grado 3, Moderado: Infiltración linfocitaria focal o multifocal, que involucra los intersticios con alteración de la estructura de los túbulos y fibroplasia y atrofia de túbulos apenas perceptible. Grado 4, Severo: Infiltración linfocitaria focal o multifocal, que involucra los intersticios con alteración de la estructura de los túbulos, fibroplasia y atrofia de túbulos difusa en la inflamación.

Se enumeraron lesiones misceláneas con la siguiente clasificación: SN, Otras alteraciones **Sin nefritis** intersticial; y CN, Otras alteraciones **Con nefritis** intersticial.

VI. Resultados

Técnica de MAT. Los resultados serológicos mostraron 29/43 (67.44%) muestras positivas a MAT, 9/43 (20.93%) sospechosas, y 5/43 (11.62%) negativas. El cuadro 1 presenta las serovariedades analizadas y el porcentaje de positividad. El cuadro 2 presenta el porcentaje de positividad de cada serovar en diluciones de 1:50 a 1:1600.

Cuadro 1. Serovariedades analizadas y seropositividad de leptospirosis en caninos de Torreón, Coahuila.

Serovar.	Positivas	%
Canicola	26/43	60.46%
Portland-vere	26/43	60.46%
Bratislava	17/43	39.53%
Palo Alto	14/43	32.55%
Pyrogenes	13/43	30.23%
Icterohaemorrhagiae	11/43	25.58%
Grippotyphosa	3/43	6.97%
Pomona	3/43	6.97%
Inifap	2/43	4.65%
Wolffi	0/43	0
Hardjo	0/43	0
Tarassovi	0/43	0

Cuadro 2. Serovariedades analizadas y títulos de leptospirosis en caninos de Torreón, Coahuila.

Serovar.	1:50	%	1:100	%	1:200	%	1:400	%	1:800	%	1:1600	%
Canicola	8	18.60%	1	2.32%	6	13.95%	7	16.28%	1	2.32%	3	6.97%
Portland-vere	4	9.30%	5	11.63%	3	6.97%	6	13.95%	5	11.63%	3	6.97%
Bratislava	8	18.60%	3	6.97%	4	9.30%	Neg.	-	2	4.65%	Neg.	-
Palo Alto	3	6.97%	5	11.63%	2	4.65%	3	6.97%	1	2.32%	Neg.	-
Pyrogenes	7	16.28%	3	6.97%	1	2.32%	2	4.65%	Neg.	-	Neg.	-
Icterohaemorrhagiae	10	23.25%	1	2.32%	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-
Grippotyphosa	2	4.65%	1	2.32%	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-
Pomona	2	4.65%	1	2.32%	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-
Inifap	2	4.65%	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-
Wolffi	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-
Hardjo	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-
Tarassovi	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-

Análisis histológico de riñones. Los resultados del análisis histológico de los riñones mostraron 25.81% (16/62) con Grado 0 (sin alteraciones significativas), 74.19% (46/62) presentaron alteraciones con la siguiente clasificación: 32.25% (20/62) Grado 1 (Incipiente), 19.35% (12/62) Grado 2 (Leve), 11.29% (7/26) Grado 3 (Moderado), 3.22% (2/62) Grado 4 (Severo).

El 8.06% (5/62) SN mostró las siguientes alteraciones: a. Infiltración de sales minerales leve en túbulos de médula 3/62 (4.83%); b. Amiloidosis 1/62 (1.61%); y c. Glomerulonefritis 1/62 (1.61%). El 8.06% (5/62) CN mostró las siguientes alteraciones: a. Fibroplasia glomerular 1/62 (1.61%); b. Glomerulonefritis 3/62 (4.83%); c. Infiltración de sales minerales leve en túbulos de medula 3/62 (4.83%); y d. Nefritis supurativa 1/62 (1.61%). Algunos casos CN mostraron dos o más alteraciones.

