

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN**

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIAE EN MEDICINA
PREVENTIVA CON MENCIÓN SALUD PÚBLICA.**

TÍTULO:

**Determinar la presencia de *Leptospira* spp y lesiones renales en roedores de
cañaverales de la región nor-occidental de Nicaragua**

AUTOR:

Lic. Larry Abrahán Ayala Álvarez

Tutor(a):

Dr. William Jirón Toruño. DMV . Ph.D

León, 10 de Febrero 2017.

“A la Libertad por la Universidad”

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN**

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIAE EN MEDICINA
PREVENTIVA CON MENCIÓN SALUD PÚBLICA.**

TÍTULO:

**Determinar la presencia de *Leptospira* spp y lesiones renales en roedores de
cañaverales de la región nor-occidental de Nicaragua**

AUTOR:

Lic. Larry Abrahán Ayala Álvarez

Tutor(a):

Dr. William Jirón Toruño. DMV. Ph.D _____

León, 10 de Febrero 2017.

“A la Libertad por la Universidad”

Dedicatoria

A Jesucristo Todopoderoso

Por haberme permitido llegar a este punto y regalarme salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad, misericordia y amor.

A mis padres

Por la motivación en la perseverancia y constancia que los caracterizan, por ese ejemplo y valor mostrado para salir adelante.

A mi esposa e hijos

Por su paciencia y comprensión cuando he tenido largas jornadas de trabajo y su continuo amor que me inspira a seguir luchando en este camino de la vida.

Agradecimientos

Atraves de estas líneas quiero expresar mis más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporté científico y humano han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.

Muy especialmente a mi tutor y director de tesis Dr. William Jirón Toruño por su apoyo incondicional durante todo este proceso educativo, por sus gestiones con el Centro Veterinario de diagnóstico e investigación (CEDEVI) y por su apoyo en la elaboración de este trabajo tesis.

AL Instituto de protección y sanidad agropecuaria (IPSA) por haberme brindado la oportunidad y la confianza dando así un paso para gestionar este valioso nivel educativo.

A los docentes de la Escuela de ciencias veterinarias UNAN-León por su esfuerzo y dedicación quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación han logrado que podamos terminar nuestros estudios con éxito.

En general a todas las instituciones y organismos que de alguna manera contribuyeron a facilitarnos acceso al conocimiento para alcanzar nuestro objetivo.

INDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
III.	ANTECEDENTES.....	5
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	7
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
VI.	OBJETIVOS.....	9
VII.	MARCO TEÓRICO.....	10
VIII.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	51
	Tipo de Estudio.....	51
	Área de Estudio.....	51
	Periodo de la investigación.....	51
	Descripción de las unidades de estudio.....	51
	Metodología de campo.....	51
	Población de estudio.....	52
	Tamaño y Tipo de Muestras.....	52
	Clasificación de las especies de roedores procesados.....	52
	Datos obtenidos a partir de la captura.....	52
	Recolección de la muestra.....	52
	Factores de Inclusión.....	53
	Materiales.....	53
	Campo.....	54
	Descripción de la técnica de MAT.....	55
	MAT Cuantitativo para Roedores.....	55
IX.	RESULTADOS.....	58
X.	DISCUSIÓN.....	62
XI.	CONCLUSIONES.....	65
XII.	RECOMENDACIONES.....	66
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	67
XIV.	ANEXOS.....	74

I. RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad infecto-contagiosa aguda y febril ocasionada por diferentes serovariedades patógenas de espiroquetas del género *Leptospira*, que afecta a una amplia variedad de mamíferos, incluyendo al ser humano, siendo considerada como una de las enfermedades zoonóticas de mayor distribución a nivel mundial.

El propósito de este trabajo es determinar la presencia de *Leptospira* spp en roedores de cañaverales en el nor-occidente de Nicaragua.

Se muestrearon 77 roedores de los que se obtuvo suero sanguíneo y riñones para aislamiento y estudio histopatológico, El procesamiento de las muestras de suero se realizó con la técnica de microaglutinación frente a doce cepas de *Leptospira* spp. utilizándose el medio de cultivo EMJH+5Fu para el aislamiento a partir de la riñones.

Los roedores fueron clasificados según características morfológicas en *Sigmodon hispidus* (rata cañera) 59.74% (46/77) y *Rattus rattus* (rata negra) 5.19% (4/77) de los cuales 27 no fueron identificados. En las muestras analizadas se encontró una seropositividad del 39.77% (35/88), reaccionando contra una o más cepas con los porcentajes siguientes::el 13.33% (4/30) de la cepa Hebdomadis, 56.66% (17/30) (Icterohaemorrhagiae-RGA), 6.66% (2/30) (Icterohaemorrhagiae-M20), 3.33 % (1/30) (Icterohaemorrhagiae- Wijnberg), 3.33% (1/30) (Louisiana), 6.66% (2/30) (Pomona), 6.66% (2/30) (Sejroe) y 3.33% (1/30) (Patoc) reactores al MAT, el aislamientos de *Leptospira* spp se realizaron en tres de los roedores 9.82 % (3/30) de los cultivos a partir de riñón, siendo Icterohaemorrhagiae el serogrupo al que reaccionaron con mayor frecuencia 56.66%.

II. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa bacteriana zoonótica, causada por leptospira patógenas, que afecta a una amplia variedad de mamíferos, incluyendo al hombre, siendo considerada como una de las enfermedades una de las enfermedades más difundidas a nivel mundial. Se presenta tanto en países en desarrollo como industrializados y ha sido asociada a actividades agrícolas, veterinarias, ganaderas, mineras y maniobras militares dado el contacto potencial con las fuentes de infección (1)

Esta enfermedad clínicamente puede presentar curso sobreagudo, agudo o crónico, es de difícil diagnóstico por sus múltiples aspectos clínicos que no involucran necesariamente la ictericia, se manifiesta principalmente en forma subclínica, por lo que son más frecuentes los hallazgos serológicos positivos que la manifestación de la enfermedad, cuando se presenta, es capaz de ocasionar la muerte por insuficiencia renal y hepática (2).

Las condiciones medio ambientales y las prácticas de manejo de los animales influyen en una forma muy marcada en la dinámica de la infección; las investigaciones serológicas han demostrado que las infecciones por *Leptospira Spp* están ampliamente diseminadas en los países tropicales y subtropicales siendo los más afectados lugares con condiciones climáticas tales como: alta precipitación, temperatura, humedad relativa, así como el pH, estructura y la composición de suelo que favorecen la presentación de la enfermedad (3).

La leptospirosis es una entidad relacionada con vectores, fundamentalmente los roedores,(4) numerosos animales silvestres son portadores y vectores de leptospiras, representando los roedores los principales reservorios para estos agentes infecciosos que han evolucionado con el huésped, siendo la orina la fuente más común de contagio para el ser humano y por tanto la causa de la aparición de enfermedades emergentes o reemergentes, de ahí que sea muy importante el conocimiento geográfico de los nichos ecológicos de los reservorios en los cañaverales (5) otras fuentes de infección son las aguas contaminadas.

Leche cruda, descarga vagina, fetos de animales infectados etc. (6) trasmitiéndola de manera directa o indirectamente al hombre y a diferentes especies de animales domésticos. (7)

En Nicaragua se ha registrado la presencia de cuatro especies de roedores: la Rata Negra (*Rattus Rattus*), la Rata Gris (*Rattus norvegicus*), el Ratón Común (*Mus musculus*) y Rata cañera (*Sigmodon hispidus*). (8)

Las leptospiras son espiroquetas bacterianas delgadas y helicoidal lo que le permite buena movilidad, son aerobias obligadas, Gram negativas, que miden alrededor de 0,1 μm de diámetro y 6-20 μm de largo, pertenecen a la familia Leptospiraceae, género *Leptospira*, las cuales se agrupan en cuatro especies saprofitas y 12 patógenas, que incluyen alrededor de 250 serovares (9), debido a las afecciones que produce en el hombre y los animales, así como su repercusión económica en los países desarrollados y en vías de desarrollo constituye una importante y permanente preocupación para la salud pública en general.

La bacteria penetra por la piel, las mucosas o es ingerida al consumir agua y alimentos contaminados con orina de animales infectados, dirigiéndose por el torrente sanguíneo a todas las partes del cuerpo incluyendo LCR. Los animales recuperados quedan en estado de portador diseminando la bacteria a través de la orina durante meses o años, representando un factor de riesgo y un importante eslabón en la cadena epidemiológica de la Leptospirosis humana (10)

Tradicionalmente han sido clasificadas tomando como base a sus determinantes antigénicos en dos especies, la mayoría de leptospiras patógenas se agruparon dentro del «complejo interrogans» (después *L. interrogans sensu lato*), las otras se pusieron en el «complejo biflexa» (después *L. biflexa sensu lato*) que agrupa a las saprofitas principalmente.

Esta clasificación coexiste con la clasificación serológica antigua; debido a problema en la clasificación los nuevos aislamientos de *Leptospira* deben caracterizarse por pruebas moleculares y serológicas(11), esta enfermedad clínicamente puede

presentar curso sobreagudo, agudo o crónico, es de difícil diagnóstico por sus múltiples aspectos clínicos que no involucran necesariamente la ictericia, se manifiesta principalmente en forma subclínica, por lo que son más frecuentes los hallazgos serológicos positivos que la manifestación de la enfermedad, cuando usadas para el diagnóstico de la leptospirosis, cada una con su sensibilidad y especificidad propias. Frecuentemente es necesario usar varias técnicas, ya sea al mismo tiempo o sucesivamente, para alcanzar un diagnóstico confiable. El inmunoensayo enzimático o enzimoimmunoanálisis (ELISA) y la prueba de aglutinación microscópica (MAT) son los métodos de laboratorio más comúnmente utilizados; sin embargo, la MAT, desarrollada por Martin & Petit (1918), sigue siendo el método de referencia (12)

En general los roedores silvestres son importantes reservorios y por ende diseminadores de la bacteria en el ambiente, es por ello que el objetivo de este estudio es determinar la presencia de *Leptospira* spp en roedores de cañaverales de la región occidental de Nicaragua.

El objetivo del presente trabajo es estimar la tasa de prevalencia de leptospirosis y las lesiones en riñón de roedores de cañaverales, para tener una visión actualizada de esta problemática, ya que como está perfectamente demostrado, es importante el rol epidemiológico que juegan los roedores en el mantenimiento y difusión de esta enfermedad.(13) por lo que es menester recordar que los roedores se comportan como reservorios de *Leptospiras* por excelencia, dado que difícilmente sufren la enfermedad, (14) pero la mantienen en el tiempo acantonados a los agentes patógenos en los riñones, y, que ante una situación de “stress”, eliminan *Leptospiras* en abundancia contaminando el medio ambiente, agua o alimentos que pueden llegar al hombre y animales domésticos o silvestres, donde se pueden producir las infecciones a *Leptospiras*, ya sea por ingestión, por vía percutánea o conjuntival, por lo que se hace necesario conocer el papel que desempeña la bacteria en estos reservorios, ya que Nicaragua es un país endémico para leptospirosis, por ende realizo este estudio histopatológico y de aislamiento de *Leptospira* spp. Provenientes del occidente del país en roedores capturados en cañaverales.

III. ANTECEDENTES

La primera descripción clínica de la Leptospirosis fue realizada por Lacereaux ("Leyons de la pitié") en 1802, Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias denominándolo tifus hepático en 1883, Tres años después, en 1886, Mathieu en Francia y Weil en Alemania, describen cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de agresión renal. Goldschmidt en 1887 propuso el nombre de Enfermedad de Weil, en 1907 Stimson pudo visualizar el microorganismo en un corte de tejido renal de un paciente fallecido durante una epidemia de fiebre amarilla. (15)

Fue en 1914 que los japoneses Inada e Ido encuentran una espiroqueta en el hígado de cobayos infectados con sangre de enfermos mineros febriles. En el cobayo aparecieron fenómenos hemorrágicos y es por esta razón que los investigadores japoneses llamaron al agente encontrado *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. (16).

En 1917 y 1918 Noguchi estudió varias muestras aisladas en diferentes lugares y propuso la creación del género leptospira, posteriormente entre 1918 y 1919 en Ecuador y México, las ratas fueron descubiertas como reservorio natural.(15)

En Egipto un estudio realizado en roedores y animales domésticos por Samir y colaboradores en el 2015 encontraron 6.9% (17/270) de roedores y 11.3% (19/168) de caninos positivos a aislamientos y utilizando la técnica de MAT reportaron 75.9% (205/270) y 58.3% (98/168) de roedores y caninos reactivos, respectivamente.

En Brasil un estudio realizado en roedores y animales domésticos por Martins y Lilenbeum en el 2013 encontraron por medio de la técnica a MAT presencia de anticuerpos antileptospira en roedores 36.2% (17/47), en caninos 73.3% (88/120), en equinos 39.6% (275/695) y en porcinos 66.1% (232/351).

En Argentina en el 2001 se reporta un 40.6% de prevalencia de leptospirosis en ratas intra y peridomiciliares, mediante el aislamiento en 2006 otro estudio reporta una prevalencia de 30.1% también por aislamiento.(17)

En Colombia en 2002, se reporta 3.3% de roedores seroreactivos utilizando la técnica de MAT, un estudio en Perú en 1999 reporta 16.6% de seroprevalencia en roedores detectados por MAT.(18)

En Nicaragua en el 2011, García evidenció la presencia de la bacteria en el 71.74% de las muestras a través de aislamiento, El 69.77% de los roedores resultaron reactivos a MAT, de estos 21 fueron positivos a aislamiento. (19)

Ruiz Leiva, realizó Prevalencia de *Leptospira spp* en roedores capturados en focos de leptospirosis humana en los departamentos de Chinandega, León y Matagalpa en el período de Septiembre a Noviembre 2011, reporta el 43% de aislamientos positivos de *Leptospira spp*.(20)

En 2013 Barría en un estudio de hallazgos histopatológicos renales y su relación con leptospirosis en roedores silvestres de la provincia de Valdivia en Chile describe que el 84% de las muestras presentaron al menos una lesión renal detectable por microscopía óptica compatible a leptospira(1)

Cardoza y González, 2011, encontraron 55% (11/20) de roedores positivos a aislamientos y 30% (6/20) de reactivos a MAT, en roedores de la especie *Mus musculus* capturados en el municipio de Achuapa. (21)

Álvarez y López en el 2015, reportan 59,4% (41/69) de reactivos en roedores de cañaverales pertenecientes a la especie *Sigmodon hispidus*, de los cuales realizaron aislamientos de *Leptospira spp* en 18% (15/83) de los roedores muestreados. (22)

IV. JUSTIFICACIÓN

La leptospirosis está ampliamente distribuida en el país infectando al hombre, animales domésticos y silvestres, por lo que el conocimiento de su situación actual es de interés en salud humana y veterinaria produciendo en estos últimos cuadros infecciosos, que causan cuantiosas pérdidas en predios agropecuarios, lo que indudablemente afecta la economía nacional.

En Nicaragua se presenta de carácter endémico, tal y como lo demuestran las estadísticas de la enfermedad principalmente después de lluvias fuertes e inundaciones (23). La frecuencia de la leptospirosis es alta en países cultivadores de arroz y caña de azúcar. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha cifrado su prevalencia en humanos entre 4 y 100 casos por 100 000 habitantes en esos países y ha descrito un brote en China con una incidencia de 1,300 casos por cada 100 000 habitantes. En octubre de 1995, en Achuapa, Nicaragua, se registraron 2000 casos y 40 defunciones en humanos que presentaban una enfermedad febril hemorrágica; inicialmente se estableció diagnóstico de dengue hemorrágico, pero las pruebas serológicas fueron negativas para esta enfermedad y posteriormente se confirmó el diagnóstico de leptospirosis. Igualmente, en el período posterior al huracán Mitch se registraron 523 casos sospechosos de leptospirosis, con 7 personas muertas por esta causa, lo cual representa una tasa de letalidad de 1,3%. (24)

Los roedores silvestres son los reservorios más importantes y por ende los principales diseminadores de la enfermedad en el ambiente, es por ello que el objetivo de este estudio es determinar la presencia de *Leptospira spp* a través de la técnica de microaglutinación (MAT) y aislamientos en roedores de cañaverales, tomando en consideración que este tipo cultivo propicia el hábitat de estos y su propagación.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe circulación de *Leptospira* spp y lesiones renales en roedores de cañaverales capturados en el nor-occidente del país en el periodo de estudio de marzo 2015 y Julio 2016 ?

