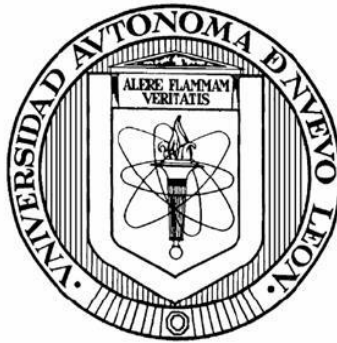


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSGRADO CONJUNTO



SEROEPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE *Leptospira spp*
Y LENTIVIRUS EN HATOS OVINOS Y CAPRINOS
DEL NORESTE DE MÉXICO

P
o
r

JESUS FRANCISCO CHAVEZ SANCHEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

MARZO 2019

SEROEPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE *Leptospira spp*
Y LENTIVIRUS EN HATOS OVINOS Y CAPRINOS
DEL NORESTE DE MÉXICO

Comité de Tesis


Dr. Ramiro Avalos Ramírez
Presidente


Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Secretario


Dr. Juan José Zarate Ramos
Vocal


Dr. Alfredo Wong González
Vocal


Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Vocal

SEROEPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE *Leptospira spp*
Y LENTIVIRUS EN HATOS OVINOS Y CAPRINOS
DEL NORESTE DE MÉXICO

Aprobación de tesis de Maestría en Ciencia Animal por el comité particular de
MVZ Jesús Francisco Chávez Sánchez



Dr. Ramiro Avalos Ramírez
Director



Dr. José Candelario Segura Correa
Director Externo



Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Co-Director



Dr. Juan José Zarate Ramos
Co-Director



Dr. Alfredo Wong González
Co-Director



Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente al Departamento de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio Central Regional del Norte por el apoyo para la realización de las pruebas serológicas así como por la donación de las diferentes serovariedades de *Leptospira*. A la TLC. Leslee Nayelly de la Rosa Contreras por su colaboración al momento de estar procesando las muestras. Al MC. Joel Delgadillo por su tiempo, esfuerzo y ayuda para la capacitación de la prueba de Microaglutinación en Placa para el diagnóstico de *Leptospira*, al Dr Alberto Morales Loredó y MVZ Patricia por su apoyo en el proceso administrativo para la capacitación.

A mi asesor Dr. Ramiro Avalos Ramírez por su orientación y sus consejos que me ayudaron a seguir adelante en la realización de este trabajo. Al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño por sus enseñanzas y guía durante esta etapa de mi vida. Al Dr. José Pablo Villarreal Villarreal por su orientación y ayuda durante mi estancia en Pelotas, Brasil.

A La Dra. Alicia Guadalupe Marroquín Cardona por el gran apoyo recibido para la realización del presente estudio.

A todos los profesores del Posgrado en Conjunto Veterinaria- Agronomía por sus enseñanzas y dedicación a lo largo de estos años.

Al MCA. Alejandro Rodríguez por su colaboración en la toma de las muestras

A mis compañeros, René, Ramón, Omar y Liliana, por los momentos que compartimos a lo largo de este periodo.

Agradezco especialmente al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de maestría y la realización de este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, mi *Alma Mater*, por todo lo que me ha dado; a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por forjarme como MVZ y al Posgrado en Conjunto Agronomía-Veterinaria por darme la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias, mención especial al Dr. Rogelio Ledezma Torres por el apoyo recibido para la capacitación en Brasil.

Parte de este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo de Fortalecimiento a la Investigación (PAFI-FMVZ) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para el proyecto: “Seroepidemiología y factores de riesgo de para la infección por lentivirus ovinos y caprinos del noreste de México”

DEDICATORIA

A mis padres Jesús Francisco Chávez Granados y Clara Guadalupe Sánchez Reyna por alentarme a seguir trabajando duro y a superarme a mí mismo, además de apoyarme durante todas las fases de mi vida.

A mi hermano menor José Gabriel Chávez Sánchez por todo su apoyo y compañía a lo largo de toda mi vida.

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
DDR	Distrito de Desarrollo Rural
μl	Microlitros
ml	Mililitros
M	Molaridad
SCE	Suero de Conejo Estéril
HRP	Peroxidasa de Rábano (Horseradish peroxidase)
ELISA	Ensayo Inmunoserológico Ligado a Enzimas (Enzyme Linked Immunosorbent Asssay)
MAT	Microaglutinación en Placa (Microagglutination Test)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero (Messenger Ribonucleic Acid)
CP	Control Positivo
CN	Control Negativo
SE	Seroneutralización
LTR	Repetición Terminal Larga (Long Terminal Repeat)
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
TLR4	Receptores Tipo Toll 4 (Toll Like Receptor 4)
TLR2	Receptores Tipo Toll 2 (Toll Like Receptor 2)
PAMP's	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Patogen Associated Molecular Patterns)
NF- κB	Factor Nuclear Kappa B (Nuclear Factor Kappa B)

AGID Inmunodifusión en Gel de Agarosa (Agarose Gel Immunodiffusion)
PBS Solución Salina Tamponada de Fosfatos (Phosphate Buffered Saline)

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
ABREVIATURAS.....	vii
INDICE DE CONTENIDO	ix
INDICE DE TABLAS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
1. ABSTRACT	xiv
2. RESUMEN.....	xv
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1 OBJETIVOS GENERALES	3
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.3 HIPÓTESIS	3
3.4 JUSTIFICACIÓN	3
4. LITERATURA REVISADA	4
4.1 <i>Leptospira</i>	4
4.1.1 Características Biológicas y Taxonómicas.....	4
4.1.2 Historia de la Enfermedad	4
4.1.3 Epidemiología.....	6
4.1.4 Factores de riesgo	8
4.1.5 Tratamiento.....	9
4.1.6 Diagnóstico	9
4.1.6.1 Prueba de Microaglutinación en placa.....	9
4.1.6.2 Diagnostico por PCR	10
4.1.6.3 Diagnostico por Cultivo Bacteriano	10
4.1.7 Prevención	11
4.1.8 Factores de virulencia.....	12
4.1.8.1 Proteínas de Membrana Externa.....	12
4.1.8.2 Lipoproteínas.....	12
4.1.8.3 Lipopolisacáridos	13
4.1.8.4 Adhesinas	13
4.1.8.5 Hemolisinas.....	14
4.1.8.6 Porinas.....	14
4.1.9 Interacción de <i>Leptospira</i> con Hospedero.....	15
4.1.10 Patogénesis.....	16
4.1.11 Evasión del sistema de complemento	16
4.1.12 Prevalencia	18
4.2 Lentivirus de los pequeños rumiantes (SRLV)	19
4.2.1 Características genéticas	19
4.2.2 Patogénesis.....	21
4.2.3 Interacción de los Lentivirus con el Hospedero	22
4.2.4 Replicación viral	23
4.2.5 Mecanismos de Evasión Viral.....	25
4.2.5.1 Mutación	25
4.2.5.2 Recombinación	25