Cuadro 3. Seropositividad de diferentes serovariedades de leptospiras asociadas a riñones sin nefritis intersticial, Grado 0.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Canicola	3	0	2	1	0	0	6
Bratislava	4	0	1	0	0	0	5
Portland-vere	1	1	0	2	1	0	5
Palo Alto	0	3	0	1	0	0	4
Icterohaemorrhagiae	3	0	0	0	0	0	3
Pyrogenes	3	0	0	0	0	0	3
Grippothyphosa	1	0	0	0	0	0	1
Pomona	1	0	0	0	0	0	1
Inifap	1	0	0	0	0	0	1
Total	17	4	3	4	1	0	29

De las muestras analizadas con MAT y con histología, 11/43 (25.58%) no presentaron alteraciones significativas, Grado 0, sin embargo se encontraron títulos de varias serovariedades de leptospiras siendo los títulos 1:50 los más frecuentes y las serovariedades encontradas fueron *Canicola*, *Bratislava*, *Portland-vere*, *Palo Alto*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pyrogenes*, *Grippothyphosa*, *Pomona* e *INIFAP* (Cuadro 3).

Cuadro 4. Seropositividad de diferentes serovariedades de leptospiras asociadas a riñones con nefritis intersticial Grado 1.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Canicola	2	0	2	0	0	0	4
Bratislava	1	1	1	0	0	0	3
Portland-vere	1	3	1	1	0	0	6
Palo Alto	1	0	0	0	0	0	1
Icterohaemorrhagiae	2	0	0	0	0	0	2
Pyrogenes	1	1	0	0	0	0	2
Grippothyphosa	1	0	0	0	0	0	1
Pomona	0	1	0	0	0	0	1
Inifap	1	0	0	0	0	0	1
Total	10	6	4	1	0	0	21

Los sueros positivos de perros con nefritis intersticial Grado 1, fueron 13/43 (30.23%) y presentaron con más frecuencia títulos de 1:50, encontrándose las mismas serovariedades que en los riñones con Grado 0 siendo las más frecuentes *Canicola* y *Portland-vere* (Cuadro 4).

Cuadro 5. Seropositividad de diferentes serovariedades de leptospiras asociadas a riñones con nefritis intersticial Grado 2.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Canicola	2	0	1	2	1	3	9
Bratislava	3	1	1	0	2	0	7
Portland-vere	1	1	1	1	2	3	9
Palo Alto	1	0	2	1	1	0	5
Icterohaemorrhagiae	3	0	0	0	0	0	3
Pyrogenes	1	2	0	2	0	0	5
Grippothyphosa	0	1	0	0	0	0	1
Pomona	0	0	0	0	0	0	0
INIFAP	0	0	0	0	0	0	0
Total	11	5	5	6	6	6	39

Los sueros de animales con nefritis intersticial Grado 2, 12/43 (27.90%) mostraron títulos de 1:50 para las serovariedades *Canicola*, *Bratislava*, *Portland-vere*, *Palo*

Alto, *Icterohaemorrhagiae* y *Pyrogenes*, títulos de 1:100 *Bratislava*, *Portland-vere*, *Pyrogenes* y *Grippothyphosa*, títulos de 1:200 para *Canicola*, *Bratislava*, *Portland-vere* y *Palo Alto*, títulos de 1:400 para *Canicola*, *Portland-vere*, *Palo Alto* y *Pyrogenes*, títulos de 1:800 para *Canicola*, *Bratislava*, *Portland-vere*, *Palo Alto*, y títulos de 1:1600 para *Canicola* y *Portland-vere* (Cuadro 5).

Cuadro 6. Seropositividad de diferentes serovariedades de leptospiras asociadas a riñones con nefritis intersticial Grado 3.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Canicola	0	0	1	3	0	0	4
Bratislava	0	1	1	0	0	0	2
Portland-vere	1	0	0	2	2	0	5
Palo Alto	2	1	0	1	0	0	4
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	3	0	0	0	0	0	3
Pyrogenes	2	0	1	0	0	0	3
<i>Grippothyphosa</i>	0	0	0	0	0	0	0
Pomona	1	0	0	0	0	0	1
INIFAP	0	0	0	0	0	0	0
Total	9	2	3	6	2	0	22

En el caso de los sueros asociados a riñones con nefritis intersticial Grado 3, 6/43 (13.95%) fueron seropositivos con títulos de 1:800 con la serovariedad *Portland-vere*, y de 1:400 *Canicola*, *Portland-vere* y *Palo Alto* (Cuadro 6).