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Leptospira spp* y lesiones renales en roedores de cañaverales de la región nor-occidental de Nicaragua.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar roedores reactivos a *Leptospira spp* a través de la técnica de microaglutinación (MAT)
2. Aislar *Leptospira spp* en riñones de roedores.
3. Identificar lesiones histopatológicas renales de roedores capturados en los cañaverales.

VII. MARCO TEÓRICO

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana, ocasionada por especies patógenas del género *Leptospira*, es una zoonosis ampliamente distribuida en el mundo; siendo muy frecuente en áreas rurales y urbanas, en zonas tropicales, subtropicales y en regiones templadas. En la mayoría de países en desarrollo, medio millón de casos son reportados anualmente con una tasa de mortalidad que está entre 3 y 50%; las epidemias más recientes han sido reportadas en Nicaragua, Sri Lanka y Filipinas. Esta enfermedad afecta a más de 150 especies animales que se convierten en fuente primaria de contaminación para el hombre que generalmente se infecta a través del agua contaminada con orina emitida por animales portadores. En animales la enfermedad puede ser asintomática y en humanos puede cursar con diferentes cuadros clínicos que pueden ir desde dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, hematuria, hemoglobinuria, meningitis hasta fallas multisistémicas que pueden causar la muerte. En especies animales de importancia económica como los bovinos y porcinos provoca fallas reproductivas que afectan la producción pecuaria; sin embargo, en muchos casos los signos clínicos son similares a los causados por otras enfermedades reproductivas. (25)

Historia

Se describe cronológicamente los eventos históricos de la enfermedad, desde que fue presumida por Griesinger en 1853 en Egipto, quien la denominó tifoidea biliosa; Landouzy, en 1883, describió en dos sujetos trabajadores de los alcantarillados de París una enfermedad que llamó fiebre biliosa o hepática, al parecer, leptospirosis. Weil en 1886 describe por primera vez el proceso patológico de la leptospirosis ictérica. El agente causal de la enfermedad fue aislado en Japón en 1915 por Inada e Ido. Noguchi en 1917 lo denominó, por su forma espiral y delgada, leptospira. En Cuba, en 1868, Navarro Valdés describe una enfermedad similar a la enfermedad de Weil y la separa de la fiebre amarilla. Martínez y Martínez describen 58 casos con el cuadro ictérico-hemorrágico y la toma renal característicos de la enfermedad. En 1945, Márquez, Soler y Curbelo presentaron el primer caso confirmado con diagnóstico serológico, que pertenecía al serogrupo *L. íctero-hemorrhagiae*.(26)

Sinonimias

La Leptospirosis se conocen por otros nombres tales como: enfermedad de Weil (*L. icterohaemorrhagiae*); Fiebre de los arrozales (*L. bataviae*); enfermedad de los henequeneros; enfermedad de los porqueros (*L. pomona*); enfermedad de los manipuladores de pescados, ictericia enzótica; enfermedad de Stuttgart (*L. canicola en Europa*); ictericia hemorrágica; ictericia infecciosa; agua roja; fiebre de los 7 días (*L. hebdomadis* en Japón); fiebre otoñal japonesa (*L. autumnalis*); fiebre de los ratones; tífus canino; fiebre de cieno, fiebre de los pantanos (*L. grippotyphosa* en los trópicos) fiebre del agua; fiebre de los cosechadores; fiebre de los campos, etc. Todas estas denominaciones han sido utilizadas para describir la enfermedad producida por leptospiras según sus características epidemiológicas, clínicas, territoriales, especies afectadas, estacionalidad, etc. (27)

Etiología

Las leptospiras son microorganismos aerobios obligados, con una temperatura óptima de crecimiento entre 28-30°C y capaces de producir catalasa y oxidasa. Son bacterias muy finas, de 6 a 20 µm de largo y 0,1 a 0,2 µm de ancho, pero cultivos ocasionales pueden contener células más largas. Son flexibles, helicoidales, con las extremidades encorvadas en forma de gancho. Poseen dos filamentos axiales (flagelos periplasmáticos) con inserciones polares que se localizan en el espacio periplasmático y son las estructuras responsables de su motilidad; mientras que las proteínas FlaA y FlaB constituyen la vaina flagelar y el centro, respectivamente, aunque la microscopía electrónica muestra una mutante FlaB deficiente de endoflagelo y sin motilidad (28).

La estructura de las proteínas flagelares es compleja. Las leptospiras son móviles y exhiben dos formas distintas de movimiento (traslación y rotación). Desde el punto de vista morfológico, todas las leptospiras son indistinguibles, aunque su morfología

en aislamientos individuales varía con el subcultivo in vitro y puede restaurarse mediante el pase por hámsteres. Las leptospiras tienen una estructura típica de doble membrana: la membrana citoplasmática y la pared celular del peptidoglicano, ambas asociadas y recubiertas por una membrana externa. Dentro de la membrana externa, el LPS constituye su antígeno principal, sustancia con una estructura y propiedades antigénicas semejantes al LPS descrito en las bacterias Gram-negativas. No obstante, es relativamente no toxigénico en las células o animales, siendo 12 veces menos letal para los ratones que el LPS de *Escherichia coli* y es menos activo en las pruebas estándares para la actividad endotóxica, como la prueba de pirogenicidad en conejo, letalidad en ratón, reacción de Schwartzman y mitogenicidad de las células B. El lípido A de las leptospiras contiene algunos rasgos inusuales, que incluyen una unidad de disacárido de glucosamina modificada (fosforilada y metilada) (28).

Además del LPS, proteínas estructurales y funcionales forman parte de la membrana externa de estos microorganismos. Tres clases de proteínas de membrana externa (PME) se han identificado: 1) las lipoproteínas, la clase más abundante, que comprende LipL32, LipL41, LipL48, LipL36 y LipL21 y Qlp42; 2) la proteína de transmembrana OmpL1; 3) las proteínas periféricas como LipL45. También el sistema de secreción tipo dos (T2SS) que secreta, se localiza en la membrana externa de las leptospiras y muestra sus propiedades antigénicas.

Crece en medios simples enriquecidos con vitaminas (B1 y B12, factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio. Los ácidos grasos de cadena larga, se utilizan como única fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación. Para su crecimiento, requieren medios que contengan suero o albúmina y entre los mismos, se encuentran los medios líquidos enriquecidos con suero de conejo: Fletcher, Korthoff, Noguchi y Stuart (28).

Actualmente, el medio más utilizado es el Tween 80-albúmina, también conocido por las iniciales de sus autores Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), compuesto por ácido oleico, albúmina de suero bovino y polisorbato (Tween).

Algunas cepas, para su aislamiento inicial, requieren la adición de piruvato o suero de conejo. El crecimiento de los contaminantes presentes en las muestras clínicas se inhibe con la adición al medio de: 5-fluorouracilo, gentamicina, ácido nalidíxico o rifampicina. El crecimiento de estos microorganismos es lento en el aislamiento primario, debiéndose mantener incubados durante aproximadamente 13 semanas antes de descartar un cultivo como negativo. A los medios se les puede agregar agar a bajas concentraciones (0,1-0,2%). En los medios semisólidos, el crecimiento de las leptospiras alcanza su máxima densidad en una zona discreta bajo la superficie del medio, zona que llega a ser intensamente turbia con los beneficios de la incubación. Este crecimiento se relaciona con la tensión óptima de oxígeno y se le denomina “anillo o disco Dinger”. Los cultivos de las leptospiras se mantienen mediante subcultivos repetitivos o almacenados en agar semisólido con hemoglobina. El almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido también ofrece buenos resultados y es el método de elección para mantener la virulencia de estos microorganismos. Las leptospiras pueden sobrevivir largo tiempo en el agua o ambientes húmedos, templados y con un pH neutro o ligeramente alcalino (28)

Taxonomía y clasificación

Las especies de *Leptospira* se ubican en el orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y en el género *Leptospira*. Este género comprende dos especies fenotípicas: *L. interrogans*, que agrupa a leptospiras patógenas, agente causal de la leptospirosis en el hombre y los animales y *L. biflexa*, que incluye las saprofitas de vida libre, microorganismos que se encuentran fundamentalmente en las aguas superficiales y de forma muy ocasional en aguas marinas (29). A diferencia de *L. interrogans*, las cepas de *L. biflexa* no se asocian con infecciones en los humanos o animales, y son avirulentas en los animales de laboratorio. (29)

Por debajo del nivel de especie, tanto *L. interrogans* como *L. biflexa*, se clasifican en serogrupos y serovares, atendiendo a sus características serológicas (30). Se han identificado alrededor de 80 serovares de *L. interrogans*. Los serogrupos

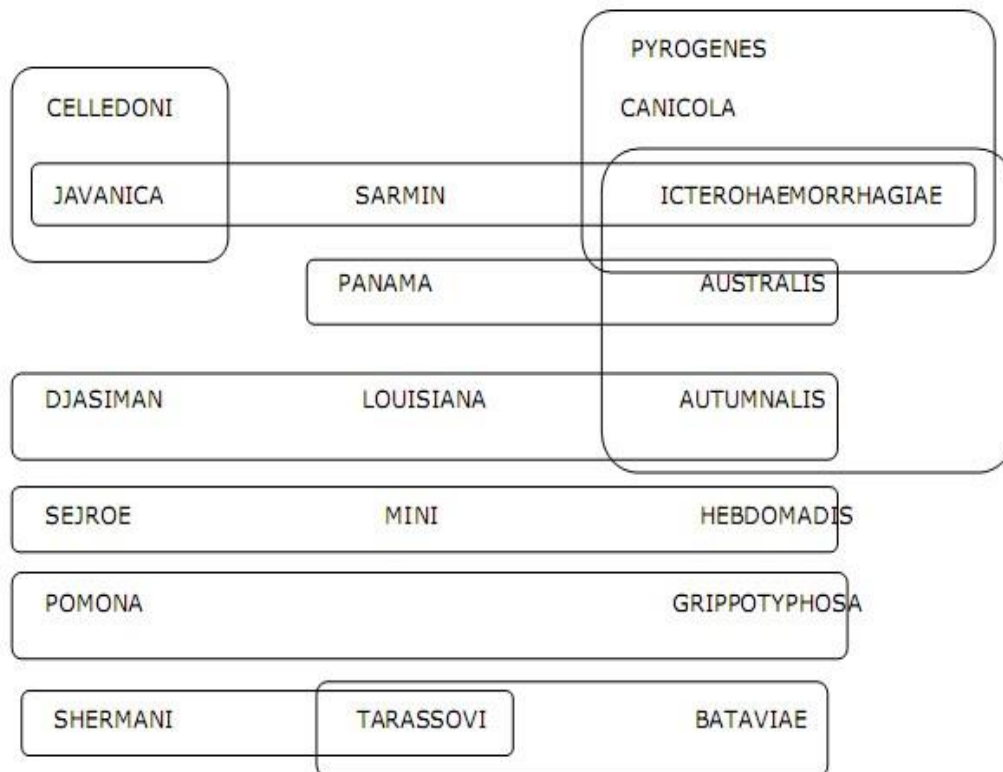
contienen los serovares antigénicamente relacionados y se conocen 24 serogrupos para las cepas patógenas. La lista de los serovares se actualiza periódicamente, y recientemente se han descrito dos nuevos serovares patógenos. La identificación de los serovares es esencial para el entendimiento de la epidemiología de esta enfermedad. Los serogrupos identificados utilizando la prueba de microaglutinación (MAT), no tienen un reconocimiento taxonómico oficial, pero sirve para agrupar los serovares con antígenos comunes.(28)

La clasificación, el tipaje y la caracterización de las cepas mediante anticuerpos monoclonales (AcM) y las técnicas de biología molecular, permiten un mayor conocimiento sobre las relaciones antigénicas y genómicas entre las cepas de *Leptospira*. El uso de AcM posibilita hacer de forma rápida, mediante microaglutinación, la identificación de las mismas hasta el nivel de serovar. En la actualidad, además de la clasificación fenotípica, existe la tipificación genética, sin existir relación directa o correspondencia entre ambas (30). La caracterización genética mediante la hibridación ADN-ADN permite la división del género en 20 especies genómicas diferentes o genomaespecies. Debido a la falta de correspondencia entre ambas clasificaciones (fenotípica y genética), existen especies genómicas que incluyen serovares patógenos y no patógenos, así como serovares incluidos en más de una especie genómica. De esta forma, la especie genómica es típica de la cepa y ningún serogrupo o serovar predice la especie genómica a la cual pertenecerá una cepa en cuestión (30).

En la reunión del Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* del 2007, desarrollada en Quito, Ecuador, se decide dar el estatus de especies a las genomaespecies 1, 3, 4 y 5, (descritas previamente) y resultante en una familia que comprende 13 especies patógenas de *Leptospira*: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomaespecie 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomaespecie 3), *L. weilii*, *L. wolffii*, con más de 260 serovares. La especie saprofita de

	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
L. alexanderi	Manhao	Manhao3	L 60
L. fainei	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT 6
L. inadai	Lyme	Lyme	10
	Autumnalis	Bim	1051
	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
L. kirschneri	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
	Pomona	Mozdok	5621
L. meyeri 173	Semaranga	Semaranga	Velrad Semarang
	Ballum	Ballum	Mus 127
	Ballum	Castellonis	Castellon 3
L. borgpetersenii	Javanica	Javanica	Veldrat Bat 46
	Sejroe	Sejroe	M 84
	Tarassovi	Tarassovi	Perepicilin
L. weillii	Celledoni	Celledoni	Celledoni
L. noguchii	Autumnalis	Fortbragg	Fort Bragg
	Panama	Panama	CZ 214 k
L. santarosai	Bataviae	Brasiliensis	An 776
	Mini	Georgia	LT 117
Genomospecies1	Ranarum	Pingchang	80- 412

Genomospecies4	Icterohaemorrhagiae	Hualin	LT 11 -33
Genomospecies5	Semarang	Saopaulo	Saopaulo
Saprófitas			
Genomospecies3	Holland	Holland	Was Holland (P438)
L. biflexa	Semarang	Patoc	Patoc I
L. wolbachii	Codice	Codice	CDC



Reacción Cruzadas entre algunos Serogrupos (27)

Importancia económica y sanitaria

La Leptospirosis considerada la epizootemia más difundida en el mundo, tiene tanto importancia económica como sanitaria. La repercusión económica más importante

en la explotación, es el fallo reproductivo, secuela crónica de la enfermedad en las reproductoras, que causa mortinatos, abortos o nacimientos de animales débiles, disminución de la fertilidad. Resulta difícil estimar las pérdidas por este concepto en gran parte por las dificultades inherentes al diagnóstico de la enfermedad. También puede ser considerada importante la pérdida económica asociada al “Síndrome de caída de la leche” o agalactia producida por estos microorganismos. A estas pérdidas, habría que añadir las originadas por desecho temprano y por aumento en la tasa de eliminación de animales por causas reproductivas. La Leptospirosis es una zoonosis, por los efectos sobre la producción animal, se le añade un importante aspecto sanitario donde en el ser humano está considerada una infección accidental. Algunas prácticas laborales como los mineros, ganaderos, agricultores, deportistas acuáticos, trabajadores en mataderos, veterinarios etc. Así como ciertas actividades recreativas que implican contacto con aguas posiblemente contaminados de Leptospiras pueden provocar enfermedad en ellos. Además del riesgo sanitario, hay que tener en cuenta la vertiente económica derivada de los gastos originados por el cuidado médico de los pacientes, bajas laborales, pérdida de productividad y capacidad de trabajo, vigilancia y control de los lugares de trabajo, ropas especiales de protección, seguros médicos para el personal en riesgo, evaluación de vacuna, etc. (27)

Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de potencial epidémico, principalmente después de fuertes lluvias. Ocurre en todo el mundo y está emergiendo como un problema de salud pública, en países tropicales y subtropicales, afectando más a las poblaciones vulnerables (31).