4.6 Métodos de Diagnóstico.....	26
4.2.6.1 Inmunodifusión en Gel de Agarosa	27
4.2.6.2 Ensayos Inmunológicos Ligados a Enzimas	27
4.2.6.3 Técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
5. MATERIALES Y METODOS	30
5.1 Materiales.....	30
5.2 Material Biológico	31
5.3 Estuches comerciales.....	31
5.4 Reactivos	32
5.5 Área de Estudio y Tamaño de muestra	33
5.6 Tipo de muestras colectadas.....	34
5.7 <i>Leptospira</i>	35
5.7.1 Elaboración del medio de cultivo	35
5.7.2 Mantenimiento del cultivo de serovariedades de <i>Leptospira</i>	35
5.7.3 Purificación de las serovariedades de <i>Leptospira</i>	35
5.7.4 Criterio del Estudio Serológico.....	36
5.7.5 Procedimiento para la realización de la prueba de MAT	36
5.7.5.1 Preparación de solución Salina Tamponada de Fosfatos (PBS)	36
5.7.5.2 Preparación de dilución inicial	37
5.7.5.3 Trabajo en Microplaca	37
5.7.5.4 Colocación de la batería de <i>Leptospira</i>	37
5.7.6 Técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa	38
5.7.6.1 Extracción de la muestra	38
5.7.6.2 Amplificación.....	38
5.7.7 Técnica de Aislamiento.....	39
5.7.7.1 Preparación del medio de cultivo.....	39
5.7.7.2 Procesamiento de las muestras de orina	39
5.7.8 Caracterización Serológica	39
5.7.9 Separación de muestras contaminadas.....	40
5.8 Lentivirus de Pequeños rumiantes.....	40
5.8.1 Procedimiento para la realización de la técnica de ELISA de competencia	41
5.8.1.1 Trabajo en placa.....	41
5.8.2 Interpretación del resultado	41
5.9 Análisis Estadístico.....	41
6. RESULTADOS.....	43
6.1 Tamaño de muestra	43
6.2 Detección serológica de <i>Leptospira</i> spp.	44
6.3 Comportamiento serológico, bacteriológico y molecular de <i>Leptospira</i> spp. en un hato mixto caprino-ovino seropositivo	52
6.3.1 Serología	52
6.3.2 Análisis Bacteriológico	54
6.3.3 Caracterización serológica	54
6.3.4 Cultivo en medio Fletcher sólido	54
6.3.5 Detección molecular de la infección por <i>Leptospira</i> a partir de orina	55
6.4 ELISA de competencia para Lentivirus	57
7. DISCUSIÓN	62

7.1 Leptospirosis	62
7.2 Lentivirus	68
8. CONCLUSIÓN.....	72
9. REFERENCIAS	73
ANEXO	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Lista de serovariedades utilizadas en la prueba de MAT	36
Tabla 2 Prevalencia total de ovinos y caprinos en Nuevo León México frente a nueve serovariedades de <i>Leptospira</i>	44
Tabla 3 Proporción de seropositivos total obtenida contra distintas serovariedades de <i>Leptospira</i> spp mediante MAT en ovinos (n:399) y caprinos (n:441) del estado de Nuevo León, México	45
Tabla 4 Distribución de la seropositividad contra <i>Leptospira</i> spp en hatos ovinos y caprinos acorde con el Distrito de Desarrollo Rural (DDR) en el estado de Nuevo León, México.....	47
Tabla 5 Proporción de hatos seropositivos hacia distintas serovariedades de <i>Leptospira</i> conforme al sistema de explotación de pequeños rumiantes en el estado de Nuevo León, México.....	48
Tabla 6 Factores de riesgo asociados a la presencia de <i>Leptospira</i> en pequeños rumiantes de Nuevo león, México	49
Tabla 7 Comportamiento serologico de la infección por serovariedades de <i>Leptospira</i> en un hato mixto ovino-caprino durante 3 años en Nuevo León, México	53
Tabla 8 Seropositividad contra Lentivirus en combinados sueros de caprinos y ovinos acorde al tipo de hato por especie en el Noreste de México	58
Tabla 9 Factores de riesgo asociados a la presencia de Lentivirus en pequeños rumiantes de Nuevo León, México	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de evasión del sistema de complemento por <i>Leptospira</i> spp.	17
Figura 2. Estructura y genoma de Lentivirus en pequeños rumiantes	19
Figura 3. Estado de Nuevo León con las zonas de estudio divididos por DDR según el Programa de Producción Pecuaria y Ordenamiento Ganadero y Apícola.....	33
Figura 4. Resuspensión y siembra en medio Fletcher sólido del aislado de <i>Leptospira</i> obtenida de un caprino.....	55
Figura 5. PCR para la amplificación del gen <i>sec Y</i> de <i>Leptospira</i> en muestras de orina de ovinos y caprinos procedentes de un hato con alta seroprevalencia de Nuevo León, México.....	56
Figura 6. PCR para la amplificación del gen <i>LipL 32</i> de <i>Leptospira</i> en muestras de cultivo de orina de ovinos y caprinos procedentes de un hato con alta seroprevalencia en Nuevo León, México.....	56

1. ABSTRACT

This study estimated leptospiral and small ruminant Lentivirus infections and seropositivity at herd-level, region and animal species. The risk factors associated to small ruminants in Nuevo León México were also estimated. 840 serum samples from 67 goat herds (n=441) and 52 sheep herds (n=399) from different economical regions obtained between July 2015 and August of 2016 were used. In addition, 90 serum samples were obtained from a high leptospiral seroprevalence herd from March 2018 to November 2018. For comparative purposes, 23 caprine serum samples from La Laguna, Coahuila region were analysed. The samples were considered positive when they demonstrated 50% of agglutination at a 1:100 dilution and on to one or more serovars. 25 urine samples obtained from a high leptospiral seroprevalence herd were cultured and analyzed by PCR (*Lip L32* gene). MAT test was performed for detection of antileptospiral antibodies. The samples were considered positive when they demonstrated $\geq 50\%$ of agglutination at a 1:100 dilution and on to one or more serovars. For small ruminant Lentivirus diagnosis, a cELISA test kit was used. The study revealed that 14.7% of goats and 12.5% of sheep were positives to one or more leptospiral serovars. In both species, dilutions varied between 1:100 to 1:400 reacting to the following serovars: Hardjo 7.8% (66/840), Icteroahemorrhagiae 1.9% (16/840), Bratislava 1.7% (14/840), and Pomona 1.2% (10/840). In small ruminant Lentivirus 24% of goats and 14.28% of sheep were positives, from which Galeana district showed the highest prevalence with 43.3% followed by Apodaca district with 38.8%. Risk factors were established by chi square test obtaining a strong association between prevalence and variables determined by a survey. In *Leptospira* the risk factors ($P < 0.05$) were presence of wild pigs OR: 10.13; IC 95% 6.56-15.66, presence of domestic bovines OR: 6.96; IC95% 4.43-10.93, pregnancy rate $< 50\%$ OR: 5.20; IC95% 1.61-16.72, introduction of goats/sheep OR: 4.06; IC95% 2.61-6.33, milk production system OR: 3.04; IC95% 2.00-4.16, Apodaca region OR: 2.74; IC95% 1.83-4.12, 61-100 animal herd size OR: 2.08; IC95% 1.38-3.14, presence of abortion OR: 1.89; IC95% 1.27-2.82.