Cuadro 7. Seropositividad de diferentes serovariedades de leptospiras asociadas a riñones con nefritis intersticial Grado 4.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
Canicola	0	1	0	0	0	0	1
Bratislava	0	0	0	0	0	0	0
Portland Vere	0	0	1	0	0	0	1
Palo Alto	0	0	0	0	0	0	0
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	0	0	0	0	0	0	0
Pyrogenes	0	0	0	0	0	0	0
<i>Grippothyphosa</i>	0	0	0	0	0	0	0
Pomona	0	0	0	0	0	0	0
INIFAP	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	1	1	0	0	0	2

Un caso (2.32%) severo de nefritis intersticial Grado 4, presentó dos serovariedades, *Canicola* con título 1:100 y *Portland-vere* con título 1:200 (Cuadro 7).

Cuadro 8. Total de muestras seropositivas con diferentes serovariedades de leptospiras, asociadas a riñones con nefritis intersticial y sin alteraciones.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
<i>Canicola</i>	7	1	6	6	1	3	24
<i>Bratislava</i>	8	3	4	0	2	0	17
<i>Portland Vere</i>	4	5	3	6	5	3	26
<i>Palo Alto</i>	4	4	2	3	1	0	14
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	11	0	0	0	0	0	11
<i>Pyrogenes</i>	7	3	1	2	0	0	13
<i>Grippothyphosa</i>	2	1	0	0	0	0	3
<i>Pomona</i>	2	1	0	0	0	0	3
<i>INIFAP</i>	2	0	0	0	0	0	2
Total	47	18	16	17	9	6	113

Cuadro 9. Total de muestras seropositivas con diferentes serovariedades de leptospiras asociadas a nefritis intersticial.

Serovar/Títulos	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	Total
<i>Canicola</i>	4	1	4	5	1	3	18
<i>Bratislava</i>	4	3	3	0	2	0	12
<i>Portland Vere</i>	3	4	3	4	4	3	21
<i>Palo Alto</i>	4	1	2	2	1	0	10
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	8	0	0	0	0	0	8
<i>Pyrogenes</i>	4	3	1	2	0	0	10
<i>Grippothyphosa</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>Pomona</i>	1	1	0	0	0	0	2
<i>INIFAP</i>	1	0	0	0	0	0	1
Total	30	14	13	13	8	6	84

El cuadro 9 muestra el total de serovariedades encontradas en sueros de perros con diferentes grados de nefritis intersticial siendo las más importantes *Portland-vere* y *Canicola* con títulos de 1:50 hasta 1:1600.

VII. Discusión

La leptospirosis es una enfermedad emergente en los países en desarrollo y su principal problema es la zoonosis ya que se producen brotes severos en todo el mundo sobre todo en épocas de lluvias y desastres de inundaciones. El perro es el principal portador y transmisor de la enfermedad hacia los humanos, por lo cual es importante realizar estudios sobre el tema en diferentes regiones del país para conocer la situación epidemiológica de la leptospirosis.

Para conocer la frecuencia de leptospirosis en caninos del municipio de Torreón, Coah., se analizaron sueros con la técnica de MAT, ya que en la actualidad sigue siendo la “prueba de oro” para el diagnóstico de leptospirosis, oficialmente utilizada por diversos investigadores (Burriel, 2010).

En Brasil estudios realizados con MAT muestran una prevalencia de leptospirosis en todo el país de 26%, siendo los serotipos más prevalentes *Autumnalis* (34.2%), *Tarassovi* (23.7%), *Canicola* (17.1%), *Grippotyphosa* (14.5%) y otros con prevalencia menor como *Bratislava* (3.9%), *Icterohaemorrhagiae* (2.7%), *Australis*, *Pomona* y *Wolffi* con (1.3%) (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. Los serotipos detectados con mayor frecuencia fueron *Canicola* y *Pyrogenes* (Rubel y col., 1997).

En Estados Unidos y Canadá se han documentado estudios que muestran a *Leptospira* serovar *Autumnalis*, *Grippotyphosa* y *Pomona* como las principales serovariedades en perros (Moore y col., 2006; Bryan y col., 2011).