La frecuencia es alta en países donde se cultiva arroz, ya que por lo general esta actividad se lleva a cabo en terrenos inundables, de manera que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha cifrado su prevalencia en humanos entre cinco y diez casos por cada 100,000 habitantes. La leptospirosis afecta a cualquier mamífero

que puede infectarse por cualquier serovar; pero en realidad, solo algunos serovares pueden ser considerados como endémicos en una región. A nivel internacional, los países endémicos son España, Barbados, Holanda, Francia, Rusia, Perú, Argentina, Chile, Canadá, Eslovaquia, Escocia, Pakistán, Tailandia, Nigeria, Costa Rica, Alemania, Dinamarca, Italia, Cuba, Australia, Zaire, Yugoslavia, Irlanda del Norte, Bangladesh, Japón, Venezuela, Brasil, China, India, Puerto Rico y casos aislados en EUA . En este sentido, serovares como Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Grippotyphosa se consideran de distribución mundial. La presencia de uno u otras serovariedades, dependen de la existencia de mamíferos silvestres en la región. Los animales silvestres son portadores de leptospiras; sin embargo, los roedores son los principales reservorios para estos agentes infecciosos que han evolucionado con el hospedero, adaptándose incluso, a algunas especies de la fauna silvestre que no sufren la enfermedad ni mueren por la infección, por lo que se vuelven importantes reservorios de este patógeno para casi toda la vida. En consecuencia, se transforman en fuentes de infección para la especie humana y también para animales domésticos, por lo que en ocasiones son la causa de la aparición de enfermedades emergentes o bien reemergentes (32).

Vías de transmisión

Las principales vías de transmisión se clasifican en: Directa e Indirecta.

Horizontal directa: esta forma de transmisión es la más frecuente en los casos de serovares adoptados como hardjo.

Contacto directo: esta vía es la más estudiada además de tener diversas formas. La forma venérea fue tomada en consideración después que fue demostrada la presencia de *Leptospira* en el semen de un toro. Se considera como la fundamental en algunas especies cuyos hábitats se encuentran en áreas de condiciones climáticas favorables o de densidad poblacional desfavorables para la transmisión de la enfermedad de otra manera como ocurre con la musaraña común en zonas

de Polonia o Rusia, donde se han observado varias epizootias de en estos animales; asociadas a las épocas más secas del año, que por lo general, coincide con la época de la reproducción (27).

Núcleos goticulares: tienen importancia ya que las gotas de orina dispersan a varios metros del animal que orina, pudiendo penetrar *Leptospira* procedentes de animales con leptospiruria, tanto por inhalación como por vía conjuntival (27).

Horizontal indirecto

Esta desempeña un papel fundamental en las infecciones accidentales ya que se produce tras la exposición al ambiente contaminado con material infectante

Fómites: el agua, alimentos, pastos y suelos contaminados pueden facilitar el contacto entre el animal - humano y el agente. La forma importante y más frecuente para la infección humana y animal es el contacto de la piel o las mucosas con aguas o barro contaminados con orina y el contacto con órganos de animales enfermos en el matadero (Terry y col., 2000). Los pastos contaminados juegan un papel importante para la transmisión intra e interespecie.

Vectores: diversos autores han evaluado la hipótesis de que los artrópodos podrían jugar un papel relevante en la transmisión mecánica del agente (27).

Vertical

Transplacentaria: el agente puede atravesar la placenta durante el período de leptospiremia, tal y como se ha demostrado tanto en el ganado bovino, el cerdo y en el ser humano. Un caso especial sería la posibilidad de la infección del feto en el momento del parto, si esto no ha ocurrido anteriormente durante la gestación (27).

Galactófora: puesto que la infección por *L. hardjo* y *L. pomona* pueden producir una mastitis clínica, los microorganismos presentes en la glándula mamaria podrían ser excretada con la leche e infectar al ternero por vía oral (27).

Fuentes de infección

La principal fuente de contagio para el hombre constituye, la orina de animales enfermos, reservorios naturales así como el contacto directo con estos animales. También las aguas contaminadas, leche cruda, descarga vaginal, feto de animales infectados y fetos abortos etc. Siendo considerada como enfermedad profesional. La infección en granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos, médicos de inspección de carne, trabajadores de control de roedores .Ocupaciones que requieren contactos con animales. El contacto directo y/o indirecto es importante para alcantarillados, mineros, soldados, trabajadores de higiene y de pesca (Gill et al, 1985; Robertson et al., 1981), trabajadores de ferias de animales y de canal, arroceros, trabajadores de platanales y cortadores de caña de azúcar. Para los animales, constituye la orina de animales infectados, asintomáticos y portadores; también el agua, leche, forrajes, pastos, tejidos de animales, descargas posparto, saliva, semen, instrumentos quirúrgicos así como vectores siendo los roedores (ratas y ratones) los más importantes por su condición de reservorio natural (27).

Agua: Para que ocurra la infección en el medio, las *Leptospiras* necesitan una supervivencia en este medio primero, la cual tiene una vinculación tremenda con la humedad relativa alta y la temperatura a su punto óptimo en el lugar de aparición. La temperatura del agua tiene un efecto beneficioso, ya sea baja o alta. Las bajas disminuyen la multiplicación de los microorganismos, pero el tiempo de supervivencia aumenta y las altas temperaturas favorecen la multiplicación, pero con menos tiempo de supervivencia. Esto permite que las *Leptospiras* puedan sobrevivir y mantener sus capacidades infectantes en el agua durante 22 días y en el barro 5 – 6 días. Como las infecciones por este agente ocurren principalmente en zonas con abundante cantidad de agua; en áreas pantanosas o de campo anegado, los brotes son frecuentes en épocas de lluvia y en climas templados . A pesar de todo esto, no todas las aguas son favorables para la supervivencia de las *Leptospiras*, ya que éstas también se ve afectadas por el pH y la salinidad (27).

Orina: Muchas infecciones en última instancia se deben a la contaminación con la orina de los animales enfermos, portadores o reservorios; siendo el pH el factor determinante de la supervivencia de las Leptospiras en la orina. Ellas no pueden sobrevivir en pH ácido, por eso, algunos autores plantean que la orina del hombre y la de los ratones y ratas no son fuentes de excelencia para la infección al no ser que sean diluidas por agua. La orina de los bovinos se considera como la de mayor excelencia para una fuente de infección ya que su orina es de pH alcalino lo que favorece la supervivencia del germen y en 1 ml de orina puede contener hasta 100 millones de microorganismos de Leptospira. Además, la orina de muchos animales presenta aglutininas y lisinas específicas, cuya presencia causan una disminución en el tiempo y del número de microorganismos.

Leche: Los animales infectados, muchos eliminan Leptospiras a través de la leche debido a la presencia de sustancias antimicrobianas, la supervivencia en la leche cruda es muy corta. La infección humana por el consumo de la leche cruda de animales infectados y/o convalecientes hasta tres días después del ordeño ha sido notificada (27).

Tejido animal: El tiempo de supervivencia de las Leptospiras en los tejidos es dependiente del pH postmortem y el efecto antagónico que supone la contaminación con otras bacterias. Lo que avala la capacidad infectante de los tejidos del animal principalmente en los mataderos y al parto.

Descargas posparto: se demostró que las descargas posabortos pueden mantener sus capacidades infectantes pasado 8 días de éste, mientras Ellis, (1983); Prescott, (1993); Ellis, (1994); Guijarro y Calvo, (1999) diagnosticaron la posibilidad de infección por contacto con las descargas uterinas posparto y pos- abortos (27).

Saliva: Desde que fue comprobada la infección en el humano tras mordeduras de animales como la rata o el perro, la saliva ha sido considerada como posible fuente de infección. También se sospecha los lamidos de los perros a los niños, con la lengua contaminada mecánicamente, podría ser una forma más (27).

Aves: Desde que en algunas zonas de España y Francia ocurrieron brotes de Leptospira en humanos en los años 50 del siglo XX del, serovar ballum y con la coincidencia de que ciertas aves cuya ruta migratoria afectaba tanto al Delta del Ebro en España, como al Delta de Ródano en Francia, dio lugar para que algunos científicos las consideren como posible fuente de. Por la posibilidad de que estas aves consumieran ratones infectados y probablemente, se convirtieran ellas mismas en vectores mediante la eliminación de las Leptospiras en sus fluidos.

Algunos han considerado que podría ser las garrapatas que funcionaron como posible transmisores hacia los lugar (27). **Factores Asociados a la infección**

Dependientes del Agente etiológico

Resistencia a factores medioambientales Depende de la temperatura, Ph neutro o ligeramente alcalino, humedad (32).

Capacidad infectante

La capacidad infectante y la patogenicidad depende del serogrupo o serovar (24).

Dependientes del huésped

Estado inmunitario: El huésped es refractario a la reinfección aunque los anticuerpos hayan disminuido, y el aumento en orina de las inmunoglobulinas IgA e IgG hacen que disminuya la cantidad de leptospiras que se eliminan en ella (32).

Edad: Los estudios realizados por Ellis y Michna, (1976) revelaron un 40 % de seropositividad con anticuerpos leptospirales en terneros hasta un año de edad y 72 % en los adultos hasta tres años de edad, donde ésta ha sido relacionada con el estado de portador renal en la última; mientras los animales pequeños se caracterizan por eliminar mayor cantidad de leptospiras en su orina (32).

Gestación: el aborto por leptospirosis se produce principalmente en los últimos estadios de la gestación entre los 6 y 9 meses (32).

Dependientes del ambiente

Alimentación: En los animales alimentados con ensilaje de grano como suplemento, provoca pH ácido, reflejando en la orina, eliminación de poca cantidad de leptospira (32).

Infecciones recurrentes: Ha quedado demostrado que después de una infección cualquiera, aumenta la receptividad de estos animales en contraer leptospirosis (32).

Aptitud y manejo: Dependiendo de la separación temprana de animales de sus madres o por el hacinamiento (32).

Especies susceptibles

Las especies de mayor importancia económica son bovinos, equinos, porcinos, ovinos y caprinos; también afecta en mayor o menor grado a otros animales domésticos y silvestres como perros, gatos, venados, nutrias, mapaches, zarigüeyas, musarañas, canguros, murciélagos, peces, reptiles, ranas, conejos, zorros, erizos, ratas y ratones, entre otros. La presencia de Leptospiras en fauna silvestre ha sido registrada a través de los años y se considera que casi cualquier especie de mamífero, tanto terrestre como acuático puede ser un reservorio del microorganismo. No obstante, la documentación de la signología de leptospirosis es rara en fauna silvestre (31).

Hospedero de mantenimiento:

Es aquel que asegura la perpetuación de una población determinada de parásitos *sensus lato*, sin la intervención de ningún hospedero accidental. Por lo tanto, la población de mantenimiento será aquella especie animal que actúa como un reservorio continuo de un serovar, en un ecosistema determinado (25). Una o varias especies de mamíferos domésticos o salvajes actúan de hospederos de mantenimiento de cada serovar o serogrupo de *Leptospira* patógena, donde una especie animal puede ser reservorio de varios serovares y diferentes especies

animales serlo de un mismo serovar. La complejidad de la epidemiología de la Leptospirosis es basada sobre el gran número de especies de diversas familias de mamíferos (roedores, carnívoros, marsupiales, etc.), que tienen la capacidad de mantener una amplia variedad de serovares (26). Los hospederos de mantenimiento se caracterizan por los siguientes elementos:

- Gran receptividad a la infección por el serovar frente al que mantiene como hospedaderos (dosis infectiva es menor)
- Relativa baja patogenicidad del microorganismo en el hospedero. • Presencia de infección renal con leptospiruria prolongada.
- Infección crónica
- Transmisión eficaz de la infección a los animales de la misma especie por contacto directo.
- En algunos hospederos, se mantiene la *Leptospira* en el tracto genital. La transmisión de la infección entre hospederos de mantenimiento se realiza independientemente de las condiciones climáticas y ambientales. Sin embargo, en el caso de la transmisión entre hospederos de mantenimiento y accidental o entre accidentales hace necesario la supervivencia del agente en el medio ambiente para poder efectuar la infección (27).

Características morfológicas de algunos hospedadores de mantenimiento

Sigmodon hispidus

Las ratas de esta especie son de talla mediana, cola fuerte y escamosa, pelo áspero de color grisáceo a negruzco en el dorso, con pelos amarillentos intercalados y en la parte ventral su pelaje es blanquecino a gris oscuro. Longitud de una rata adulta es de aproximadamente 204 a 380 mm, el largo de su cola es de 81 a 166 mm, la longitud de su pata trasera es de 25 a 41 mm. Sus hábitos son diurnos y nocturnos durante todo el año. Construye caminos superficiales, es buena nadadora, solitaria

y sólo en épocas de reproducción se les encuentra en parejas, formando grandes colonias dominadas por un macho. Su ámbito hogareño tiene probablemente un radio aproximado de 30 m. Su hábitat es pastizales y áreas cultivadas, cerca de zonas con depósitos de agua, ríos, lagunas y canales de riego. Se alimentan de tallos de plantas suculentas, semillas, hierbas, insectos, carroña y huevos de aves. Se reproducen todo el año, son poliestros y muy fecundos. Su período de gestación es de aproximadamente 21 días, con tamaños de camadas de 1 a 12 crías. Los neonatos nacen con pelo, son móviles y con piel ligera, abren los ojos aproximadamente a las 18 a 36 horas después del nacimiento, se destetan a los 10 a 15 días, son precoces ya que maduran sexualmente a los 40 días (35).

Rattus norvegicus

Denominada también rata común, parda, de agua o de Noruega (Figura I.3). Esta especie se distribuye en zonas templadas, subtropicales y tropicales de los 5 continentes. Es la más grande de las ratas. Un animal adulto mide entre 34 y 47cm de largo, incluyendo la cola, y pesa aproximadamente entre 300 a más de 400gr. Es de color pardo leonado, variando a veces a gris oscuro o pardo rojizo, con el vientre grisáceo o blanco amarillento. Su pelaje es corto, áspero y tieso, pero no tan rígido como el de la rata negra. Las orejas son relativamente pequeñas, redondeadas, peludas y pegadas a la cabeza. La cola es igual o más corta que la cabeza más el cuerpo, oscura por arriba y clara por debajo presentando un anillado poco marcado. Los ojos son pequeños y el hocico es chato. Es un roedor que prefiere los lugares húmedos y/o cercanos al agua. Por ello habita en las costas de los ríos y arroyos, en los sistemas de desagües, en las cloacas. Como es un buen nadador, le es fácil desplazarse en el agua. Cava muy bien, pero es un mal trepador. Habita preferentemente fuera de las viviendas, en madrigueras que construye cerca de alcantarillas y desagües, o que excava en el suelo. Estas excavaciones constituyen un sistema de galerías de varias bocas, en el fondo del cual instala el nido. Son animales nocturnos y omnívoros. Sus excrementos son cilíndricos y miden hasta 20mm. Una rata joven puede pasar a través de un orificio de 25mm de diámetro (36).