Risk factor for lentivirus were abortion OR: 38.00; IC95% 7.11-203.00, pregnancy rate $< 50\%$ OR: 34.13; IC95% 7.22-161.1, low birthweight OR: 32.93; IC95% 7.29-148.63, absence of veterinary assistance 27.44; IC95% 5.31-141.86, absence of quarantine system OR: 24.0; IC95% 5.48-105.05, goat species OR: 6.35; IC95% 1.58-25.15.

The result so this study, show evidences of the presence and circulation of different leptospiral serovars, and small ruminant lenvirus in Nuevo Leon state, influenced by some risk factors detected significant in this study. Due to the biological characteristics of both infections agents here studied; it is probable that reproductive traits of the herds are being negative affected.

Keywords: *Leptospira*, Small Ruminant Lentivirus, Microagglutination Test, Risk Factors, Nuevo León, Mexico

2 RESUMEN

El presente trabajo se estimó la frecuencia de seropositividad a nivel de hato, especie animal, región así como los factores de riesgo asociados a las infecciones producidas por *Leptospira* spp. y Lentivirus en ovinos y caprinos en Nuevo León, México. Se analizaron un total de 840 sueros de 67 hatos caprinos (n: 441) y 52 hatos ovinos (n: 399), obtenidas en Julio/2015 hasta Agosto/2016, y se calcularon los factores de riesgo a nivel de hato mediante encuestas aplicadas a los productores. En paralelo y durante 3 años, se analizó el comportamiento de la infección por *Leptospira* spp en un hato mixto mediante serología, bacteriología y detección molecular. Se empleó la MAT para detectar anticuerpos anti-*Leptospira* spp., considerándose positivos los sueros que mostraron aglutinación $\geq 50\%$ a partir de una dilución de 1:100 hacia ≥ 1 serovariedad analizada. La reacción serológica contra Lentivirus fue llevada a cabo con la ayuda de un estuche comercial de ELISA a partir de mezclas de sueros al azar provenientes de un mismo hato. Se encontró que la seroprevalencia general a nivel de hato fue de 21.0% (25/119), no detectando diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la frecuencia serológica a nivel de especie (hato caprino 23.8% (16/67) vs hato ovino) 17.3% (9/52). Se detectó que 14.7% y 12.5% de caprinos y ovinos, respectivamente; tienen anticuerpos aglutinantes hacia una o más serovariedades de *Leptospira*. En ambos grupos, los títulos de aglutinación variaron desde 1:100 hasta 1:400, detectando reacciones principalmente contra las serovariedades: Hardjo 7.8 % (66/840), Icterohaemorrhagiae 1.9 % (16/840), Bratislava 1.7 % (14/840) y Pomona 1.2% (10/840). Para Lentivirus a nivel de hato el 24.0% y 14.3% de los hatos caprinos y ovinos, respectivamente; resultaron seropositivos. El DDR de Galeana mostró el mayor índice de seropositivos (43.3%) seguido de Apodaca (38.8%). Para ambos agentes infecciosos se encontró una fuerte asociación ($P < 0.0001$ - $P < 0.01$) mediante Chi-cuadrada calculada entre la seropositividad y las variables analizadas. Los análisis de razón de momios arrojaron que para *Leptospira* los factores de riesgo asociados ($P < 0.05$) fueron presencia de jabalí/cerdo salvaje OR: 10.1; IC95% 6.6-15.7, presencia de bovinos en el hato OR: 7.0; IC95% 4.4-10.9, índice de preñez $< 50\%$ OR: 5.2; IC95% 1.6-16.7, introducción de nuevos animales OR: 4.1; IC95% 2.6-6.3, sistema de producción lechera OR: 3.0; IC95% 2.0-4.2, región de Apodaca OR: 2.7; IC95% 1.8-4.1, tamaño del hato de 61-100 animales OR: 2.1; IC95% 1.4-3.1, antecedentes de aborto OR: 2.0; IC95% 1.3-2.8. Mientras que para Lentivirus los factores de riesgo asociados ($P < 0.05$) fueron: antecedentes de aborto en el hato OR: 38.0; IC95% 7.1-203.0, índice de preñez $< 50\%$ OR: 34.1; IC95% 7.2-161.1, bajo peso al nacer OR: 32.9; IC95% 7.3-148.6, no asistencia veterinaria OR: 27.4; IC95% 5.3-141.9, ausencia de cuarentena OR: 24.0; IC95% 5.5-105.1, por especie caprino OR: 6.4; IC95% 1.6-25.2.

Los resultados de este estudio muestran evidencia de la circulación de *Leptospira* spp y Lentivirus en hatos ovinos y caprinos del estado de Nuevo León influenciado por algunos de los factores de riesgo aquí estudiados. Dadas las características biológicas de ambos agentes infecciosos es muy probable que estén afectando negativamente las características reproductivas de los hatos aquí estudiados.

Palabras clave: *Leptospira*, Lentivirus, pequeños rumiantes, Prueba de Microaglutinación en placa, Factores de Riesgo, Nuevo León, México

3 INTRODUCCIÓN

En el noreste de México las poblaciones de ovinos y caprinos, además de otros rumiantes, como los bovinos, suelen interactuar y convivir con otros animales domésticos y silvestres. Esta convivencia suele aumentar el riesgo de propagación de infecciones bacterianas, virales y parasitarias. Se ha estimado que un 65 % de los patógenos de los animales domésticos son microorganismos infecciosos con la capacidad para infectar a otras especies, incluido el ser humano.

Los patógenos que afectan la reproducción en pequeños rumiantes son de gran interés del médico veterinario, debido a que estos organismos pueden causar abortos, infertilidad y muerte. Los ovinos y caprinos pueden albergar patógenos multiespecie que afectan no únicamente a estas especies, sino que además pueden infectar otros animales incluidos domésticos y silvestres (Ganter, 2015). Por eso es imprescindible la detección, monitoreo y la asociación que tienen estos microorganismos con factores específicos en el medio ambiente, para poder establecer programas de control y erradicación de estos patógenos.

Leptospirosis es la zoonosis bacteriana con mayor distribución a nivel mundial, con un promedio de 1.03 millones de casos y 58,900 de muertes anuales (Costa et al., 2015). La mayor concentración de casos se ubica en las regiones con climas tropicales, donde las epidemias surgen a causa de las inundaciones por lluvias torrenciales (Guernier et al., 2018). El impacto a la salud causada por leptospirosis en el ser humano se atribuye principalmente a infecciones con curso agudo, vistas en la Enfermedad de Weil, además de otras complicaciones como hemorragia pulmonar y falla renal. Mientras que en los animales de producción existen pérdidas económicas importantes debido a abortos, mortinatos, esterilidad, pérdida de peso, baja producción de leche e inclusive la muerte de los animales.