De estas, las serovares encontradas en nuestro estudio fueron *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Bratislava*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*, pero además hay otras

serovares de aislamientos nacionales no notificadas en estudios en otros países como las cepas *Portland-vere*, *INIFAP* y *Palo Alto* (Luna y col., 2008)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, existe un alto porcentaje de seropositividad a la presencia de anticuerpos en contra de *Leptospira* spp en perros callejeros de Torreón, Coahuila (67%), siendo las principales serovariedades, *Canicola*, *Portland-vere*, *Bratislava*, *Palo Alto*, *Pyrogenes* e *Icterohaemorrhagiae*. Las serovariedades *Canicola* y *Portland-vere*, mostraron títulos altos de hasta 1:1600. También se evidenció que las serovares *Hardjo*, *Wolffi* y *Tarassovi*, no son importantes en perros de la región.

Por otra parte, también se encontraron lesiones de nefritis intersticial en el 74% de los perros. El 25% de los animales presentaron títulos de anticuerpos con al menos una serovar de *Leptospira*, sin embargo no mostraron lesiones histológicas en riñón, esto puede ser debido a infecciones agudas o infecciones leves pasajeras que no necesariamente colonizaron el riñón. Lo más evidente fue que en los grados 1 y 2 con lesiones de nefritis intersticial incipiente y leve respectivamente, se encontró el mayor porcentaje de seropositividad (28 a 30%), con al menos una serovar de *Leptospira*, disminuyendo paulatinamente con lesiones grado 3 (14%) y grado 4 (2%), esto es fácilmente entendible ya que la mortalidad debido a *Leptospira* es muy alta, llamada frecuentemente “enfermedad silenciosa”.

Es bien conocido que la lesión intersticial no supurativa, es decir con infiltración principalmente de linfocitos, es producida frecuentemente por *Leptospira* spp. La correlación entre las lesiones renales, caracterizadas por nefritis intersticial, y la seropositividad a una o más serovares, sugieren que las leptospiras son responsables de la enfermedad renal crónica y que los animales pueden ser asintomáticos (Scanziani y col., 1995).

Los perros son considerados los hospedadores de mantenimiento para la serovar *Canicola* y hospedador incidental para otras serovares, y son una fuente potencial de infección para los dueños de las mascotas (Prescott, 2008). Las bacterinas bivalentes que contienen las serovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* han estado disponibles para uso en perros desde los años 60's. A pesar del uso de estas bacterinas, la leptospirosis canina diagnosticada en hospitales veterinarios se ha incrementado desde 1990 (Painter y Ellinghausjen, 1976).

Esta investigación muestra títulos de anticuerpos altos 1:800 y 1:1600, contra las serovares más comunes, *Canicola* y *Portland-vere*, y se observaron con más frecuencias en animales con riñones con nefritis intersticial grado 2, a pesar de ello es importante saber que no necesariamente un título determina el grado de lesión.

VIII. Conclusiones

El perro es un factor de riesgo para la transmisión de la leptospirosis al humano.

Los títulos de anticuerpos contra alguna serovar de *Leptospira*, se relacionan con la signología de la enfermedad, a pesar de que algunos animales no muestran lesiones, si la infección es crónica o severa, tarde o temprano éstas aparecerán.

Es recomendable realizar campañas para concientizar a los dueños de perros, que los vacunen para el bienestar del animal así como de salud pública.

IX. Literatura citada

1. Ahmad, S.N., Shah, S. y Ahmad, F.M. (2005). Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J. Postgraduate Medicine*. 51:195-200.
2. Alton, G.D., Berke, O., Reid-Smith, R., Ojkic, D. y Prescott, J.F. (2009). Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. *Can. J. Vet. Res.* 73:167-175.
3. Alves VA, Gayotto LC, Yasuda PH, Wakamatsu A, Kanamura CT, De Brito T: (1991). Leptospiral antigens (*L. interrogans* serogroup *icterohaemorrhagiae*) in the kidney of experimentally infected guinea pigs and their relation to the pathogenesis of the renal injury. *Exp Pathol* 42:81–93.
4. Areal, V.M. (1962). The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am. J. Pathol.* 40:393-423.
5. Arimitsu, Y., Haritani, K., Ishiguro, N. y Kobayashi, S. (1998). Detection of antibodies to leptospirosis in experimentally infected dogs using the microcapsule agglutination test. *British Vet. J.* 145:356-361.
6. Atzingen, M.V., Barbosa, A.S., De Brito, T., Vasconcellos, S.A. de Moraes, Z.M., Lima, D.M., Abreu, P.A. y Nascimento, A.L. (2008). Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol.* 8:70.
7. Banfi, E., Cinco, M., Bellini, M. y Soranzo, M.R. (1982). The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospire. *Microbiology.* 128:813-816.