Rattus rattus

Denominada también rata negra o rata de los tejados. Se distribuye en zonas templadas, subtropicales y tropicales de los 5 continentes. Un animal adulto mide más de 30cm y hasta 45cm de largo con la cola incluida. Pesa de 120 a 350gr. Su pelaje, más liso y suave que el de *R.norvegicus*, varía entre el gris claro y el gris oscuro, siendo casi negro en la cabeza y el lomo. El pelaje del vientre es de color blanco. Las orejas son grandes, sobresalientes y prácticamente carecen de pelo. La cola, uniformemente oscura y de anillado muy marcado, es más larga que el cuerpo más la cabeza. Los ojos son grandes y prominentes y el hocico es puntiagudo. Es un roedor que habita en las cercanías de las viviendas o dentro de ellas. Se lo encuentra preferentemente en los sistemas de desagües y de cloacas, en los basurales, en lugares donde se almacenan víveres, en las paredes y techos de las casas, en huecos de árboles. Es un animal de activa vida nocturna. Hace sus nidos en lugares poco accesibles (paredes, techos, sótanos, desvanes, árboles, plantas trepadoras) y los confecciona con restos de cualquier material, tales como trapos, hilos, pajas, aserrín de madera. Rara vez hace sus madrigueras en la tierra, pero cuando esto ocurre construye un nido central con galerías de acceso de 5 a 6 cm de diámetro, cuyas bocas disimula con restos vegetales y tierra. Es muy buen trepador y muy ágil (es capaz de saltar hasta más de 80cm de altura). Son animales omnívoros. Sus excrementos son fusiformes y miden hasta 12mm. Un animal joven puede atravesar orificios menores de 25mm de diámetro (36).

Mus domesticus

Denominado comunmente ratón doméstico, ratón común o laucha casera. La distribución de esta especie comprende América, África y Australia. Es un roedor relativamente pequeño. La longitud de un animal adulto, incluyendo la cola, es de unos 13 a 19cm. Pesa entre 15 y 20gr. Su pelaje, corto, suave y lustroso, es de color pardo claro a pardo grisáceo oscuro, con la región ventral más clara. La cabeza es alargada, con orejas grandes y redondas. La cola es más larga que el cuerpo más la cabeza y es uniformemente oscura, poco peluda y con anillos bien marcados. Los

ojos son pequeños. El hocico es puntiagudo. Es un roedor que habita dentro de las casas o en sus inmediaciones, pero con frecuencia, también invade los campos cultivados. Su coloración puede ser diferente entre los que habitan en las viviendas y los que se encuentran en hábitats silvestres. Es eminentemente terrestre, buen corredor y trepa con facilidad. Anida en galerías poco profundas que cava en el suelo o bajo pisos de madera, así como también en tabiques o paredes de material. Su nido es tosco y poco prolijo, y lo prepara con trozos de tela, papeles y otros desperdicios, que dispone conformando una especie de bola hueca en cuyo interior pare sus crías. Son nocturnos. Su régimen alimentario es omnívoro y son muy resistentes a la falta de agua.(37)

Mus musculus

El ratón casero es una especie de roedor pequeña, que no rebasa los 21 cm de largo total y se caracteriza por poseer una cola aparentemente desnuda, pero con vellosidades finas. El color puede variar mucho, desde el gris claro hasta el café o negro y combinaciones de los anteriores. Generalmente es café claro o negro en las partes superiores del cuerpo y claro o blanco ventralmente; la cola es más clara por debajo. Las formas comensales tienden a tener cola más larga y pelaje más oscuro que las formas salvajes. Los pies posteriores son en general angostos y los dedos externos tienden a ser más cortos. Las hembras tienen 10 o 12 mamas. Al igual que el resto de los roedores, posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores, lo que ocasiona que haya un espacio vacío. Sus incisivos tienen una muesca y crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base (38).

Hospederos accidentales

Cualquier mamífero puede ser, potencialmente, hospedero accidental de las Leptospiras. Las características de mayor importancia de un hospedero accidental durante la infección de leptospira son:

- La transmisión es intraespecie y esporádica
- Signos de forma aguda grave (hepatitis, crisis hemolítica)
- Duración de la leptospiruria es apenas semanas
- Muestra para el diagnóstico es el animal enfermo
- Bajo porcentaje de animales seropositivos (27)

Reservorios típicos y serovares de *Leptospira* spp.

Reservorio	Serovar(s)
Cerdo	Pomona, Tarassovi
Vacuno	Hardjo, Pomona, Grippotyphosa
Caballo	Bratislava
Perro	Canicola
Oveja	Hardjo
Rata	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Ratón Marsupiales	Ballum, Arborea, Bim Grippotyphosa
Murciélago	Cynopterti, Wolffi

Patogénesis e inmunidad

Las leptospiras penetran en el organismo animal mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados; o a través de las membranas mucosas orales, nasales, del pene y especialmente la conjuntival y vaginal; o a través de piel lesionada o reblandecida por el agua teniendo un período de incubación promedio de 12 días. Las bacterias se difunden, invaden y vía linfática llegan al torrente sanguíneo, multiplicándose y circulando en la sangre, provocando leptospiremia por al menos 7 días. Esta invasión bacteriana produce pirexia, eliminación de leptospiras en la leche, anorexia, daño funcional de algunos órganos en especial órganos de filtración como el hígado, riñón y pulmón; sin embargo, abarca órganos como el bazo cerebro, globo ocular y placenta, especialmente en animales jóvenes. La respuesta humoral es una de las principales respuestas del cuerpo contra la *Leptospira*; y tiene gran utilidad para establecer un diagnóstico en el caso de la infección por serovariedades no adaptadas. El aumento de IgM es la respuesta serológica inicial y ésta es detectada a los pocos días de la infección, luego desciende progresivamente hasta niveles indetectables. Las IgM retardan proliferación de las espiroquetas, pero no las destruyen, entre la tercera y cuarta semana alcanzan su pico máximo. Es posible encontrar leptospiras que persistan en órganos como la cámara anterior del ojo, las meninges, y en el riñón ya que las leptospiras muestran tropismo por células de los endotelios vasculares y especialmente por epitelios de los túbulos renales, además de ser facilitada por la producción de ureasa proveniente de estas bacterias. Los anticuerpos tienen poco acceso a estas zonas, además, pueden invadir tramos del tracto genital, y en el caso de un útero grávido, pueden provocar abortos. Los niveles de citoquinas y factor de necrosis tumoral (TNF- α) están elevados en la leptospirosis severa y en fases agudas de la enfermedad el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se eleva y está asociado a la severidad de la enfermedad (39).

Mecanismos celulares y moleculares de la patogénesis en la leptospirosis

Las leptospiras son espiroquetas que presentan una gran movilidad, lo que les permite un rápido desplazamiento. Poseen diversas enzimas como hemolisinas, esfingomielinasa, fosfolipasa y hemaglutininas las que facilitarían su ingreso al hospedero. Son más fácilmente fagocitadas al ser opsonizadas por IgG específicas.

Se ha demostrado que el lipopolisacárido (LPS) de las leptospiras patógenas, activa los macrófagos, linfocitos B y en menor medida a linfocitos T y células NK. Se ha observado una disminución transitoria de los linfocitos T CD4+ así como una expansión policlonal de los linfocitos B, lo que sugiere una causa autoinmune por mimetismo molecular. En animales de laboratorio, los cambios morfológicos en riñones y en pulmones inducidos por variedades patógenas de leptospiras, son más severos en sujetos depletados de linfocitos T CD4+ y CD8+, lo que sugiere un papel protector importante de los mecanismos inmunológicos dependientes de células.

Los macrófagos estimulados producen interleucina 1 e interferón y tienen una mayor actividad bactericida, medida por la prueba del NBT y la quimioluminiscencia. Masuzawa et al demostraron que el LPS era el componente inmunodominante. No obstante, se ha establecido, in vitro, que el LPS de las leptospiras es menos activo biológicamente que el de algunas enterobacterias.

Se ha demostrado la producción de factor de necrosis tumoral en pacientes con leptospirosis y se ha asociado a la reacción de Jarisch-Herxheimer, pero principalmente se ha relacionado la presencia de este factor con la severidad y con la mortalidad de la enfermedad.

L. interrogans muestra in vitro la capacidad de adherirse a la membrana y de penetrar al citoplasma de células eucarióticas, lo que puede ser inhibido por proteasas, suero inmune de conejo y por el calor, lo que demuestra la capacidad invasora de las leptospiras patógenas. *L. biflexa* no muestra capacidad invasora in vitro.

En algunos pacientes con leptospirosis severa se ha logrado identificar altas concentraciones de anticuerpos anticardiolipina de la clase Ig G. Esto sugiere que la leptospira podría ocasionar una lesión endotelial, con la exposición de antígenos "críticos" o con la producción de cambios conformacionales en los fosfolípidos por acción de fosfolipasas propias (40).

Younes-ibrahim et al demostraron en animales de laboratorio que una fracción glicoproteica de *L. interrogans* (endotoxina) exhibe una potente actividad inhibitorio sobre la Na-KATPasa renal. Los autores especulan que si esto se lograra demostrar para otras Na-K-ATPasas en humanos, podríamos estar en la presencia del primer evento fisiopatológico en la leptospirosis que explicaría alteraciones tales como la insuficiencia renal y los cambios en el funcionamiento hepático (41).

Se ha señalado en los cultivos de leptospiras patógenas, la producción de citotoxinas y enzimas como hemolisinas, fosfolipasas, catalasas, hialuronidasas, colagenasas. Varios investigadores consideran a las hemolisinas como el factor de virulencia más potente dentro de las toxinas producidas por *L. interrogans*. Hasta hace algunos años se pensaba que la hemólisis producida por las cepas de leptospira era el resultado de la actividad de las enzimas fosfolipasas. La actividad fosfolipasa ha sido demostrada tanto en cepas saprofitas (*L. biflexa*) como patógenas (*L. interrogans*), pero sólo entre las cepas patógenas ha sido probada la actividad esfingomielinasa (28).

Otros estudios, empleando técnicas de biología molecular, han identificado al menos dos importantes hemolisinas en cepas de *L. interrogans*, con una marcada actividad hemolítica y citotóxica: la hemolisina SphA descrita en la especie genómica *L. borgpetersenii*, con actividad fosfolipasa y esfingomielinasa y la hemolisina SphH descrita en el serovar Lai, que carece de actividad fosfolipasa pero muestra actividad citotóxica sobre los eritrocitos y varias células de mamíferos, al parecer, mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana de la célula diana. Los genes que codifican para la nueva hemolisina SphH, formadora de poros, han sido descritos en las cepas de *L. interrogans* pero no en *L. biflexa*. La

importancia en la patogénesis de esta otra esfingomielinasa Sph no está determinada. Sin embargo, la reciente disponibilidad de la secuencia del genoma de las leptospiras patógenas y saprofitas unida al desarrollo de los sistemas de mutagénesis permiten investigaciones más detalladas, y han definido genéticamente los mecanismos celulares y moleculares de la patogénesis en la leptospirosis. Por ejemplo, la ausencia de genes de esfingomielinasa en *L. biflexa*, explica el papel de estas enzimas en la patogénesis. El primer factor de virulencia genéticamente definido en las leptospiras fue la lipoproteína de superficie Loa22 con dominio OmpA. Un mutante del transposoma de Loa22 se atenuó tanto en hámsteres como en curieles para la leptospirosis aguda. La función de Loa22 se desconoce y es notable que un homólogo de éste se encuentre en *L. biflexa*. Recientemente, el gen hemO, que codifica una hemo-oxigenasa está involucrado en la virulencia en hámsteres, pero no es esencial para ésta. Un juego de seis proteínas de la superficie, denominadas LenA, hasta LenF, estructural y funcionalmente similar a la endostatina de los mamíferos, se une al factor H regulador del complemento. Es interesante conocer que estas proteínas, excepto LenA, también se unen a la fibronectina. La proteína principal de superficie, LipL32, se ha visto también enlazada a la laminina del hospedero, como al colágeno y a la fibronectina. LipL32 es única y muy conservada en las leptospiras patógenas. Es por consiguiente, notable que no esté envuelta ni en la leptospirosis aguda en hámster ni en la colonización de los riñones de la rata. Un hallazgo similar parece aplicar para las proteínas Lig expuestas en la superficie; ellas sólo están presentes en las especies patógenas y su expresión se pierde en los subcultivos, con la consiguiente pérdida de la virulencia. Tanto LigA como LigB enlazan la fibronectina, y su expresión es regulada bajo condiciones de osmolaridad fisiológica. Sin embargo, la inactivación de LigB no afecta la virulencia en hámsteres. Los resultados de los estudios anteriores indican un alto grado de redundancia de proteínas de leptospiras involucradas en la adherencia, supervivencia in vivo y la colonización renal, sugiriendo que será difícil identificar y definir los factores de virulencia con la simple inactivación del gen. Otro factor de considerable importancia en la interacción patógeno-hospedero, para el caso de *Leptospira*, es la baja

densidad de proteínas de transmembrana en la membrana externa de este microorganismo, lo cual puede constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que permite la persistencia del patógeno en el hospedero (28).

Patología renal en la leptospirosis.

El cuadro renal es predominante en la leptospirosis y hasta hace poco tiempo la causa principal de la mortalidad. Las lesiones anatomopatológicas básicas son la necrosis tubular aguda y la nefritis intersticial a veces con la presencia del microorganismo en el parénquima.

La necropsia demuestra riñones aumentados de volumen, superficie externa lisa y al corte se evidencia la cortical muy gruesa con intensa impregnación biliar, límites precisos, médula congestiva, con estrías hemorrágicas y en algunos casos es posible observar petequias en la pelvis y sangre en la luz uretral.

La histología revela una combinación de nefritis intersticial focal y necrosis tubular aguda, también focal, los glomérulos presentan moderada hiper celularidad a predominio de las células axiales y en algunos espacios urinarios se observan depósitos hialinos reticulados, interpretados como de origen proteico, la nefritis intersticial está representada por acúmulos de mononucleares, particularmente linfocitos, histiocitos y eosinófilos, acompañados de intenso edema y vasodilatación con congestión y tumefacción endotelial.

La necrosis tubular está representada por grupos de túbulos principalmente distales, dilatados y revestidos por células epiteliales bajas y de citoplasma basofílico.; En la luz a veces se observan cilindros hialinos, la biopsia renal en la leptospirosis humana demuestra esencialmente los mismos hallazgos pero en menor intensidad, de la misma manera que en el hígado, hay antígenos con aspecto de filamentos alargados y pueden ser demostrados por técnicas de inmunohistoquímica en el intersticio renal, tanto en la cortical como en la medular, pero sobretodo en el límite cortico - medular, donde la dilatación de los vasos y la nefritis intersticial son particularmente prominentes.

Varios estudios experimentales han demostrado las principales alteraciones en el órgano, para algunos investigadores la nefritis intersticial representa la lesión más precoz, tal vez la principal, esta lesión expresaría la reacción del riñón a las leptospiras o sus productos. Para otros el daño tubular es el gran responsable por la insuficiencia renal aguda.

Algunos estudios Clínicopatológicos demostraron una limitada correlación entre la extensión de la necrosis tubular y la intensidad de la insuficiencia renal, se señala que habría una acción simultánea de la leptospira sobre la microcirculación renal y los túbulos debido a que no hay evidencias morfológicas de precedencia de las lesiones vasculares sobre las tubulares (15).

Sintomatología

El período de incubación es generalmente de 2 – 30 días. Los síntomas son muy variables en dependencia de la especie, el serovar, virulencia del germen y el estado inmunitario del hospedador.

Humano: Se puede presentar como una leve infección, un cuadro anictérico (90 – 95% de los casos) o de forma ictérica (5 – 10% de los casos).

Anictérica: Se presenta de forma brusca y suele durar 7 días, presentando los siguientes síntomas: fiebre (puede ser bifásica), cefalea, escalofríos, postración, mialgias (principalmente pantorrillas y región lumbar), náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, artralgia y a veces meningitis aséptica. Ictérica: Es la forma más severa dependiendo del serogrupo. Los síntomas son irritación conjuntival, irritación meníngea y rigidez de la nuca, insuficiencia renal, ictericia, manifestación hemorrágica intestinal o pulmonar, arritmia o insuficiencia cardíaca o disnea y a veces hemorragia generalizada (42).