Lentivirus de los pequeños rumiantes son una de las principales causas de pérdidas económicas de pequeños productores alrededor del mundo, debido a que causa enfermedades multi-sistémicas de carácter crónico. Los animales infectados por Lentivirus de pequeños rumiantes suelen presentar baja fertilidad y número de animales por parto, así como bajo peso al nacer y peso al destete. También se ha visto baja en la

producción de leche y bajo peso al sacrificio con rechazo de la canal para consumo afectando fuertemente a los productores de leche y carne.

Por lo anteriormente mencionado debe ser de alta prioridad para los médicos veterinarios y asociaciones afiliadas combatir estas enfermedades. Sin embargo, en México aún no se le ha otorgado la importancia necesaria, principalmente por falta de información. No se han realizado estudios suficientes para reconocer la repercusión que tiene en la economía de los productores, más aún en los pequeños productores. En otros países donde la enfermedad es endémica ya han tomado la iniciativa y han incluido estas enfermedades como parte de las campañas de sanidad animal. En países de América del Sur, existen departamentos enfocados exclusivamente en la investigación de estas enfermedades; sin embargo, en México aún nos falta mucho para conocer la situación en la que estos agentes patógenos se encuentran, por lo que aún no existe mucha información acerca de estas enfermedades en pequeños rumiantes en México. Es por eso que el presente estudio pretende determinar la presencia de anticuerpos, así como los factores de riesgo que pudieran propiciar la infección frente a *Leptospira* spp. y Lentivirus en ovinos y caprinos del Noreste de México comprendiendo principalmente el estado de Nuevo León.

3.1 OBJETIVOS GENERALES

Estimar la seroprevalencia y determinar el efecto de algunos factores de riesgo asociados a *Leptospira* spp. y Lentivirus en ovinos y caprinos del estado de Nuevo León, mediante pruebas serológicas y epidemiológicas. Así como, lograr el aislamiento y tipificación molecular de *Leptospira* spp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la seroprevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp. mediante la prueba de Microaglutinación (MAT).
- Aislar *Leptospira* spp. a partir de orina utilizando medios de cultivo selectivos.
- Caracterizar las especies de *Leptospira* spp. a partir de los aislamientos mediante la prueba de Microaglutinación en placa.
- Estimar la presencia de anticuerpos contra el virus de la Neumonía Progresiva en ovinos y Artritis-Encefalitis Caprinos por técnica de ELISA de competencia comercial.
- Determinar los principales factores de riesgo que propician la presencia de leptospirosis e infecciones por el Virus de la Neumonía Progresiva en ovinos y por el Virus de la Artritis-Encefalitis Caprinos.

3.3 HIPÓTESIS

Dadas las condiciones ecológicas del Noreste de México, ciclo biológico y de las características epidemiológicas de los agentes infecciosos considerados en el presente estudio, tanto caprinos como ovinos poseen anticuerpos contra *Leptospira* spp. y Lentivirus. Así mismo, los índices de seroprevalencia y factores de riesgo de cada patógeno están asociados a las condiciones de cada DDR.

3.4 JUSTIFICACIÓN

Es necesario saber cuál es la situación epidemiológica y que factores de riesgo ocurren que favorecen las infecciones por *Leptospira* spp. y Lentivirus en las poblaciones de ovinos y caprinos de Nuevo León, con el propósito de tomar decisiones para reducir los efectos negativos ocasionados por estos agentes infecciosos.

4 LITERATURA REVISADA

4.1 *Leptospira*

4.1.1 Características Biológicas y Taxonómicas

Las bacterias del genero *Leptospira* pertenecen a la familia *Espiroquetacea*, las cuales junto a *Borrelia*, *Brachyspira* y *Treponema* tienen la peculiaridad de poseer una morfología alargada en espiral. El término *Leptospira* proviene del griego *Lepto* que significa “delgado, fino” y del latín *Spira* que significa “espiral”, siendo su significado organismo delgado con forma de espiral, debido a su morfología. Por cuestiones epidemiológicas, las leptospiras se han clasificado en patógenas, intermedias y no patógenas o saprofitas. Entre las patógenas se encuentran: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. weilli*, *L. alexandrii*; mientras que dentro de las intermedias se encuentran: *L. wolffi*, *L. inadai*, *L. fainei* y las saprofitas están conformadas por subespecies de *L. biflexa*, *L. woolbachii*, *L. meyeri* y *L. yanagawae*.

Las leptopiras son bacterias aerobias obligadas con alta motilidad que poseen características tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas. Estas bacterias poseen una bicapa lipídica similar a la de bacterias Gram negativas. Las leptospiras miden 0.25 x 6 - 25µm y tienen la capacidad de penetrar incluso un poro de 0.25µm.

Leptospira posee un endoflagelo que reside en el periplasma y le brinda la motilidad característica.

4.1.2 Historia de la Enfermedad

La historia moderna de la leptospirosis se remonta a 1886 cuando Adolph Weil describe por primera vez un caso diferente de ictericia acompañado de esplenomegalia, disfunción renal, conjuntivitis y erupción cutánea. Después a este padecimiento se le nombró enfermedad o síndrome de Weil. Para ese entonces la etiología de la enfermedad era desconocida, pero se pensaba de era de carácter infeccioso y se asociaba principalmente a empleos donde la gente entraba en contacto con cuerpos de agua, como en alcantarillas, arrozales y minas de carbón. Sin embargo, se tienen registros que posiblemente este padecimiento haya surgido hace miles de años. Por ejemplo, antiguos

escritos Chinos, describen una ictericia de los campos de arroz, mientras que en Japón se describieron cuadros clínicos que tienen gran similitud con leptospirosis y fueron llamados “fiebre otoñal” o “fiebre de los siete días” (Kitamura & Hara 1918). En Europa y Australia, este padecimiento fue asociado a empleos ordinarios ejemplo, fiebre del hato suino, enfermedad de los cortadores de caña y “Schlammfieber” o fiebre del lodo. (Alstom & Broom, 1958).

A principios del siglo XX Stimson logró demostrar la existencia de la bacteria *Leptospira*. Stimson utilizó la tinción de plata descrita por Levaditi (1907), para observar espiroquetas en tejido de riñón de un paciente que se tenía sospecha había muerto por fiebre amarilla. Probablemente, este paciente era convaleciente de la enfermedad de Weil cuando falleció por fiebre amarilla. Las bacterias fueron observadas en tejido de riñón pero no en bazo, hígado, conjuntiva ni corazón. Stimson (1907) llamó a este microorganismo “*Spirocheta interrogans*”. Esto debido a su morfología en forma de signo de interrogación que hoy se sabe es debido a sus flagelos periplásmicos que le conceden esa terminación en gancho.