8. Barbosa, A.S. Abreu, P.A.E., Vasconcellos, S.A., Morais, Z.M., Gonçalves, A.P., Silva, A.S., Daha, M.R. y Isaac, L. (2009). Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect. Immun.* 77:1137-1143.
9. Barbosa, A.S., Monaris, D., Silva, L.B., Morais, Z.M., Vasconcellos, S.A., Cianciarullo, A.M., Isaac, L. y Abreu, P.A.E. (2010). Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect. Immun.* 78:3207-3216.
10. Barocchi, M.A., Ko, A.I., Reis, M.G., McDonald, K.L. y Riley, L.W. (2002). Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect. Immun.* 70:6926-6932.
11. Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E. y Vinetz, J.M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of a global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3:757-771.
12. Bourhy, P., Bremont, S., Zinini, F., Giry, C. y Picardeau, M. (2011). Comparison of Real-Time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J. Clin. Microbiol.* 49(6):2154-2160.
13. Breiner, D.D., Fahey, M., Salvador, R., Novakova, J. y Coburn, J. (2009). *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infect. Immun.* 77(12):5528–5536.
14. Brenner, D.J., Kaufmann A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C. y Weyant, R.S. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for

Leptospira alexanderi sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:839-858.

15. Brihuega, B., Venzano, A., Diodati, J., Boffi, A., Funes, D., Auteri, C., Romero, G., Samartino, L. (2011). Alteraciones ultramicroscópicas en tejido placentario de animales infectados con *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *Rev. Argentina Microbiol.* 43:68.

16. Bryan, H.M., Darimont, C.T., Paquet, P.C., Ellis, J.A., Goji, N., Gouix, M. y Smits, J.E. (2011). Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans. *Can. J. Vet. Res.* 75:11–17

17. Burriel, A.R. (2010). Leptospirosis: an important zoonotic diseasesis. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Méndez-Vilas (Ed). pp 687-693.

18. Cerqueira, G.M., McBride, A.J.A., Queiroz, A., Pinto, L.S., Silva, E.F., Hartkeerl, R.A., Reis, M.G., Ko, A.I. y Dellagostin, O.A. (2010). Monitoring *Leptospira* strain collections: The need for quality control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82(1):83-87.

19. Cerquiera, G.M., Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing . *Infect Genet Evol.* 9:760–768.

20. Chappel, R.J., Goris, M., Palmer, M.F. y Hartskeerl, R.A. (2004). Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 42:5484-5488.

21. Choy, H.A., Kelley, M.M., Chen, T.L., Møller, A.K., Matsunga, J. y Haake, D.A. (2007). Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA

and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect. Immun.* 75:2441-2450.

22. Ciceroni, L., D'Aniello, P., Russo, N., Picarella, D., Nese, D., Lauria, F., Pinto, A. y Cacciapuoti, B. (1995). Prevalence of leptospire infections in buffalo herds in Italy. *Vet. Rec.* 137:192–193.

23. Cinco, M. (2010). New insights into the pathogenicity of leptopires: evasión of host defences. *New Microbiol.* 33:283-292.

24. Cumberland, P., Everard, C.O.R. y Levett, P.N. (1999). Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(5):731–734.

25. Daher, E.F., Lima, R.S.A., Silva Junior, G.B., Silva, E.C., Karbage, N.N., Kataoka, R.S., Carvalho Junior, P.C., Magalhães, M.M., Mota, R.M. y Liborio, A.B. (2010). Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. *Braz. J. Dis.* 14(1):3-10.