En bovinos: la enfermedad puede ser aguda, subaguda y crónica.

En la forma aguda son mas susceptibles los animales de un mes de edad. Se caracteriza por septicemia, fiebre de 40.5 C°, anorexia, petequias en mucosas, depresión, ictericia, anemia hemolítica con hemoglobinuria, palidez de las mucosas, disnea, suele ocurrir aborto, baja de la producción de la leche y ocasionalmente mastitis (43).

En la forma subaguda se presentan los mismos síntomas, la fiebre es de 39 a 40 C°, existe baja de la producción láctea y esta es de color rojo o anaranjado amarillento (43).

En la forma crónica, generalmente los síntomas son aborto, que se presenta en el último tercio de la gestación; ocasionalmente se puede presentar meningitis leptospirósica, incoordinación, sialorrea, conjuntivitis y rigidez muscular (43).

Ovino – Caprino:

Las epizootias en estas especies son muy raros, especialmente en el caprino. Muchos de los animales afectados aparecen muertos, aparentemente por septicemia. Animales enfermos presentan: fiebre, anorexia, disnea, ictericia, hemoglobinuria, palidez de las mucosas, infertilidad, nacimiento de crías débiles o muertos y aborto. Pueden presentarse forma crónica con pérdida de la condición corporal, pero el aborto parece ser una manifestación exclusivamente asociada a la forma aguda de la infección por los serovares pomona y hardjo (44).

Caninos y Felinos:

Los síntomas son variables, desde la ausencia total de signos clínicos hasta un síndrome icterohaemorrágico casi ausente en gatos, con la instalación repentina de hemorragia con fiebre de 3.4 días, seguida por rigidez y mialgia en miembros posteriores, hemorragia en la cavidad bucal con tendencia a necrosis y faringitis. En

una etapa posterior puede haber gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda. En la forma subaguda o crónica se desarrolla vómito, inapetencia, postración y anemia debido al fallo renal progresivo (44).

Equino: En esta especie, los síntomas son variables y en la mayoría de los casos la enfermedad cursa de modo asintomático aunque puede producirse fiebre, ictericia, hemoglobinuria, necrosis de la piel y los labios, conjuntivitis con edema en los párpados, lagrimeo y fotofobia donde se puede observar hepato-nefritis, muchas veces se presenta abortos en el último tercio de la gestación. La oftalmia periódica está considerada como una complicación de la Leptospirosis y se caracteriza por iridociclitios (44).

Lesiones.

El mecanismo por el cual las leptospiras causan la enfermedad no se conoce con exactitud. Las lesiones al organismo hospedero ocurren cuando la concentración de leptospiras alcanza un nivel umbral. El marcado contraste entre la extensión del deterioro funcional y la escasez de lesiones histológicas sugieren que la mayoría de los daños ocurren a nivel subcelular. Las lesiones primarias son daños al endotelio de los pequeños vasos sanguíneos, provocando la extravasación de sangre, emigración de leptospiras a los tejidos y una relativa anoxia local. Prácticamente todos los órganos del cuerpo son afectados (circulatorio, respiratorio, digestivo, urinario, nervioso, oftálmico, reproductor), lo cual explica la variedad de manifestaciones clínicas de la enfermedad (45).

Las lesiones que aparecen en la Leptospirosis no son patognomónicas, por lo que no puede basarse en ellas para el diagnóstico de la enfermedad. También las lesiones pocas observables depende del serovar implicado así como; los órganos y especie afectadas. El cadáver animal revela ictericia manifiesta, necrosis de la piel; de los ollares, de la cavidad nasal y bucal. En la necropsia se observa acúmulo de

líquido serolo-gelatiliforo rojizo en el tejido subcutáneo, hígado hipertrófico y palidez hepática, o color amarillenta, vesícula biliar llena, espesa y viscosa de color pardo o verde oscuro bazo de tamaño normal o ligero de color amarillento, lesiones muy variables desde lesiones blanco amarillento en la superficie o focos hemorrágicos en pulmón. El músculo cardíaco degenerado y en algunos puntos hay hemorragias. Los riñones están edematosos de color rojizo o pardo oscuro con nefritis intersticial, lesiones necróticas e ictericas por toda la superficie, también hemorragia. La vejiga, llena de orina turbia o rosada, los ganglios tumefactos y las mucosas intestinales pueden estar inflamadas. En los fetos abortados se observan congestión generalizada y deposiciones líquidas. También se puede encontrar ictericia, mastitis, fluido libre en cavidades corporales, lesiones petequiales dispersas, edema perirenal, nódulos linfáticos aumentados de tamaño, bilis de consistencia pastosa y color negruzco (27).

Diagnóstico

Diagnóstico epidemiológico Se debe enfatizar en las anamnesis de los aspectos siguientes: En la época del año en la que ha aparecido el brote, principalmente en climas húmedos y precipitaciones, la aptitud del rebaño, manejo y estado sanitario, control de otras especies domésticas (perros, cerdos, ovejas, etc.) y animales silvestres potencialmente portadores, antecedentes de leptospiras y si existe un programa de vacunación contra la Leptospirosis (44).

Diagnóstico clínico Tiene un carácter presuntivo y se realiza fundamentalmente a través de los signos y síntomas que presenten los animales y el humano.

Diagnóstico de laboratorio Las muestras de animales vivos utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad son sangre y leche en la fase aguda; y orina en la fase crónica. De los fetos, los órganos de elección son: hígado, riñón, cerebro, glándula adrenal y pulmón, así como cualquier fluido interno. Los animales muertos y sacrificados, las muestras que se deben enviar son: cerebro, médula espinal, LCR

y ojo cuando hay síntomas nerviosos, y la mayoría de los órganos parenquimatosos en los casos que cursan con ictericia (hígado, riñón, bazo etc.) y la vejiga y su contenido, humor acuoso, aborto y contenido estomacal. Las muestras postmortem más adecuada son: riñón (parte cortical), hígado, bazo, así como sangre de corazón o líquido cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido peritoneal, cerebro, fetos abortados, semen y leche materna, deben preservarse congelados en glicerol a partes iguales. El diagnóstico debe basarse en el conocimiento de la patogenia del microorganismo, así como de sus propiedades. Estos métodos se pueden dividir en:

- **Técnicas indirectas** Los métodos serológicos nos brindan un diagnóstico en corto tiempo y son capaces de detectar anticuerpos antileptospirales (que pueden ser de la clase IgM e IgG), las que constituyen las técnicas de elección. El mayor problema que presenta son los niveles de anticuerpos, aunque se mantengan durante años, alcanzan niveles tan bajos en animales y personas infectados crónicamente que no siempre se detectan , además en los casos de infección por serovares adaptados un porcentaje de los animales pueden no presentar respuestas con anticuerpos (44).

Técnica de microaglutinación (MAT).

Es el método serológico de referencia; técnica que fue ideada por Martin en 1917 y Pettit 1918 quienes lograron describir el fenómeno de aglutinación y lisis con suero; a partir de esa fecha este método ha sido modificado y mejorado por distintos autores tales como: Schüffner y Mochtar, 1926 Borg.Peterson y Fagroeus 1949. Se emplea para detectar anticuerpos en sueros de sospechosos o enfermos (humanos y animales) donde el suero del paciente sospechoso o enfermo reacciona con antígenos vivos de leptospiras de 10 días de crecimiento en medio líquido de EMJH con enriquecimiento, y es el más utilizado cotidianamente. Para obtener una adecuada sensibilidad, se recomienda utilizar cepas representativas de todos los serogrupos presentes en un lugar determinado concreto y de la especie objeto de estudio. También hay reportes de una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92

% y 95 %, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95 % y negativo 100%.

Al igual que otras pruebas serológicas, para diagnosticar una infección individual mediante MAT, se requiere estudiar dos muestras pareadas de 7.14 días de intervalo de la primera y si se observa que ha habido seroconversión, se considera de valor diagnóstico un cambio en el título de al menos, cuatro veces el título inicial. Es una prueba principalmente de rebaños, pues la obtención de títulos individuales frente a las leptospiras, se considera poco significativo.

A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: no distingue anticuerpos vacunales de los de infección, resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva, requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras y no siempre detecta a los animales infectados, en especial cuando el serovar implicado es *L. hardjo*, que presenta como características ser poco antigénico. Para llevar a cabo MAT es necesario utilizar cultivos de 4.8 días, ya que esto nos permitirá obtener resultados más confiables y no tendremos títulos por debajo, lo cual, se debe a reacciones específicas (44).

Prueba de Aglutinación Microscópica con Antígeno Muerto (MSAT)

Utiliza leptospiras formoladas y centrifugadas, resuspendidas a una cierta densidad estándar, con un "pool" de antígenos de varios serogrupos. La aglutinación que se produce es semicuantitativa y puede leerse a simple vista. Esta reacción es menos específica que MAT, menor nivel de títulos obtenido, mayor reacción cruzada, los antígenos son estables a 4°C por lo menos un año, es especie específica y de la misma forma que MAT, no diferencia reacción entre anticuerpos de la infección reciente y tardía, pero tiene una buena reacción temprana de la enfermedad (44).

Fijación del Complemento (FC)

Es una prueba género-específica que emplea como antígenos de *L. biflexa*, considerada tan fiable como el MAT para la detección de animales con leptospirosis, pero, detecta infección reciente, es útil en la pesquisa de grandes cantidades de sueros ya que puede semiautomatizarse. Es una herramienta epidemiológica para diagnóstico rápido, menos laboriosa que el MAT. Las desventajas son las sustancias anti complementarias del suero, la corta vida e inestabilidad del antígeno, no permite la diferenciación de serovares y no detecta niveles bajos de anticuerpos (44).

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Esta técnica puede detectar anticuerpos tanto en tanque de leche como en el suero. Es capaz de detectar la IgM durante la primera semana de la enfermedad y la detección tardía de IgG que permite diferenciar infecciones recientes de pasadas. La detección de anticuerpos específicos IgM con una sola muestra es confirmatoria de una infección reciente por leptospiras. Se considera como más sensible que MAT, es fácil de estandarizar los antígenos, pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos y pocas reacciones cruzadas, tampoco diferencia los anticuerpos vacunales de las infecciones. A pesar de que es una prueba muy eficaz, aún no está considerada como prueba oficial (44).

Aglutinación macroscópica (MA)

Pocos autores la recomiendan debida a su falta de sensibilidad y porque no es capaz de determinar el serovar (44).

Aglutinación en microcápsula

Se utiliza antígeno leptospiral transportado en microcápsulas de un polímero (44).

Hemoaglutinación indirecta (HA)

Es una prueba serológica género-específica de alta sensibilidad y solamente detecta las IgM. Utiliza eritrocitos de ovejas o del grupo sanguíneo O humano. A pesar de que siempre se ha considerado de utilidad, no ha llegado a desplazar al MAT y de hecho, se utiliza de manera paralela a él. Resulta de valor para la detección de infecciones recientes. Tiene una sensibilidad y especificidad de 92 % y 95 % comparado con MAT respectivamente. Por estos altos valores en el territorio cubano es la técnica elegida para el diagnóstico de Leptospirosis humana (44).

Técnicas directas

Observación en microscopio de campo oscuro

Este método se realiza para la observación de leptospiras en los fluidos orgánicos. Es difícil debido al gran número de artefactos que, por su parecido con las leptospiras, pueden crear confusión. Además precisa que haya un gran número de microorganismos en las muestras (44).

Tinción Argéntica:

Dentro de este grupo podemos considerar diferentes técnicas, como: la técnica de Warthing-Starry y sus modificaciones y la técnica de Steiner -Steiner. Se utiliza para la demostración de Leptospiras en los órganos de animales presumiblemente muertos por leptospiras. La presencia de leptospiras en fetos abortados y mortinatos son indicadores claros de que es una infección activa en el feto y crónica en la

madre, considerando de valor diagnóstico. Además de su baja especificidad y sensibilidad, presenta las mismas inconveniencias que la anterior (44).

Técnicas de tinción Inmunohistoquímica:

Tienen baja sensibilidad, por lo que son poco adecuados para el diagnóstico de portadores crónicos, lo que depende del número de microorganismos en la muestra (44).

- **Inmunofluorescencia:** Es más adecuada para la detección de leptospiras que las anteriores. Casi siempre se utiliza en el diagnóstico para los casos de abortos y de la presencia de Leptospiras en sedimentos de orina. Su mayor desventaja es que requiere la producción de antisueros policlonales de buena calidad y necesita la utilización de microscopio de fluorescencia.
- **Inmunoperoxidasa:** Es más rápida y asequible que la anterior ya que no precisa de un microscopio de fluorescencia.
- **Marcado de partículas de oro:** Al igual que las anteriores, depende del número de microorganismos y poco sensible (44).

Aislamiento y estudio de ácidos nucleicos Son pruebas modernas que aun precisan más estudios sobre su efectividad y utilidad. Comprende: marcado con sondas de ADN, hibridación de ARN, marcado con radio y PCR con mayor efectividad en la orina (44).

Aislamiento

Para muchos autores, es la técnica más sensible para el diagnóstico de leptospiras, además es la que confirma la presencia del germen, tanto en casos agudos como crónicos, a pesar de que requiere mucho tiempo y de laboratorios especializados. La inoculación en animales de experimentación puede considerarse una forma especial del aislamiento y está considerada como la técnica más sensible por algunos científicos. También existen otros métodos pero no de amplio uso en el mundo como: Prueba Hemolítica (HL), Contrainmunolectroforesis (CIE), Inmunoabsorción Magnética, Hibridización de ADN., Absorción de antígeno inmunomagnética etc. (44).

Reacción en cadena de la polimerasa La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; a partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. 26 Sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida (44).

Fundamento e importancia

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar

nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent). Actualmente el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. La PCR es una técnica común y normalmente indispensable en muchos laboratorios de investigación médica y biológica en varios países para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas (44).

Diagnóstico diferencial

Para llegar al diagnóstico diferencial, es necesaria una buena anamnesis que abarque los antecedentes particulares y/o animales patológicos de 15-20 días anteriores a la presentación de la enfermedad.

Bovinos: Se deben diferenciar con cuadros que cursan con: hemoglobinuria, hematuria, hemólisis, aborto, Mamitis y disminución de la producción láctea como: Anaplasmosis, Babesiosis, Pasteurellosis, Brucelosis, Listeriosis, Vibriosis,

Trichomoniasis, Toxoplasmosis, IHBB., intoxicación por cobre y “rapum”, hemoglobulinuria posparto y trastornos alimentarios.

Ovino-caprino: Similar al bovino.

Porcino: Brucelosis, Peste porcina, Aujeszky, Listeriosis, Salmonelosis, SMEDI virus, Parvovirus porcina, Encefalitis viral japonesa, Erisipela porcina, deficiencia nutricional.

Equino: Anemia Infecciosa Equina, Salmonelosis, Babesiosis, Tripanosomiasis, Artritis viral equina, Rinoneumonitis viral equina y la causada por streptococcus genitalium.

Canino: Hepatitis canina, trastornos gastrointestinales.

Humano: Dengue, Malaria (paludismo), Influenza, Hepatitis viral, Fiebre hemorrágica epidémica, hantavirus, septicemia con ictericia, Fiebre Q, tifo, Brucelosis, Borreliosis, Toxoplasmosis, Fiebre Amarilla, Piolonefritis, Gripe, síndrome de disfunción orgánica múltiple (27).

Profilaxis y Tratamiento

Para que las medidas que se quieren tomar sean efectivas para el control de la enfermedad en cuestión, es sumamente imprescindible la identificación lo antes posible de los animales afectados, así como el serogrupo y/o serovar actuante, puesto que la presencia de un serovar u otro depende principalmente de la existencia de su hospedero de mantenimiento específico y según sea el hospedador, las medidas de control serán diferentes (47).