En Japón, donde era común contraer la enfermedad en minas de carbón, Inada y colaboradores (1916) inyectaron conejillos de indias (*Cavia porcellus*) intraperitonealmente con sangre de pacientes con síndrome de Weil y lograron replicar los signos de leptospirosis aguda en animales. Los conejillos de indias presentaron ictericia, hemorragias, conjuntivitis, anemia y albuniuria. Este trabajo inspiró a investigaciones futuras en donde se logró describir la ruta de infección, métodos de transmisión, cambios patológicos, distribución en los tejidos, excreción urinaria, filtrabilidad de las bacterias, morfología y motilidad. Las espiroquetas fueron observadas en varios tejidos, siendo riñón e hígado las que poseían un número mayor de bacterias. Este trabajo también resaltó la resistencia a la enfermedad por parte de conejos, ratas y ratones. Después de unos meses, Inada y colaboradores (1916) lograron cultivar las bacterias en un medio de tejido renal de cobayo emulsificado el cual tuvo un crecimiento óptimo a 25°C y una pérdida de viabilidad cuando fue incubado a 37°C. A este organismo se le denominó *Spirocheta icterohaemorrhagiae*. Finalmente, Inada y colaboradores (1917) demostraron ampliamente una especie de lisis inmunológica de

leptospiras en cobayos que habían sido inoculados con suero de pacientes convalecientes de la enfermedad de Weil. También descubrieron que para que pudiera haber efecto, el suero debía inocularse antes de presentarse los signos de ictericia. En Europa, en plena Primera Guerra Mundial, las trincheras eran un foco de infección muy grande para la transmisión de la enfermedad de Weil. Es por eso que dos grupos alemanes (Huebner, 1915; Uhlenhut & Fromme, 1915), de manera independiente y casi simultáneamente, lograron transmitir la enfermedad en cobayos y lograron demostrar la presencia de *Leptospira* en los tejidos de estos animales. Estos grupos los llamaron *Spirocheta nodosa* y *Spirocheta icterogenes*, respectivamente. En la actualidad, existe controversia entre el primer grupo en descubrir la primera *Leptospira*, sin embargo, el Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* reconoce el trabajo de Inada y colaboradores (1916) como los primeros, tomando como referencia a la cepa “Ictero No. 1”, aislada por Inada, como la cepa de referencia de la serovariedad Icterohaemorrhagiae.

Las décadas posteriores dieron un incremento en la información obtenida acerca de la enfermedad de leptospirosis. Una de las principales contribuciones al ámbito de la investigación la realizaron Van Thiel, (1948) y Alston & Broom, (1958) que reconocieron a la leptospirosis como una enfermedad infecciosa que afecta a la mayoría de los mamíferos, especialmente, a un gran número de roedores y a la importancia de los animales domésticos como portadores y fuentes de infección para el ser humano.

4.1.3 Epidemiología

La leptospirosis es una enfermedad de localización global, exceptuando las regiones polares. Establecer la epidemiología de leptospirosis en los animales domésticos es muy complicado debido a que los animales pueden ser infectados por cada una de las serovariedades patogénicas. Afortunadamente, menos del 4% de las serovariedades patógenas son endémicas en todas las regiones susceptibles. Además, se ha visto que leptospirosis es una enfermedad que posee una nidalidad natural, y que cada serovariedad tiende a ser mantenida por una especie hospedadora en concreto. Es por esto que una especie animal dentro de una región puede ser infectada por una

serovariedad que es mantenida por otro animal de su misma especie u otras serovariedades presentes de cualquier otra especie infectada.

Esta enfermedad afecta a todos los mamíferos e inclusive se han presentado en reptiles, anfibios, aves, peces. Además se ha logrado aislar la bacteria de insectos como la cucaracha (*Periplaneta spp.*) (Astudillo *et al.*, 2016). Sin embargo, aún no existe información suficiente que nos indique la situación de esta enfermedad en los pequeños rumiantes, por lo que los conocimientos de la misma ha sido una analogía sobre la situación actual de la enfermedad en los bovinos, pero aún no se sabe si esta información es correcta.

Estudios serológicos han demostrado que la leptospirosis es una enfermedad muy común en los pequeños rumiantes en diferentes países alrededor del mundo. Aunque por muchos años se consideraban a los pequeños rumiantes únicamente como un hospedador accidental, como los humanos. En estudios recientes se ha revelado que estos animales son capaces de actuar como portadores de la bacteria e incluso diseminarla por largos periodos de tiempo. Es por eso que hoy en día se han considerado a los pequeños rumiantes como portadores de leptospiras patógenas de índole zoonótico y un peligro para la salud pública, principalmente para los trabajadores que tienen contacto directo con estos animales y sus excreciones.

Los estudios serológicos han asociado a la infección de los pequeños rumiantes con las cepas pertenecientes al serogrupo *sejroe*, principalmente a la serovariedad Hardjo. Es muy conocido que esta serovariedad está asociada íntimamente con el ganado bovino (Adler, 2015). Esta serovariedad posee una distribución mundial, con una alta prevalencia. Existen dos genotipos principales que ha demostrado ser capaces de infectar tanto al ganado bovino como al ovino siendo estos Hardjobovis y Hardjoprajitno. Hardjobovis posee mejores características de adaptación que Hardjoprajitno, es excretado en mayor cantidad en la orina por un animal infectado y este se localiza en la mayoría de los países susceptibles a *Leptospira*. Mientras que Hardjoprajitno ha sido observado únicamente en el Reino Unido, Nigeria, India, Malasia, Brasil, Estados Unidos y México (Ellis, 1994).

La prevalencia serológica tiende a ser mucho menor en los pequeños rumiantes comparado con el resto de los rumiantes, principalmente en los países menos desarrollados debido al sistema de manejo extensivo en las ovejas y cabras, disminuyendo la oportunidad de transmisión. También existe evidencia que estos animales son capaces de mantener la infección por Hardjo en ausencia del ganado bovino (Ellis et al., 1989). Por último esta misma información, respaldada con investigaciones recientes, nos indica que las diferentes serovariedades que afectan a los pequeños rumiantes son de infección incidental, siendo estos un reflejo de la infección por parte de otros animales domésticos presentes en la región (Ellis et al., 1989) (Campos et al., 2017) (Sabarinath et al., 2018).

4.1.4 Factores de riesgo

La leptospirosis es muy común en zonas de clima tropical y con alto índice de precipitaciones al año. Otro factor que predispone a la diseminación de esta enfermedad es la presencia de los roedores, especialmente los ratones y ratas que son portadores de la serovariedad *Icterohaemorrhagiae* y suelen estar presentes en zonas donde las condiciones sanitarias son pobres (Adler, Ben & de la Peña Moctezuma, 2010). Los charcos de agua contaminados son un gran foco de infección principalmente los cuerpos de agua de uso común como lagos en donde los animales tanto salvajes como domésticos tienen el acceso al agua para beber (Bharti et al., 2003).