26. Daher, E.F., Zanetta, D.M.T., Cavalcante, M.B. y Abdulkader, R.C. (1999). Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(4):630-634.

27. Davidson, M.G., Nasisse, M.P. y Roberts, S.M. (1987). Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses. *Equine Vet. J.* 19:155–157.

28. 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

29. Donahue, J.M., Smith, B.J., Redmon, K.J. y Donahue, J.K. (1991). Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. *J. Vet. Diagn. Investig.* 3:148–151
30. Dong, K., Li, Q., Liu, C., Zhang, Y., Zhao, G. y Guo, X. (2010). Cloning and characterization of three cheB genes in *Leptospira interrogans*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42(3):216-223.
31. Draghi, M.G., Brihuega, B., Benítez, D., Sala, J.M., Biotti, G. M., Pereyra, M. Homse, A. y Guariniello, L. (2011). Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 43(1): 42-44.
32. Ellis, W.A. y Michna, S.W. (1976). Bovine leptospirosis: infection by the *Hebdomadis* serogroup and abortion-A herd study. *Vet. Record.* 99:409-412.
33. Evangelista, K.V. y Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5(9):1413-1425.
34. Farr, R.W. (1995). Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 21(1)1-6.
35. Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E. y Vinetz, J.M. (2003). Peru – United States Leptorpirosis Consortium: Leptospirosis: a zoonótica disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3:757-71.
36. Goris, M.G.A., Wagenaar, J.F.P., Hartskeerl, R.A., van Gorp, E.C.M., Schuller, S., Monahan, A.M., Nally, J.E., van der Poll, T. y van ´t Veer, C. (2011). Potent innate immune response to pathogenic *Leptospira* in human whole blood. *PLoS One.* 6(3):e18279.

37. Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Reis, M.G., Levett, P.N., Ko, A.I. y Haake, D.A. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect. Immun.* 69:4958-4968.
38. Harris, B.M., Blatz, P.J., Hinkle, M.K., McCall, S., Beckius, M.L., Mende, K., Robertson, J.L., Griffith, M.E., Murray, C.K. y Hospenthal, D.R. (2011). *In vitro* and *in vivo* Activity of first generation cephalosporins against *Leptospira*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85:905-908.
39. Heather, M.B., Darimont, C.T., Paquet, P.C., Ellis, J.A., Goji, N., Gouix, M. y Smits, J.E. (2011). Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans. *Can. J. Vet. Res.* 75:11–17.
40. International Committee on Systematics of Prokaryotes: Subcommittee on the Taxonomy Leptospiraceae. (2008). *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* 58:1049-1050
41. Jha, S. y Ansari, M.K. (2010). Leptospirosis presenting as acute meningoencephalitis. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4(3):179-182.
42. Jin, D., Ojcius, D.M., Sun, D., Dong., H., Luo, Y., Mao., Y. y Yan, J. (2009). *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8- and caspase-3 dependent pathways. *Infect. Immun.* 77(2):799-809.
43. Kingscote, B.F. y Wilson, D. (1986). *Leptospira pomona* abortion storm in a cattle herd in Sakatchewan. *Can. Vet. J.* 440-442.

44. Ko, A.I., Goarant, C. y Picardeau, M. (2009) *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:736-747.
45. Ko, A.I., Reis, M.G., Ribeiro-Dourado, C.M., Johnson, W.D., y Riley, M.W. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet.* 354:820–825.
46. Leanne, M., De Weyer, V., Hendrick, S., Rosengren, L., Waldner, C.L. (2011). Leptospirosis in beef herds from western Canada: Serum antibody titers and vaccination practices. *Can. Vet. J.* 52:619-626.
47. Lee, S.H., Kim, S., Park, S.C. y Kim, M.J. (2002). Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect. Immun.* 70(1):315–322
48. Leonard, N., Mee, J.F., Snijders, S. y Mackie D. (2004). Prevalence of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo* in bulk tank milk from unvaccinated Irish dairy herds. *Iris Vet. J.* 57(4):226-231.
49. Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:296–326.
50. Levett, P.N. y Whittington, C.U. (1998). Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 36:11-14.
51. Lindahl, E., Boqvist, S., Artursson, K. y Magnusson, U. (2011). A field-study on *Leptospira* seroprevalence in dairy cows in four geographical areas in Sweden. *Acta Vet. Scan.* 53:53.
52. Lin, Y.P., McDonough, S.P., Sharma, Y. y Chang, Y.F. (2008). The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding

to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. *Infect. Immun.* 76(5):2063-2069.