Profilaxis

Desde el punto de vista epidemiológico, la es una enfermedad difícil de controlar ya que el microorganismo se puede albergar en el riñón y ser eliminado en la orina de muchos animales, perpetuándose entre ellos el estado de portador. Sin embargo, se deben realizar esfuerzos para conocer la prevalencia de serotipos específicos en

una determinada población y describir los focos de contagio a fin de evitar aparición de nuevos casos (48).

Inmunoprofilaxis

Dentro de la inmunoprofilaxis se puede considerar tanto la vacunación como la inmunización pasiva con suero hiperinmune (49)

La vacunación es una práctica muy extendida en muchos países, siendo, para algunos autores, la mejor herramienta de control. Sin embargo, presenta una serie de inconveniencias en primer lugar: las vacunas comerciales son bacterinas y no proporcionan inmunidad cruzada entre serovares distintos y sola permiten una protección limitada frente a cepas distintas de un mismo serovar (50).

Los serovares y las cepas varían entre países, por lo que la protección ofrecida por las vacunas elaboradas con cepas de otro país o región, en otras regiones puede ser poca eficaz. En segundo lugar, diversos estudios sobre las vacunas existentes, han demostrado que tanto monovalente, bi y hasta pentavalente, no evitan la infección siguiente, tampoco evitan la leptospiruria ni el nacimientos de algunas crías débiles y mortinatos (51).

A pesar de estas limitaciones, la vacunación sigue siendo parte importante del sistema control en los rebaños se demostró que un programa de vacunación de todo un rebaño (bovino) durante cinco años, es posible el control de las infecciones por *L. hardjo* y su eliminación del rebaño. También, se considera que el calendario de vacunación debe ser al principio del período seco y en el parto, puede disminuir las pérdidas económicas por abortos (47).

Primo vacunación: se vacunan todos los animales del rebaño, machos, hembras y terneros.

Segunda dosis a los 21 días de la primero.

Revacunación en forma anual o semestral de acuerdo al productor.

Machos: vacunar antes de entrar al servicio para proteger al rodeo.

Hembras: vacunar antes del servicio y previo al parto.

Terneros: vacunar a los 2 meses de edad y luego revacunar en dependencia del productor.

La otra variante es la vacunación total del rebaño y luego tratar con dihidroestreptomina 2 mg/kg a todas las vacas preñadas. También hay programa de vacunación cuando se aplica en los cerdos y perros (52).

Profilaxis Higiénico – Sanitario

La profilaxis higiénico-sanitaria es esencial en el control de la en una población humana y animal, pero siempre ha de formar parte de un sistema general de control, junto con la vacunación y el tratamiento, ya que ninguna de estas medidas son eficaces por separado (50).

Las medidas higiénicas- sanitarias deben basarse en dos puntos esenciales: el control de hospedadores de mantenimiento silvestres y el control de hospedadores domésticos (47), También los factores ecológicos que influyen en la epizootología de la como: densidad alta de población animal, su migración natural o planeada, las características geográficas, agronómicas y meteorológicas del ambiente y los cambios estacionales deben tomar en cuenta (53)

Tratamiento

El objetivo primordial para el tratamiento contra la infección por Leptospirosis, es controlar la infección antes del daño irreparable que puede ocurrir en el hígado y riñón. Prácticamente todos los antimicrobianos tienen efecto sobre la infección por leptospiras, excepto de las sulfonamidas y el cloranfenicol en animales. Los antibióticos más recomendados son: dihidroestreptomina, doxiciclina, penicilina, estreptomina, oxytetraciclina, tetraciclina, etc. (49).

Bovinos:

Dihidriestreptomicina: 25mg/kg./5 días /IM.

Estreptomicina: 12-25mg/kg./ dos veces al día por 3 días / IM.

Estreptomicina: 25mg/Kg. una sola vez durante la fase de leptospiruria.

Clorhidrato de tetraciclina: 11mg/kg./5 días

Tetraciclina: 15-25 ml/kg/4 días / IM.

Oximicina: 100g/5 días / IM.

Transfusión sanguínea 5-10 L/450kg en caso de anemia hemolítica.

Equinos y caninos:

Dihidriestreptomicina: 20-25mg/kg./24h durante 4-6 días / IM.

Tetraciclina: 15-25mg/kg./12h durante 4-6 días /IM.

Penicilina en caso agudo: 10000-20000UI/kg./12h durante 5-7 días /IM.

Corticosteroides por vía parenteral en caso de oftalmia periódica en equino

Pomada de atropina en equino tres veces diario.

Para los cerdos:

Tetraciclina: 6,6 mg/kg./día/5días/IM

Oxytetraciclina: 800g/ tonelada de pienso de 8-11 días

Estreptomicina: 40-50mg/kg./dic/4-6 días/IM

Oximicina: 20-30mg/kg./4-6días/IM

Ovino-caprino:

Dihidroestreptomina: 20-25/kg./4-6días/IM

Oxytetraciclina: 20-30mg/kg./4-6días/IM

Estreptomina: 40-50mg/kg./día/4-6 días/IM

Además de los antibióticos, en dependencia de la gravedad y sintomatología se admite la aplicación de: transfusión sanguínea, analgésicos, sueros hiperinmunes y gammaglobulinas.

En bovino, un trabajo relativamente reciente propone la amoxicilina como opción a la dihidroestreptomina en el tratamiento de ganado infectado con *L. hardjo*.

VIII. DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 Tipo de Estudio

Descriptivo Transversal

8.2 Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en la región nor-occidental del municipio de Chichigalpa del departamento de Chinandega, Nicaragua, ubicado entre las coordenadas geográficas 12°32'03" latitud norte y 87°02'54" longitud oeste y colinda con los municipios de Posoltega, y las comunidades Los Pacientes, La Virgen, Cosmapa, Erick Ramírez, El Realejo, Santa María y La Soledad.

8.3 Periodo de la investigación

La investigación se realizó durante los periodos marzo 2015 y julio 2016.

8.4 Descripción de las unidades de estudio

Para el estudio se utilizaron suero, orina y riñones de roedores de cañaverales.

8.5 Metodología de campo

Se utilizaron trampas Sherman para la captura de los roedores, el número de trampas variaba según la extensión del campo. Éstas eran lavadas con agua y asperjadas con etano. Se les cambiaba el cebo, ya sea galletas y pequeños trozos de caña de azúcar. Las trampas se ponían a las 5 a 6 pm. y se retiraban a las 6 y 7: am del día siguiente.

8.6 Evaluación de la captura de roedores

Para calcular el índice de abundancia se estima mediante el método directo, el cual se basa en la ponderación del número de individuos capturados mediante la utilización de un sistema de trampas durante un tiempo controlado, se utilizó la siguiente formula: Índice de abundancia: N° de roedores capturados/ Esfuerzo de captura \times 100 Dónde:

Nº de roedores capturados: corresponde a la cantidad de roedores atrapados dentro de las jaulas, más la cantidad de trampas activadas, aun cuando estén vacías.

Esfuerzo de captura: equivale al número de trampas colocadas por número de días que funcionaron.

8.7 Población de estudio

Roedores de cañaverales de la región nor-occidental de Nicaragua.

8.8 Tamaño y Tipo de Muestras

Se muestrearon 77 roedores de los que se obtuvo suero sanguíneo para realización de técnica de microaglutinación, riñones para aislamiento bacteriano y diagnóstico histopatológico.

8.9 Clasificación de las especies de roedores procesados

Los roedores en estudio fueron clasificados en *Sigmodon hispidus* (rata cañera) 35.42% (46/77) y *Rattus rattus* (rata negra) 5.19% (4/77) de los cuales 27 no fueron identificados. Esta clasificación se realizó basándose en las características morfológicas tales como: forma de la nariz, tamaño de la cola, forma y tamaño de las orejas, peso, largo en centímetros, pelaje. (50)

8.10 Datos obtenidos a partir de la captura

Se elaboró una ficha para la recolección de datos de los animales capturados en donde se detalla lugar de captura, fecha de captura, la especie, el sexo, el tipo de muestra extraída (sangre, riñón,), el diagnóstico utilizado (aislamiento, MAT, H&E) y los resultados obtenidos. (Anexo 1)

8.11 Recolección de la muestra

La muestra de sangre se tomó por punción cardiaca

La muestra de riñón se extrajo una porción de 2 – 3 cm de la parte cortical del órgano.

8.12 Factores de Inclusión

Todos los roedores capturados en el área y periodos de estudio

8.13 Factores de exclusión

Roedores muertos

8.14 Análisis de los resultados

Se determinó el porcentaje de roedores infectados con *Leptospira* spp utilizando el programa Microsoft Excel 2010 para realizar un análisis descriptivo, con los datos obtenidos en la ficha y resultado de laboratorio

8.15 Materiales

Algodón	Mechero Bunsen
Cloroformo	Jeringas de insulina
Tijeras	Tubos de ensayo
Pinzas roma	Medio de cultivo EMJH+5Fu
Pinzas con diente	Cubre objeto
Alcohol	Porta objeto
Campana de flujo laminar Flufrance	Gradillas
Puntas para pipetas	Microcentrifuga
Incubadora Thermo Scientific	Tubos Eppendorf
Refrigeradora Whirlpool	Pipetas
Balanza	PBS
Descartador	Papel toalla
Agua destilada	Computadoras
Papel de aluminio	Cámaras fotográficas
Microscopio de campo oscuro Olympus	Jabón líquido
Placas ELISA fondo U	

Campo

Cebo (galletas)

Lapicero

Guantes nitrilo

Jaulas para roedores

Trampas Sherman

Cinta adhesiva blanca

Marcadores permanentes

Bolsas plástica transparente

8.16 Procedimiento para el sacrificio de los roedores.

Todos los roedores obtenidos, fueron anestesiados con cloroformo, posteriormente diseccionados por el personal veterinario del Baylor Collage of Medicine de Houston y del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), de la escuela de Medicina Veterinaria UNAN-León. (51)

8.17 Método para disección

Las ratas atrapadas fueron introducidas individualmente en bolsas plásticas transparentes para su sedación, luego se empapaba algodón con cloroformo como anestésico para poder manipularla. (51)

El animal, aún con vida, fue colocado en la campana de flujo laminar, en decúbito dorsal, luego se realizó una incisión cortando piel y musculatura accediendo a cavidad abdominal. Se continuó con la incisión cortando diafragma y costillas para exponer el corazón en la cavidad torácica, Se ~~apartaron~~ separaron las vísceras de la cavidad abdominal, ya identificadas para acceder al riñón, del cual se extrajo una porción de 0.2 cm de la parte cortical del órgano y si la vejiga se observó ~~se encontró~~ llena, se realizó extracción de orina por punción directa. Todas las muestras fueron rotuladas según su código de ingreso en el CEVEDI. (51)

8.18 Descripción de la técnica de MAT

Las muestras de sangre son centrifugadas para la extracción de suero, el cual es transferido a tubos Eppendorf y luego se congelan hasta su análisis.

Pasos para realizar el test de Micro aglutinación

- Preparación de los sueros: los sueros deben ser descongelados antes de proceder a realizar su análisis mediante el MAT. El suero de roedores se utilizó a una dilución de 1:40, para ello diluir 25 µl de suero en 975 µl de PBS (Tampón fosfato-salino)
- Preparación del antígeno: rotular los tubos en el cual se diluirán los antígenos, estos se preparan tomando 2 ml del tubo de crecimiento y diluyéndolo en 3 ml de PBS, de forma que al microscopio se observan unas 100 Leptospiras por campo). Para este estudio se utilizaron 12 antígenos diferentes correspondientes a cepas de *Leptospira* spp de cepario Holandes Las cepas utilizadas fueron *Canicola (Ag6)*, *Grippotyphosa (Ag10)*, *Hebdomadis(Ag11)*, *Icterohaemo Ag(12)*, *Icterohaemo Ag(13)*, *Icterohaemo Ag(14)*, *Icterohaemo Ag(15)* *Lousiana(Ag17)*, *Pomona(Ag21)*, *Pyrogenes(Ag22)*, *Sejrooe(Ag26)*, *Patoc(Ag28)*. Por ser las de mayor presentación en el país
- ~~Marcar~~ Identificación de las placas flexibles de 96 pocillos, fondo en U sin tapa no estériles con la numeración de la muestra(en sentido vertical) y de los antígenos correspondientes.(en sentido horizontal)

MAT cualitativo para roedores

- Se rotularon los tubos de ensayo en que se diluirán los antígenos.
- Se marcaron las placas flexibles de 96 pocillos, fondo en U sin tapa no estéril, con la numeración de la muestra y de los antígenos correspondientes.
- Se preparó la dilución de los sueros 975µl de PBS y 25µl de suero para el factor dilución (1:40).

- Se le agrego 50µl de PBS en la primera línea de pozos yendo de izquierda a derecha.
- Se le agrego 50µl de suero en los pocillos correspondientes.
- Se le agrego 50µl de antígeno correspondiente al pozo □ Incubar por 2 horas en una temperatura de 37°C.
- Se tomaron 10µl de las muestras preparadas en los pozos de las placas y montarlas en un porta objeto.
- Se observó en el microscopio de campo oscuro a 20x, si hay aglutinación (reacción antígeno anticuerpo) o no.

MAT Cuantitativo para Roedores

- Se rotularon los tubos de ensayo en que se diluirán los antígenos.
- Se rotularon las placas con el número de muestra a un lado y al otro lado el número de antígeno al cual reacciono en el cualitativo.
- Se agregó 50µl de PBS en todos los pocillos.
- Se agregó 100µl de muestra en el segundo pocillo yendo de izquierda a derecha (1:40).
- Se realizó las diluciones a partir del segundo pocillo, mezclando con las puntas de pipeta, extraer 50µl de muestra, obteniendo: tercer pocillo: 1:80, cuarto pocillo: 1:160, quinto pocillo: 1:320 y luego descartar 50µl de muestra excedente.
- Se agregó 50µl de antígeno correspondientes en los pocillos incluyendo el control (K).
- Se incubaron por dos horas a 37°C, protegidas de la luz directa (se cubren las placas con papel aluminio y se incuban).
- Se tomaron 10µl de las muestras preparadas en los pozos de las placas y montarlas en un porta objeto.

- Se observó en el microscopio de campo oscuro a 20x, si hay 50% de aglutinación (reacción antígeno anticuerpo) o no.

8.19 Aislamiento de *Leptospira* a partir de orina en medio EMJH

Las muestras de riñón fueron inoculadas en medio EMJH+5Fu e incubadas a 2730 °C, haciendo revisiones semanales en microscopio de campo oscuro, en casos de crecimiento se realizaban pases en nuevos tubos con medio EMJH. Este procedimiento se llevó a cabo en un periodo de 3 meses, considerándose una muestra positiva cuando hubo crecimiento al menos en el cultivo original y en un pase, ya sea a partir de riñón, orina o de ambos.

8.20 Método de H&E

Los animales fueron eutanasiados mediante la administración de cloroformo, y desangrados posteriormente, luego se diseccionaron por el personal veterinario del Baylor Collage of Medicine de Houston y del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), de la escuela de Medicina Veterinaria UNAN-León donde se procedió a la extracción de los riñones fijándolos una mitad en formol tamponado al 10% y la otra mitad en congelación a -80°C.

Las muestras de riñón después de ser fijadas se tallaron en secciones de 2 a 3 cm, luego se colocaron en casetes y se sumergieron en formol al 10% tamponado hasta su procesamiento.