Uno de los factores que juegan un papel importante en la diseminación de leptospirosis en los hatos es la presencia de animales salvajes, principalmente mamíferos como el jabalí, el zorro y el venado (Adler, 2015). Estos animales han sido descritos como portadores de diferentes serovariedades de *Leptospira*, por lo que al entrar en contacto con los animales domésticos incrementan el riesgo de infección dentro de un hato (Ganter, 2015).

A lo largo del tiempo se ha descrito a la leptospirosis como una enfermedad profesional, por lo que médicos, médicos veterinarios, granjeros, expositores de ganado y toda aquella persona que tiene contacto directo con animales infectados (Adler, 2015).

Otro aspecto que favorece la presencia de leptospirosis en los hatos es el número de animales en cada corral, ya que, a mayor número de animales en cada corral, mayor probabilidad hay de que se infecten con cualquier serovariedad de *Leptospira*. Hay estudios que indican que una cantidad mayor a 35 animales en un corral aumenta 4 veces la susceptibilidad de infección frente a *Leptospira* (Campos et al., 2017). Otro estudio similar demostró que un corral con más de 28 hembras en etapa reproductiva aumentaba 2.1 veces la probabilidad de infección(Oliveira et al., 2010).

4.1.5 Tratamiento

El tratamiento de leptospirosis consiste principalmente en el uso de antibióticos complementándose con tratamiento sintomático. En casos en los que un solo animal está enfermo o el animal es de alto valor se puede optar por terapia de apoyo como por ejemplo terapia de fluido, transfusión sanguínea así como diálisis.

4.1.6 Diagnóstico

Para poder brindar un tratamiento óptimo ante cualquier enfermedad es preciso dar con un buen diagnóstico, en el caso de leptospirosis no es la excepción. Existen varios métodos diagnósticos establecidos a lo largo de la historia para la detección de esta enfermedad que va desde la observación directa de la bacteria a partir de tejidos y secreciones por el microscopio hasta el aislamiento en medio de cultivo o simplemente la detección de anticuerpos específicos para esta enfermedad.

4.1.6.1 Prueba de Microaglutinación en placa

La prueba de oro para el diagnóstico de *Leptospira* en hatos es la prueba de microaglutinación en placa (MAT) la cual se fundamenta en la observación mediante microscopio de campo oscuro la aglutinación que ocurre entre las diferentes serovariedades y los anticuerpos IgG e IgM específicos para cada una de estas. Esta prueba posee una alta especificidad y sensibilidad, lo que le otorga una amplia confianza al momento de emitir los resultados; sin embargo, se ha establecido esta prueba como una prueba cualitativa, por lo que muchas veces el resultado emitido depende del

observador, por lo que éste debe estar bien capacitado para poder emitir un resultado correcto. Inconveniente de esta prueba es que es muy tardada y tediosa, sin mencionar que existe un alto riesgo de infección por parte del operario. Es por eso que se han buscado nuevas técnicas más rápidas y de menor riesgo (OIE, 2012).

4.1.6.2 Diagnostico por PCR

Las pruebas moleculares han sido en gran medida un gran apoyo para la detección de leptospiras en secreciones como orina y sangre. La técnica de PCR se fundamenta en la amplificación del DNA de la bacteria y se han establecido dos categorías, la amplificación de genes constitutivos como *rrs*, *sec Y* o *gyr B* que se encuentran presentes en todas las leptospiras y la amplificación de los genes específicos de cepas patógenas como *LipL32* y *lig*. Existen estudios que han demostrado la eficiencia de esta prueba diagnóstica a partir de muestras de orina y sangre superando en gran medida a la prueba de aislamiento; sin embargo, no es capaz de superar a la prueba de MAT en precisión (Adler, 2015).

Otra desventaja de la técnica por PCR es que no tiene la capacidad de diferenciar entre las serovariedades infectantes. Aunque esto no tiene importancia en casos aislados o clínicos, en cuestiones epidemiológicas y de salud pública es necesario conocer la serovariedad que está afectando en la zona en particular. La identificación de la serovariedad, requiere de su aislamiento mediante el cultivo a partir de muestras de los animales contaminados (Parma and Seijo, 2004).

4.1.6.3 Diagnostico por Cultivo Bacteriano

El cultivo de leptospiras requiere de medios de cultivos selectos específicos. Estos pueden ser líquidos, sólidos y semisólidos. Las leptospiras pueden ser aisladas a partir de muestras de sangre, tejido, orina, liquido cerebrospinal, y liquido peritoneal de pacientes con un curso agudo de la enfermedad. Es preciso conocer la etapa de la enfermedad para poder realizar un aislamiento exitoso, esto debido a que solo se puede lograr durante la etapa de leptospiremia, que suele iniciar a partir de la primera semana

de infección hasta la primera semana después de presentarse la signología clínica. Los medios de cultivo son incubados de 28 a 31°C y examinados mediante microscopio de campo oscuro una vez por semana durante 13 semanas. Sin embargo, esto no garantiza el crecimiento de la bacteria(Adler, 2015).

Las bacterias aisladas suelen ser tipificadas mediante pruebas serológicas o moleculares. Las pruebas moleculares se basan en la secuencia génica obtenida a partir de los aislados y el uso de la electroforesis en gel de campo pulsado ha logrado la identificación de varias serovariedades patógenas, sin embargo, no son capaces de remplazar la caracterización serológica solo de complementarla(Larson et al., 2017).

4.1.7 Prevención

Los principios de prevención son similares en todos los animales y están basados principalmente en la vacunación de los mismos. Las estrategias necesarias para implementar un esquema de vacunación para los animales deben considerar la localidad, factores de riesgo, serovariedades infectantes, mantenimiento de hospederos, mecanismos de transmisión y el control de animales salvajes, principalmente roedores.

La mayoría de las vacunas, sobretodo de caninos, cerdos y bovinos, poseen de dos a cinco serovariedades. En bovinos se ha visto que la vacuna que posee las serovariedades Hardjo y Pomona ha logrado proveer de una buena inmunidad durante un año. Así como también las recientes vacunas quintuples de los caninos, también han brindado inmunidad durante un largo periodo de tiempo. Las vacunas polivalentes, por el contrario, no han demostrado otorgar tanta inmunidad como las monovalentes, sin embargo, aún siguen vendiéndose comercialmente.

La vacunación en cerdos no ha sido tan rigurosa en cuanto al tiempo de inmunidad se refiere, esto porque los productores han establecido un periodo de inmunidad inferior al establecido para el ganado bovino.

El problema se presenta en países donde no hay vigilancia epidemiológica acerca de la leptospirosis, puesto que confían en las vacunas policlonales importadas las cuales pueden no ser apropiadas para la especie animal o la región.

En cuanto a los pequeños rumiantes, no existen vacunas específicas, por lo que en países desarrollados utilizan las vacunas de bovinos en estos animales, sin tomar en cuenta la cepa presente en el área. Esto causa un malestar entre los ganaderos los cuales culpan a la vacuna y la etiquetan de inservible. Mientras que en países menos desarrollados, los ganaderos no suelen vacunar a estos animales, principalmente por desconocimiento de las mismas.