53. Lin, Y.P., Sun, A., Ruan, P., Zhang, Z. y Yan, J. (2011). Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira interrogans* Major Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41. *BMC Microbiology.* 11:21.

54. Lin, Y.P. y Chang, Y.F. (2008). The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. *J. Vet. Sci.* 9(2):133-144.

55. Longhi, M.T., Oliveira, T.R., Romero, E.C., Gonçalves, A.P., de Moraes, Z.M., Vasconcellos, S.A. y Nascimento, A.L. (2009). A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *J. Med. Microbiol.* 58(10):1275-1282.

56. Lourdault, K., Aviat, F. y Picardeau, M. (2009). Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 58:648-655.

57. Luna, A.M.A., Moles, C.L.P., Gavaldón, 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. Martinez-Lopez, D.G., Fahey, M. y Coburn, J. (2010). Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(12): e918.

59. Merien, F., Baranton, G. y Perolat, P. (1997). Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect. Immun.* 65:729-738.

60. Miller, D.L., Schrecengost, J., Merrill, A., Kilgo, J., Ray, H.S., Miller, K.V. y Baldwin, C.A. (2009). Hematology, parasitology, and serology of free-ranging coyotes (*Canis latrans*) from South Carolina. *J. Wild. Dis.* 45(3):863–869.
61. 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. *Emerging Infectious Diseases.* 12(3):501-503.
62. Murgia, R., Garcia, R., y Cinco, M. (2002). Leptospirees Are Killed In Vitro by Both Oxygen-Dependent and -Independent Reactions. *Infect. Immun.* 70:7172-7175.
63. Nally, J.E., Chantranuwat, C., Wu, X.Y., Fishbein, M.C., Pereira, M.M., Da Silva, J.J., Blanco, D.R. y Lovett, M.A. (2004). Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am. J. Pathol.* 164(3):1115-1127.
64. Natarajaseenivasan, K., Vedhagiri, K., Sivabalan, V., Prabakaran, Sukumar, S., Artiushin, S.C. y Timoney, J.F. (2011). Seroprevalence of *Leptospira borgpetersenii* serovar *javanica* infection among dairy cattle, rats and humans in the in the Cauvery river valley of southern India. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Healt.* 42(3):679-686.
65. Noguchi, H. y Kligler, I.J. (1920). Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated a case of yellow fever in Merida, Yucatan. *J. Exp. Med.* 32:627-637.
66. Noguchi, H. (1918). Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). *J. Exp. Med.* 27:575-592.

67. Ooi, B.S., Chen, B.T., Tan, K.K. y Khoo, O.T. (1972). Human renal leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:336–341.
68. Organización Mundial de la Salud. (2008). Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Rio de Janeiro. VP/OPS/OMS. Pp 84-87.
69. Painter, G.M. y Ellinghausjen, H.C. (1976). Immunising potency of *Leptospira interrogans* serotype *canicola* after heat inactivation at different temperatures. *J. Med. Microbiol.* 9:487-492.
70. Patarakul, K., Lo, M., y Adler, B. (2010). Global transcriptomic response of *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* upon exposure to serum. *BMC Microbiology.* 10:31.
71. Pinne, M., Choy, H.A. y Haake, D.A. (2010). The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(9):e815.
72. Pinto-Jorge, R.S., Ferreira, F., Ferreira-Neto, J.S., de Arruda-Vasconcellos, S. y de Souza-Lima, E. (2011). Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106(4):441-444.
73. Prescott, J. (2008). Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *Can. Med. Assoc. J.* 178(4):397-398
74. Riazi, M., Abdul Rani, A., Fairuz, A. y Zainul, F.Z. (2010). A low molecular weight lipopolysaccharide antigen preparation reactive to acute leptospirosis heterologous sera. *Tropical Biomedicine.* 27(2):241-253.

75. Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M.C., Lilenbaum, W. y Picardeau, M. (2009). Biofilm formation by pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiology*. 154:1309-1317.
76. Romero, P.M. y Sanchez, V.J. (2009). Seroprevalence of the canine leptospirosis in three municipalities of the Tolima department – Colombia. *Rev. MVZ Córdoba* 14(2):1684-1689.
77. 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.
78. Scanziani, E., Crippa, L., Giusti, A.M. Luini, M., Pacciarini, M.L., Tagliabue, S. y Cavalletti, E. (1995). *Leptospira interrogans* serovar *sejroe* infection in a group of laboratory dogs. *Laboratory Animals*. 29:300-306.
79. Sitprija, V., Pipatanagul, V., Mertowidjojo, K., Boonpucknavig, V. y Boonpucknavig, S. (1980). Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. *Kidney Int*. 17: 827–836.
80. Smyth, J.A., Fitzpatrick, D.A. y Ellis, W.A. (1999). Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. *Vet. Rec*. 145:539–542.
81. 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*. 25:1–13.

82. Taniyama, T., Yanagihara, Y., Mifuchi, I., Azuma, I. y Yamamura, A. (1972). Purification of polysaccharide antigen from *Leptospira biflexa* strain *Urawa*. *Infect. Immun.* 6(3):414-415
83. Tian, Y.C., Chen, Y.C., Hung, C.C., Chang, C.T., Wu, M.S., Phillips, A.O. y Yang, C.W. (2006). Leptospiral outer membrane protein induces extracellular matrix accumulation through a TGF-B1/Smad-dependent pathway. *J. Am. So. Nephrol.* 17:2792-2798.
84. Tian, Y.C., Hung, C.C., Li, Y.J., Chen, Y.C., Chang, M.Y., Yen, T.H., Hsu, H.H., Wu, M.S., Phillips, A.O. y Yang, C.W. (2011). *Leptospira santarosai* serovar *Shermani* detergent extract induces an increase in fibronectin production through a Toll-like receptor 2-mediated pathway. *Infect. Immun.* 79(3):1134-1142.
85. Theirmann, A.B. (1980) Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res.* 41:1659-1661.
86. Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P. y Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Internal. Microbiol.* 7:35-40.
87. Varela, G. y Vázquez, A. (1953). Nota preliminar acerca de la leptospirosis en la Ciudad de México. *Rev. Med. Vet.* 33.
88. Verma, A., Brissette, C.A., Bowman, A.A., Shah, S.T., Zipfel, P.F. y Stevenson, B. (2010). Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect. Immun.* 78(5):2053-2059.
89. Wagenaar, J., Zuerner, R.L., Alt, D. y Bolin, C.A. (2000). Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence,

and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 61:316–320.

90. Wang, B., Sullivan, J.A., Sullivan, G.W. y Mandell, G.L. (1984a). Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 46:809-813.

91. Wang, B., Sullivan, J.A., Sullivan, G.W. y Mandell, G.L. (1984b). Interaction of leptospires with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 44:459-464.

92. Ward, M.P. (2002). Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev. Vet. Med.* 56:203–213.

93. Winslow, W.E., Merry, D.J., Pirc, M.L. y Devine, P.L. (1997). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J. Clin. Microbiol.* 35:1938-1942.

94. World Health Organization. (2003). Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Malta: World Health Organization.

95. World Health Organization. (2011). Weekly epidemiological record. Leptospirosis: an emerging public health problem. 6:45-52.

96. Yan Zhang, Xiao-Li Lou, Hong-Liang Yang, Xian-Yan Zhang, Xiao-Kui Guo, Ping He, Xu-Cheng Jiang. (2012). Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infectious Diseases.* 12:20. Doi:10.1186/1471-2334-12-20.

97. Yuri, K., Takamoto, Y., Okada, M., Hiramune, T., Kikuchi, N. y Yanagawa, R. (1993). Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. *Infect. Immun.* 61:2270-2272.

98. Zuerner, R.L., Alt, D.P., Palmer, M.V. Thacker. T.C. y Olsen, S.C. (2011). A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vacine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin. Vaccine Immunol.* 18(4):684-691.