Procesado de las muestras: todas las muestras de riñón se incluyeron en parafina y fueron cortadas con el micrótopo a 5 µm de grosor y teñidas con hematoxilina – eosina (anexo 1)

IX. RESULTADOS

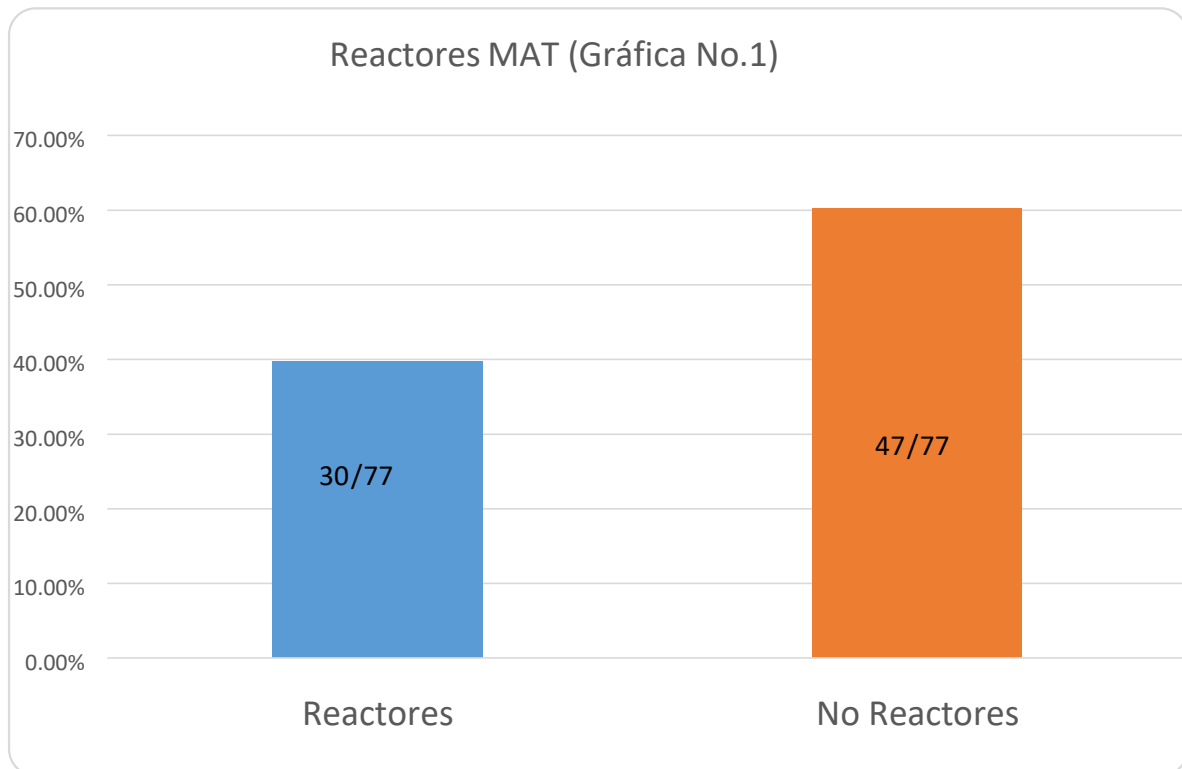
Los roedores en estudio fueron clasificados en *Sigmodon hispidus* (rata cañera) 35.42% (46/77) y *Rattus rattus* (rata negra) 5.19% (4/77) de los cuales 27 no fueron identificados; Esta clasificación se realizó basándose en las características morfológicas. En cuanto a la distribución por edad y sexo: el 33.88%(44/77) eran adultos, el 48.05% (37/77) hembras y el 51.94 % (40/77) machos.

La Evaluación de la captura de roedores total fue de 9.94%, realizados en 2 muestreos de 3 días en periodos distintos siendo el día 2do periodo correspondiente al mes de julio 2016 con un mayor índice de captura (53.24%) 41/77, esto pudo deberse a que la fruta de caña está en condiciones óptimas para la alimentación de los roedores y que es en los periodos de veranos donde sufren raleo de roedores por la misma quema y corte que se realiza en el campo de los cañaverales (Ver tabla N°1)

Día	N° de trampas	N° de captura	Evaluación de la de captura de roedores %
1	158	20	12.65
2	160	12	7.5
3	160	4	2.5
4	160	25	15.62
5	160	11	6.87
6	160	5	3.12
Total	958	77	8.03

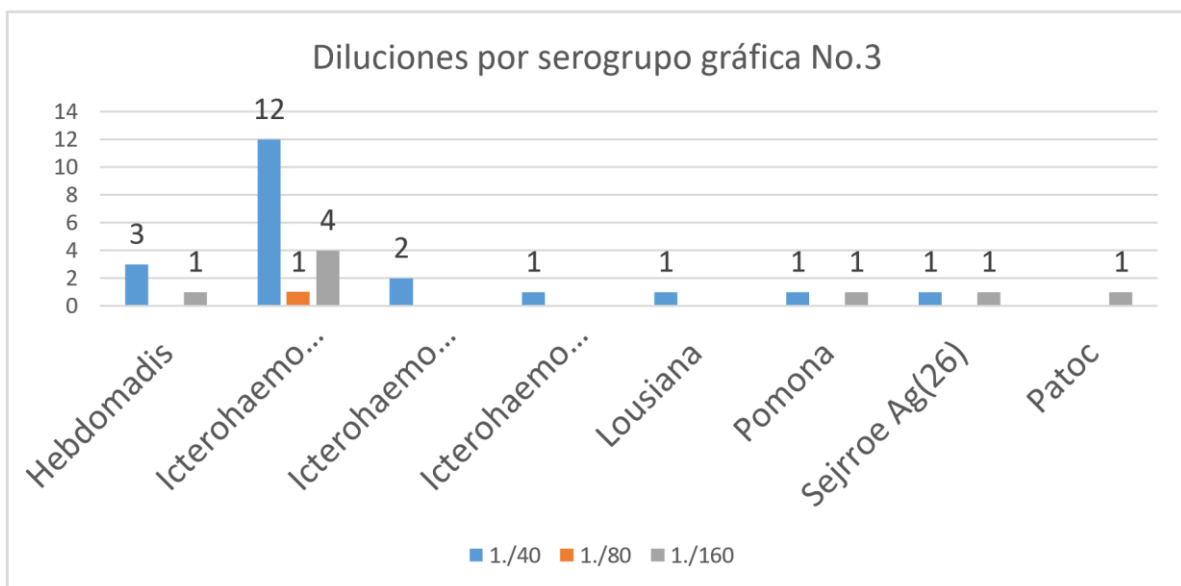
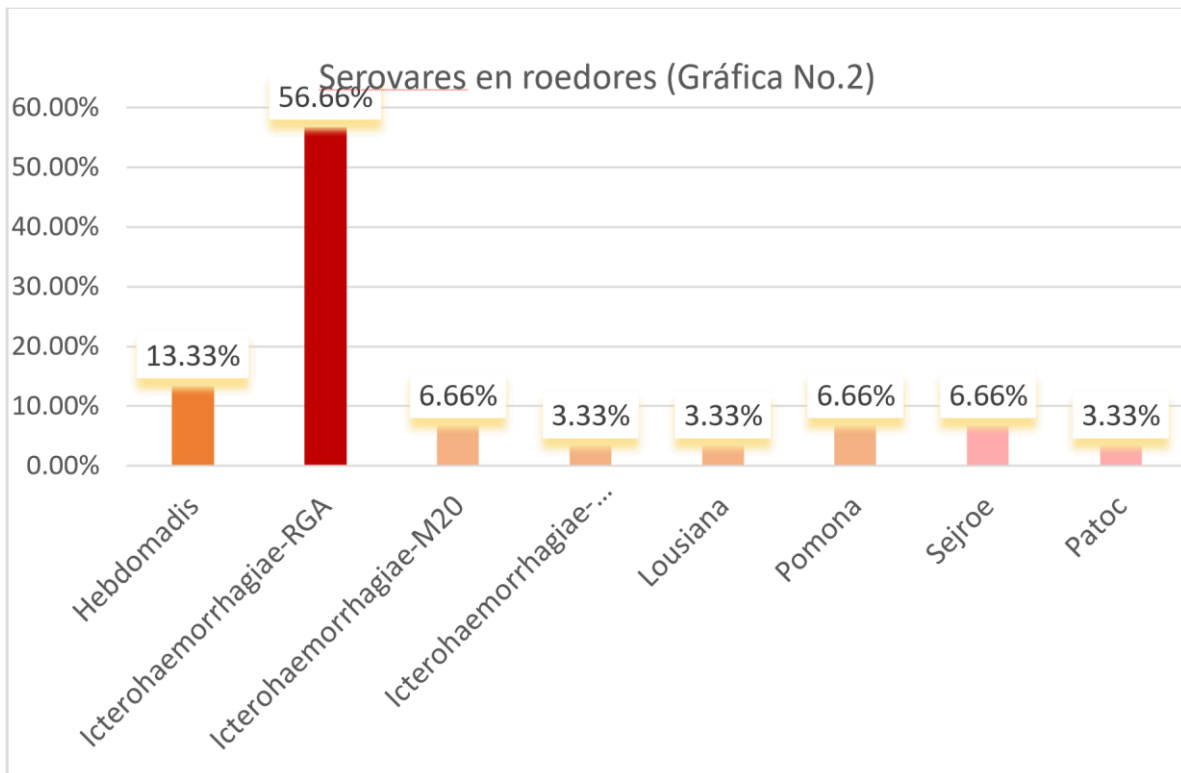
Resultados MAT:

El análisis serológico mediante el MAT, se utilizó para determinar las serovariedades circulantes de *Leptospira* spp en 77 muestras de suero de roedor. El 39.77 % (30/77) fueron reactivos para al menos una de las serovariedades probadas, el 26.66 % (8/30) presentaron coaglutinaciones frente a dos o más serogrupos. (Ver grafica No. 1)



De los roedores en estudio se encontró una seropositividad del 39.7% (30/77), significativamente menor que Álvarez, López (2015), quienes describen una seropositividad de 59,4% en muestras de roedores capturados en los cañaverales de la región noroccidental de Nicaragua, este contraste puede deberse al comportamiento estacional de cada uno de los periodos en estudio realizado. García, 2011 señala un 69.77% de roedores reactivos a MAT, estos altos porcentajes pueden deberse a que fueron muestras obtenidas en áreas cercana a casos confirmados de Leptospirosis humana.

Los roedores tuvieron títulos de anticuerpos anti-leptospira para ocho cepas con los porcentajes siguientes: el 13.33% (4/30) de la cepa Hebdomadis, 56.66% (17/30) (Icterohaemorrhagiae-RGA), 6.66% (2/30) (Icterohaemorrhagiae-M20), 3.33 % (1/30) (Icterohaemorrhagiae- Wijnberg), 3.33% (1/30) (Lousiana), 6.66% (2/30) (Pomona), 6.66% (2/30) (Sejroee) y 3.33% (1/30) (Patoc) (grafica), con una dilución minima de 1:40 (gráfica No. 2).



Resultados Aislamientos

Los aislamientos de *leptospira spp* fue de 9.8% (3/30) de los cultivos a partir de riñón.

Resultados de lesiones renales

No se observaron cambios histopatológicos evidentes con el microscopio óptico, a excepción del roedor NI-220, en el que se observó congestión de los vasos sanguíneos de la zona cortical.

X. DISCUSIÓN

Numerosos animales domésticos y silvestres son portadores y excretores de *Leptospira* spp. Las prevalencias de Leptospiras reportadas en diferentes regiones del país varían en dependencia de la zona y la época del año, aunque son muy pocos los estudios que se han llevado a cabo en animales silvestres y se desconoce la importancia epidemiológica de los mismos en la aparición de brotes de la enfermedad en el ser humano (46).

Los cultivos de caña de azúcar (*Sacharu officinarum*) son particularmente sensibles al ataque de los roedores y por ende la posible contaminación a sus trabajadores que no practican técnicas de higiene. Por el tipo de explotación utilizado (monocultivo), el largo período de tiempo que transcurre entre cosechas consecutivas (1 ó 2 años) y la existencia, de zonas cercanas no cultivadas, facilitan el desplazamiento y aumento de las poblaciones salvajes de roedores. Constituyendo zonas de riesgos para la salud pública.

Los roedores en estudio fueron clasificados en *Sigmodon hispidus* 59.74% (46/77), y *Rattus rattus* 5.19% (4/77) de los cuales 27 no fueron identificados y Méndez (2013) constató la presencia de *Peromyscus leucopus*, *Liomys irroratus*, *Sigmodon hispidus* en una pesquisa serológica realizada a roedores silvestres, datos similares reporta Álvarez-López (2015) con una totalidad de roedores de la especie *S. hispidus* en un estudio de prevalencia de *Leptospira spp*, Ruiz (2011) describe el 70% de roedores *Mus musculus* muestreados en casas de habitación de León, Matagalpa y Chinandega, la diferencia de ambientes muestreados explican las distintas especies de roedores encontradas en dichos estudios.

De los roedores en estudio se encontró una seropositividad del 39.77% (30/77), significativamente menor que Álvarez, López (2015), quienes describen una seropositividad de 59,4% en muestras de roedores capturados en los cañaverales de la región noroccidental de Nicaragua, este contraste puede deberse al comportamiento estacional de cada uno de los periodos en estudio. García, 2011

señala un 69.77% de roedores reactivos a MAT, estos altos porcentajes pueden deberse a que fueron muestras obtenidas en áreas cercanas a casos confirmados de Leptospirosis humana.

Los serovares predominantes encontrados en roedores silvestres por Méndez *et al* 2013 con un 37% y señala que estas especies comparten con los equinos las serovariedades Tarassovi Perepelitsin, Grippotyphosa Moska V y Canicola Hond Utrecht IV, lo que hace considerar que los roedores participan en la transmisión interespecie, en el presente estudio las cepas predominantes fueron Ict RGA con un 56.66% seguida de Ict Hebdomadis con un 13.33%. Otros estudios como el realizado por Cardoza y González (2011) reportaron que el serovar con mayor frecuencia fue Icterohaemorrhagiae con un 30%. García 2011 reporta que el serovar predominante es Louisiana con un 69.77%. Es posible que estas variaciones dependan de los serovares circulantes en cada región.

El aislamiento obtenido de las muestras de riñones fue del 9.8% otros estudios realizados en zonas urbanas de León han encontrado altos porcentajes de roedores positivos a aislamiento, como los realizados por Cardoza y González, 2011; y García, 2011, quienes encontraron un 55% y 71.74% de roedores positivos al aislamiento, respectivamente. Estos altos porcentajes pueden deberse a que los muestreos de roedores se realizaron en las casas cercanas a casos de leptospirosis humana.

En el diagnóstico histopatológico por microscopio óptico no se detectaron alteraciones morfológicas en los riñones de roedores naturalmente infectados con *Leptospira* spp capturados en cañaverales de la región occidental del país. En los casos persistentes de colonización bacteriana como en los animales del reservorio, *Leptospira* spp causan infección sistémica, pero posteriormente se eliminan de todos los órganos excepto los túbulos renales. El túbulo renal es un sitio inmunoprivilegiado, una característica que puede contribuir a la persistencia del patógeno (54).

A diferencia de Agudelo flores 2013 que observó infiltrado inflamatorio con el uso de hematoxilina-eosina, En cambio Torres en 2016 nos indicó que es una lesión primaria durante la lesión renal aguda en la leptospirosis y puede ser causada por daño directo al tejido del huésped por *Leptospira* o la presencia de antígeno *Leptospira*, iniciando una respuesta inmune renal o fallo renal. (55).

XI. CONCLUSIONES

Los roedores capturados en los campos muestreados pertenecen a la especie *Sigmodon hispidus*, y *rattus rattus* los que presentaron moderados niveles de anticuerpos a *Leptospira* spp según la técnica MAT.

Se confirmó que la especie *Sigmodon hispidus* y *rattus rattus* son vectores capaces de actuar como reservorio de mantenimiento para diferentes serogrupos.