4.1.8 Factores de virulencia

Existen varios componentes de *Leptospira* que permiten su patogénesis entre los que se encuentran los lipopolisacáridos, hemolisinas, proteínas de la membrana externa, además de proteínas de adhesión.

4.1.8.1 Proteínas de Membrana Externa

Las proteínas de membrana externa, sobre todo las que se encuentran en la superficie de la bacteria, son capaces de interactuar con el hospedador, contribuyendo a la patogénesis. También se han descrito otros roles fundamentales en la bacteria como son: resistencia a antimicrobianos, resistencia a bilis, poros de difusión, adhesión, invasión y resistencia al suero. Se han reportado situaciones en que las espiroquetas cambian la conformación de sus proteínas de membrana, adaptándose al entorno en que se encuentra, por ejemplo la proteína Omp11 que ayuda a *Leptospira* poder sobrevivir por tiempo prolongado en cuerpos de agua. (Cullen *et al.*, 2004)

4.1.8.2 Lipoproteínas

Las lipoproteínas han sido reconocidas como los ligandos más potentes de TLR2, produciendo la secreción de citosinas, provocando la maduración de células dendríticas. La membrana externa de *Leptospira* cuenta con diferentes lipoproteínas LipL32, LipL53 y LipL21. Estos incrementan la expresión de TLR2 y estimulan la liberación de proteínas quimioatrayentes de monocitos, Óxido Nítrico sintasa inducible y el factor de necrosis tumoral en las células del túbulo proximal durante la infección renal. (Cullen *et al.*, 2003; Tung *et al.*, 2010)

La lipoproteína Lip32 es muy importante en la patogénesis de la enfermedad, esto debido a que se encuentra en abundancia en la superficie de la membrana externa de las especies patógenas de *Leptospira*. Esta se encuentra anclada a la membrana externa a través de una unión covalente en C-terminal por ácidos grasos en el átomo de nitrógeno y un diacilglicerol en la cadena de sulfuro lateral. Se ha considerado que esta proteína promueve la hemólisis por la esfingomielinasa H, por esto se le conoce como Hap-1 (Proteína asociada con hemólisis 1).

4.1.8.3 Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos son moléculas anfipáticas que constituyen la superficie antigénica de bacterias Gram negativas. Los lipopolisacáridos están compuestos de tres componentes unidos de manera covalente: Lípido A, región hidrofóbica en la membrana externa; Antígeno O, que se extiende desde la superficie celular hacia el exterior; y el Lipooligosacárido, que une el antígeno O al lípido A. (Patra *et al.*, 2015)

4.1.8.4 Adhesinas

Las adhesinas son proteínas bacterianas que permiten iniciar la colonización mediante adhesión entre la bacteria y la célula diana. Estas tienen gran afinidad por los receptores específicos de las células blanco, membrana plasmática o componentes de matriz extracelular.

Leptospira posee una proteína muy similar a las adhesinas que le otorga la capacidad de adherirse a la matriz celular. Estas bacterias poseen dominios parecidos a las inmunoglobulinas denominadas Lig (*Leptospiral* Ig-like proteins). LigA y Lig B se encuentran en membrana externa como lipoproteínas con 11 dominios similares a inmunoglobulinas. La pérdida de estas proteínas se ha relacionado con la ausencia de virulencia de leptospiros saprofitas. (Matzunaga *et al.*, 2013)

Lig A es una proteína de 130 kDa. Consiste en láminas β con algunas regiones α helicoidales. Esta actúa como una molécula de adhesión y codifica determinantes de virulencia en cepas patógenas. Y se ha sido utilizado como marcadores de diagnóstico en infecciones tempranas de la enfermedad (Palaniappan *et al.*, 2002)

4.1.8.5 Hemolisinas

La habilidad de las hemolisinas de lisar eritrocitos y otras membranas celulares los hace un factor de virulencia potencial. Se han descubierto varias hemolisinas presentes en *Leptospira*, como la esfingomielinasa H. Se ha observado que en la serovariedad Lai la actividad hemolítica de la esfingomielinasa se ve reducida causando únicamente daño a la membrana sin llegar a lisar el eritrocito. Aún no se ha establecido el papel que juegan las hemolisinas en la patogénesis de *Leptospira*. Pero, la ausencia de estas proteínas en *Leptospira* saprofita, pueden dar una idea de la función en su virulencia (Lee *et al.*, 2002)

4.1.8.6 Porinas

Las porinas forman poros que permiten la difusión pasiva de solutos a través de la membrana externa de la bicapa lipídica. Estas proteínas suelen tener otras funciones además de la formación de poros. Pueden activar señales de transducción, actuar como adhesinas o como receptores de bacteriófagos.

Omp11 es una proteína transmembrana descrita en especies patógenas de *Leptospira*. Su estructura contiene por lo menos diez segmentos transmembranales β y canales de porinas en la bicapa lipídica. Los segmentos transmembrana son anfipáticos, lo que indica que sus residuos hidrófobos con orientación hacia la membrana pueden realizar “flip-flop” para alternarse con los residuos hidrofílicos hacia el interior de la membrana. Esta porina permite la difusión de solutos hidrofílicos a través de la membrana externa hacia el periplasma bacteriano. La expresión de esta proteína es controlada por diferentes genes (*ompL1/1*, *ompL1/2* y *ompL1/3*). Sin embargo, se ha considerado que la diferencia de genes no influye en la patogenicidad de la proteína. Esta proteína se encuentra presente en todas las leptospiros patógenas mientras que en las saprofitas se encuentra ausente (Fernandes *et al.*, 2012)

4.1.9 Interacción de *Leptospira* con Hospedero

Se ha pensado que el sistema inmune innato juega un papel fundamental en la patogénesis renal de *Leptospira*, en especial los Receptores Tipo Toll (TLR). Estos receptores son capaces de reconocer los PAMP's como los Lipopolisacáridos y glucolípidos de la membrana de bacterias. La activación de los TLR provoca una estimulación de células efectoras y secreción de varias citosinas. (Yang, 2007)

El lipopolisacárido de *Leptospira* es atípico, debido a que activa las células de defensa por TLR2 y no por TLR4 como sucede en la mayoría de las infecciones bacterianas. Esto es debido a la estructura particular de anclaje a membrana, el lípido A de *Leptospira*, que es el componente tóxico del lipopolisacárido. Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad endotóxica del lipopolisacárido de *Leptospira* es significativamente menor a la de muchas bacterias Gram negativa (Lo *et al.*, 2013)

TLR, en especial TLR2 y TLR4, tienen alta expresión en células epiteliales de túbulos renales. Además, que TLR2 es la causante de provocar una respuesta inflamatoria temprana en túbulos proximales durante la leptospirosis. (Lo *et al.*, 2013)