Los altos porcentajes de seropositividad al serogrupo Icterohaemorrhagiae muestra la importancia de los roedores en el mantenimiento de este. El serogrupo al que reaccionaron con mayor frecuencia fue Icterohaemorrhagiae-RGA

Los aislamientos de riñones muestran la importancia de los roedores como reservorios, porque pueden mantener la infección intraespecie en forma natural y transmitirla a los animales domésticos e incluso al hombre.

No se encontró lesiones histopatológicas evidentes a *Leptospira* spp en los riñones. esto no nos indica su ausencia, sino una posible infección crónica donde revelan mediante la técnica de MAT a los roedores como portadores y excretores que ya han pasado el estado de leptospiremia.

XII. RECOMENDACIONES

Notificar a las autoridades responsables en salud pública la potencialidad de transmisión de *leptospira ssp.* de los roedores de cañaverales.

Establecer programas de control y monitoreo de roedores por parte de las autoridades involucradas y los propietarios de cañaverales para evitar que estos lleguen a los hogares.

Educar a la población respecto a la enfermedad, su forma de transmisión y el papel que juegan en ella los animales infectados, así como las actividades de riesgo. En el caso de los agricultores y trabajadores de rurales es necesario enfatizar sobre las formas de contagio en el campo y el riesgo que este proporciona.

Realizar el control de roedores en las viviendas especialmente en las zonas rurales o viviendas cercanas a los cañaverales, esto debe llevarse enmarcado dentro de las acciones permanentes de control de la población de vectores.

Inspección rutinaria de los lugares que puedan servir de foco infeccioso, en tal caso realizar muestreos constantes de estos lugares.

Identificar aguas y suelos contaminados y de ser posible drenarlos.

Realizar la clasificación genotípica de los aislamientos

En futuros estudios realizar la tinción de Warthin-Starry para identificar las *Leptospiras* en los túbulos renales.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Ismael barría. hallazgos histopatológicos renales y su relación con leptospirosis en roedores silvestres de la provincia de valdivia, chile. [valdivia chile]: universidad austral de chile; 2013.
- 2- Hartman, E.G. Epidemiological aspects of canine in the Netherlands.p.350359. 1984.
- 3- OMS. 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.
- 4- Ministerio de la salud Nicaragua, situación epidemiológica de la leptostirosis en nicaragua, boletín epidemiológico del 28 de septiembre al 4 de octubre p1 2003 <http://www.minsa.gob.ni>
- 5- Thomson h v. ecology of diseases in wil mammals and birds vet rec 1961. 73 1334-1337
- 6- Waitkins s.a. leptospirosis as an occupational disease br. J. ind med 1986 43:721-725
- 7- Giraldo De León G, Orrego Uribe A, Betancurth AM. Los roedores como reservorios de Leptospiras en planteles porcinos de la zona central cafetera de Colombia. Arch Med Vet. 2002;34(1):69–78.
- 8- BiodiversidadNicaragua.pdf [Internet]. [cited 2016 Jul 20]. Available from: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/BiodiversidadNicaragua.pdf>.
- 9- Adler B. Leptospira and Leptospirosis. Springer; 2014. 295 p
- 10-Faine, S. Leptospira y . Library of Congreso Cataloging. USA. 1994.
- 11-Céspedes Z M. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005 Oct;22(4):290–307.
- 12-Practitioners RC of G. leptospirosis humana. guia para el diagnostico, vigilancia y control. Pitman; 1974.
- 13-SEIJO, A.; Leptospirosis humana en la República Argentina. Informe sobre

Leptospirosis en la República Argentina. CCLA-AAVLD.
Serie Enfermedades Transmisibles. Pub. Monográfica N° 3. Fund. Mundo
Sano; 2002.

- 14-Agostini, a.; arango, j.f.; cittadino, e.a.; dorta de mazzonelli, g.- leptospirosis humana: caracterización epidemiológica de un área de riesgo. Rev. Inst. de Higiene y Medicina Social, 3(4):14-21; 1999.-
- 15-Laguna torres victor Alberto, modulos técnico de leptospirosis, oficina general de epidemiologia/instituto nacional de salud del peru 56p 2000.
- 16-Farrar Edmund w. especies de leptospira (leptospirosis) IN: enfermedades infecciosas principios y practicas mandell, G. gordon r. Bennett j. cuarta edición pag. 2396-2400 1995.
- 17-Marder g.ruiz R.M ríos machuca l.m. zorzo l. merino Duniversidad nacional de nordeste, facultad de ciencias veterinarias, detección de leptospiras en riñon de roedores de la ciudad de corrientes, estudio preliminar, ciudad de corrientes argentina 2006.
- 18-Sacsquispe c rosa martha glenny a. manuel céspedes z división de bacteriologiacentro nacional de salud publica, instituto nacional de lima- peru estudio premilimar de leptospirosis en roedores y canes en salitral piura 1999.
- 19-García González DB. Detección de leptospira spp. en ratas y ratones de los barrios Sutiaba, El Calvario y Reparto Rubén Darío, alrededor de casos positivos de leptospirosis humana, ciudad de León, Departamento de León, noviembre 2010 a febrero 2011. 2011 [cited 2016 Dec 26]; Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/873>
- 20-Ruiz Leiva AL. Prevalencia de Leptospira spp en roedores capturados en focos de leptospirosis humana en los departamentos de Chinandega, León y Matagalpa en el período de septiembre a noviembre de 2011 [Internet] [Thesis]. 2011 [cited 2016 Jul 21]. Available from:

<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/3306>

21-Cardoza Y, González A. Detección de Detección de *Leptospira* en ratas y ratones de las Comarcas Caraos y Cacaos alrededor de los casos positivos de Leptospirosis en humanos del municipio de Achuapa departamento de León, diciembre 2010 a marzo 2011. (Tesis de licenciatura). Nicaragua:

Universidad Nacional autónoma.

22-Alvarez Y. y Lopez H. Prevalencia de *Leptospira* ssp. en roedores capturados en los cañaverales de la región noroccidental de Nicaragua, noviembre 2014.

23-Pérez López EI, Salgado Saballos KJ. Estandarización de un multiplex PCR para el diagnóstico de *Leptospira* saprófita y patógena en muestras de animales domésticos. 2013 [cited 2016 Jul 21]; Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/3405>.

24-Ochoa JE, Sánchez A, Ruiz I. Epidemiología de la leptospirosis en una zona andina de producción pecuaria. 2000 [cited 2016 Jul 21]; Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/8818>

25-Santos Arias R, Hernández Rodríguez P, Díaz Barrera LE, others. Evaluación del medio EMJH convencional y modificado sobre la cinética de crecimiento y la expresión de genes de patogenicidad en cepas de *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. 2013 [cited 2016 Oct 31]; Available from: <http://intellectum.unisabana.edu.co/handle/10818/8204>.

26-Portela RG. Título: Leptospirosis Humana. [cited 2017 Jan 17]; Available from: <http://files.sld.cu/boletincnscs/files/2010/11/respub2010-dr-garciaportela.pdf>

27-Borbor villegas pf. la leptospirosis en el hospital “verdi cevallos balda” de la ciudad de portoviejo, durante el periodo de julio a diciembre del 2010. 2012.

28-Medina MMN, González GS. Evaluación microbiológica e inmunológica de cepas autóctonas de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum como candidato vacunal contra la leptospirosis [Internet]. Editorial Universitaria; 2012 [cited 2016 Oct 31]. Available from: <http://core.ac.uk/download/pdf/11816475.pdf>

29-Cachay E, Vinetz J. A Global Research Agenda for Leptospirosis. J Postgrad Med. 2005;51(3):174–8.

30-Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):296–326.

31-Sanchez JD. OPS OMS | Leptospirosis (información detallada) [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. [cited 2017 Jan 3]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7377%3A2012-leptospirosis-informacion-detallada&catid=4711%3Aleptospirosis-home&Itemid=39617&lang

32-Chávez Escandón GM. Determinación de anticuerpos contra Leptospira interrogans por prueba de microaglutinación (MAT), en perros no vacunados atendidos en el hospital de veterinaria de la universidad de san carlos. [Internet]. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2014 [cited 2017 Jan 4]. Available from: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/1796/>

33-Alonso-Andicoberry C, García-Peña FJ, Ortega-Mora LM. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión). Invest Agr Prod Sanid Anim. 2001;16:205–225.

34-Zamora J, Riedemann S. Animales silvestres como reservorios de leptospirosis en Chile: Una revisión de los estudios efectuados en el país. Arch Med Vet. 1999;31(2):151–6.

35-Fuentes_Sierra_E_MC_Agroecosistemas_Tropicales_2007.pdf [Internet]. [cited 2017 Jan 4]. Available from: http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/1478/Fuentes_Sierra_E_MC_Agroecosistemas_Tropicales_2007.pdf?sequence=1

36-S FN, L PC. Roedores domésticos I. Caracterización morfológica conductual y sanitaria. Monogr Med Vet [Internet]. 1991 [cited 2017 Jan 4];13(1). Available from:

<http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/6178>

37-modulo1-3.pdf [Internet]. [cited 2017 Jan 4]. Available from:

<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd30/roedores/modulo1-3.pdf>

38-Romero JÁ, Legorreta RAM. *Mus musculus* Linnaeus, 1758. 2005 [cited

2017 Jan 4]; Available from:

<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Musmusculus00.pdf>

39-Chauca A, Fiorella M. Prevalencia de leptospirosis bovina en dos localidades de Puno en época seca y determinación de factores de riesgo. Univ Nac Mayor San Marcos Programa Cybertesis PERÚ [Internet]. 2008

[cited 2016 Oct 31]; Available from:

<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2864>

40-Boza R. Sobre la patogénesis de la leptospirosis. *Rev Costarric Cienc Médicas*. 1999 Jun;20(1-2):115-20.

41-Younes-Ibrahim M, Buffin-Meyer B, Cheval L, Burth P, Castro-Faria MV, Barlet-Bas C, et al. Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*. 1997 Feb;30(2):213-23.

42-Pineda Sirias ID. Prevalencia de leptospira e identificación de serogrupos circulantes en animales domésticos asociados a casos de leptospirosis en humanos en el pacífico y norte de Nicaragua, 2011. 2013 [cited 2017 Jan 4]; Available from:

<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/3408>

43-Ayala. 1 introducción La Leptospirosis, es una enfermedad que afecta a los animales domésticos, fauna silvestre y al hombre. La fuente [Internet]. [cited

2017 Jan 4]. Available from:

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://ri.ues.edu.sv/1523/1/13100373.pdf>

- 44-García Bárcenas AI, Rivas Lara V de los Á. Determinación de leptospira interrogans en animales domésticos de diferentes municipios de Nicaragua en el período comprendido 2009-2010. 2011 [cited 2017 Jan 4]; Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/868>
- 45-Aguirre Rubí JL, Vargas Zamora YA. Evaluación de patogenicidad y virulencia de cepas de leptospira aisladas a partir de orina de animales domésticos en el año 2009 utilizados en biomodelo Hámster Sirio Dorado. 2011 [cited 2017 Jan 4]; Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/870>
- 46-Gomez serrano ldc. leptospirosis bovina. 2014 [cited 2017 Jan 17]; Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7134>.
- 47-Heath, S. Johnson, R. .1994.p. 1518-1523.
- 48-WHO. National Surveillance Report Number 17. WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on . 2009.
- 49-Michna, S. Vet. Rec. 1970.p. 484-496
- 50- Núñez S., F., & Cisterna L., P. (1991). Roedores domésticos I. Caracterización morfológica conductual y sanitaria. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 13(1). Consultado de <https://monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/6178/6034>
- 51-Morales calderón S, canales Rios D. Deteccion de *Leptospira spp* en roedores de barrios primero de mayo y willuam Fonseca de la ciudad de Leon, 2012.
- 52-Ellis, W. The diagnosis of in farm animals. In: The present state of diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers. Brussels (Luxembourg). 1994.

- 53-Bolin, C.A., Thiermann, A.B., Handsaker, A.L. and Foley, I.W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection in pregnantcattle.1989. p. 161165.
- 54-South, P. Stoenner, H. Proc. 78t Ann. Mtg. U.S. Anim. Hlth. Assoc. 1974.p.126.
- 55-Ginebra, G. A. Olga. Microorganismos Espirales. En: Llop H. Alina, ValdésDapena V. M., Zuazo, S.J. Microbiología y Parasitología Médicas Tomo 1. Ed. Ciencia Médica Ciudad de La Habana. 2001. p. 388-415.
- 56-Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(10): 736-747.
- 57-Yang CW. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by tolllike receptors. *Kidney Int* 2007; 72(8): 918-925.

Anexos.

Anexo N° 1

Ficha de Recolección de Datos						
DATOS GENERALES						
Propietario	Lugar de Captura	de	Fecha	Id	Especie	Sexo
DATOS DE LABORATORIO						
Muestra Extraída				Diagnostico Utilizado		
Suero	Riñón	Orina	Aislamiento	MAT		
RESULTADOS OBTENIDOS						
Técnica MAT				Aislamiento		
Cualitativo				Positivo		
Cuantitativo				Negativo		
OBSERVACIONES						

Anexo 2.

Protocolo de procesado de tejido y tinción hematoxilina – eosina

Los casetes con tejido renal se deshidrataron e incluyeron en parafina en el procesador de tejidos TP 1050

REACTIVO	TIEMPO	TEMPERATURA
FORMOL 10%	10 MINUTOS	AMBIENTE
ALCOHOL 70º	2 HORAS	AMBIENTE
ALCOHOL 70º	2 HORA	AMBIENTE
ALCOHOL 96 º	1 HORA	AMBIENTE
ALCOHOL 96 º	1 HORA	AMBIENTE
ALCOHOL 100º	1 HORAS	AMBIENTE
ALCHOHOL 100º	2 HORAS	AMBIENTE
ALCHOHOL 100º	2 HORAS	AMBIENTE
XILENO	1 ½ HORAS	AMBIENTE
XILENO	1 ½ HORAS	AMBIENTE
PARAFINA	1 ½ HORAS	56-60º C
PARAFINA	1 ½ HORAS	56- 60º C
PARAFINA	1 ½ HORAS	56-60º C

Montado de los bloques en la consola de parafina:

- Dejar los bloques en la parafina de la consola durante un minuto de 30 minutos.
- Abrir los casetes y colocar el tejido en un molde que contiene un poco de parafina fundida.
- Dejar solidificar la parafina a temperatura ambiente sobre una placa fría, formándose así un bloque con el tejido en su interior.

Cortar con el micrótopo:

- Desbastar el bloque de parafina mediante cortes de 15 micras.
- Enfriar los bloques durante aproximadamente 2 horas (4 ºc) para facilitar el corte posterior.
- Realizar cortes de 4 micras.
- Depositar las secciones en un baño termostático a 45º c.

- Recoger las secciones con porta objetos tratados con xileno.(starfrost)
- Secar los portaobjetos a 56° c durante 30 minutos o 37° durante toda la noche.

Tinción con hematoxilina-eosina:

Desparafinar y teñir los tejidos mediante la inmersión en los siguientes reactivos:

- Xilol : 10 minutos
- Xilol: 10 minutos
- Alcohol 100°: 5 minutos
- Alcohol 100°: 5 minutos
- Alcohol 96°: 5 minutos
- Alcohol 70°: 5 minutos
- Agua corriente del grifo: 5 minutos
- Hematoxilina: 15 minutos
- Agua corriente del grifo: 5 minutos
- Eosina: 30 segundos
- Agua del grifo: 3 inmersiones de 1-2 segundos

Deshidratar y montar los tejidos mediante la inmersión en los siguientes reactivos:

- Alcohol 70°: 4 inmersiones de 1-2 segundos
- Alcohol 96°: 4 inmersiones de 1-2 segundos
- Alcohol 100° 5 inmersiones de 1-2 segundos
- Xilol: 3 inmersiones de 1-2 segundos - Xilol: inmersión durante un mínimo de 1 minuto - Montar en DPX.