Cuando la bacteria entra en circulación y viaja hasta riñones las proteínas de membrana externa estimulan la secreción de mediadores proinflamatorios en las células epiteliales del túbulo renal mediante la inducción por activación de la protein cinasa activada por mitógenos. Primero la *Leptospira* regula la expresión de mRNA de TLR2 en túbulos renales. Después, las proteínas de membrana externa estimulan la activación de ERK1/2 (Extracelular signal-regulated kinases1/2), Quinasas c-Jun N-terminal y la p38 MAPK. También pueden iniciar la vía de NF- κ B, activando proteína -1 y favoreciendo la secreción de CCL2/MCP-1 y CXCL2/MIP-2. Esto trae como consecuencia la reacción inflamatoria causando glomerulonefritis intersticial. Provocando atrofia de los túbulos y fibrosis intersticial. La fibrosis se da debido a que la interacción de la bacteria con las células renales estimula la secreción del Factor de transformación de crecimiento β 1 (TGF- β 1) incrementando los niveles de colágeno tipo I y tipo IV. (Tung *et al.*, 2010; Yang, 2007)

4.1.10 Patogénesis

La infección de animales susceptibles ocurre a través del ingreso por membranas mucosas de los ojos, boca, nariz, vagina, y pene, además de tener la capacidad de penetrar piel dañada o lacerada y sana. También es muy común que se presente transmisión vertical de hembras infectadas. Después de 7 días de incubación, se presenta una bacteriemia, donde la bacteria empieza a diseminarse a través de torrente sanguíneo a otros órganos y concluye con la aparición de anticuerpos circulantes. La fase aguda se presenta durante esta etapa, se observa principalmente en animales jóvenes y está asociada a infecciones incidentales, principalmente a cepas productoras de hemolisinas como son *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae* que provocan problemas hemolíticos hemoglobinuria, ictericia y pueden llegar a causar la muerte. Después de este periodo, las espiroquetas se localizan principalmente en túbulos renales y en tracto genital de hembras maduras y machos enteros. Las leptospiras localizadas en túbulos renales, se multiplican causando daño en el endotelio generando una respuesta inmune exagerada. En este periodo el animal puede diseminar las bacterias a través de la orina (Adler et al., 2011). Las leptospiras que viajan hacia aparato reproductor de la hembra pueden persistir por un periodo de hasta 142 días y pueden ocasionar infección en el feto si la hembra queda preñada en este lapso de tiempo. Como consecuencia de la infección el feto será abortado diseminando bacterias a través de la placenta (Ellis, 1994)

4.1.11 Evasión del sistema de complemento

Las leptospiras, como otras bacterias cuentan con varios mecanismos de evasión del sistema inmune para evitar su destrucción. Las leptospiras patógenas pueden llegar a resistir incluso el sistema de complemento, mientras que las saprofitas son altamente susceptibles a estas defensas séricas. Las bacterias patógenas pueden unirse a la superficie de reguladores del complemento mediante diferentes ligandos como las proteínas similares a endostatina A y B (LenA y LenB), LigA y LigB y la proteína reguladora del complemento A (LcpA). (Verma *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2007) Se ha demostrado que estas proteínas se unen a más de una molécula reguladora y juegan

un papel fundamental, no solo en la evasión, sino que también en la adhesión e interacción con matriz extracelular y plasminógeno. (Adler, 2014) (**Figura 1**)

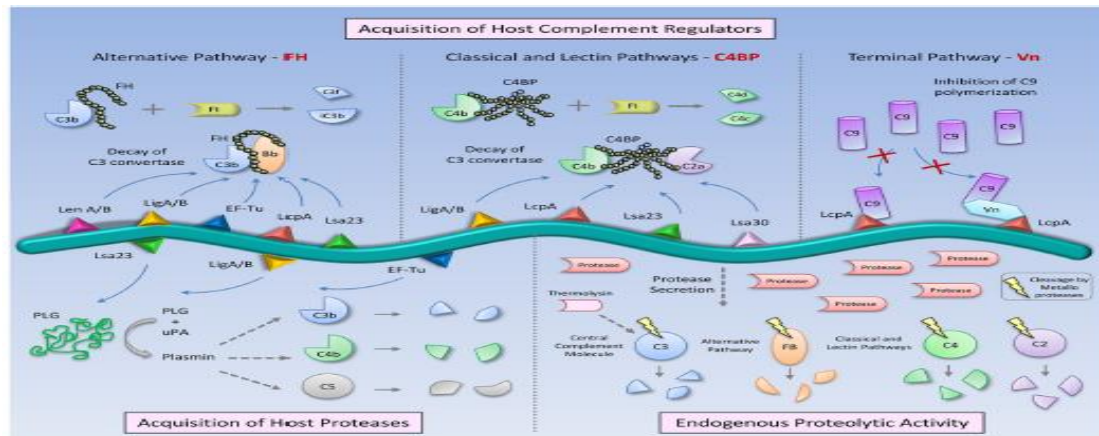


Figura 1. Mecanismos de evasión del sistema de complemento por *Leptospira* spp. (Fraga et al, 2016)

Las leptospiras patógenas son capaces de activar las diferentes vías del complemento. Esta bacteria puede controlar la vía alterna cuando interactúa con el factor H gracias a Len A, Len B, Lig B, y Lcp A que actúan como ligandos. Este factor inhibe la activación de la vía alterna, evitando la unión del Factor B al complejo C3b. (Whaley and Ruddy, 1976) Esto acelera la disminución de C3-convertasa C3bBb y actúa como un cofactor para la unión de C3b al dominio FI. Estas bacterias son capaces de unirse a tres miembros de la familia del factor H: el factor H, proteína similar al factor H-1 (FHL-1) y a la proteína relacionada con el factor H (FHR-1). Una vez que se une a la superficie de la *Leptospira*, el factor H permanece activado promoviendo la escisión del dominio C3b, formando el fragmento iC3b (Castiblanco-Valencia *et al.*, 2012).

El control de *Leptospira* sobre la vía clásica inicia con la unión de la bacteria a la glucoproteína plasmática C4BP por medio de Lig A y Lcp A como ligandos. Esta glucoproteína se encuentra en tres isoformas distintas con diferentes subunidades: $\alpha7/\beta1$, $\alpha7/\beta0$ y $\alpha6/\beta1$. C4BP inhibe la activación de la vía clásica y la vía de las lectinas, evitando la formación de C3 convertasa, además de actuar como cofactor de FI en la inactivación proteolítica de C4b (Gigli, I, Fujita, T, and Nussenzweig, 1979; Gigli *et al.*, 1979)

Leptospira también puede unirse a vitronectina, por medio de LcpA como ligando, en su superficie. Vitronectina es una glucoproteína que circula en torrente sanguíneo como monómero o se deposita en matriz extracelular como un polímero que interactúa con componentes macromoleculares incluyendo glucosaminoglucanos y colágenas. La vitronectina juega un rol importante en procesos biológicos incluyendo la regulación de la vía de terminación del sistema de complemento inhibiendo la formación del complejo C5b7 y la polimerización de C9. Cuando la vitronectina se une a la espiroqueta, le confiere una protección contra la lisis mediada por el complejo de ataque a membrana. (da Silva *et al.*, 2015)

4.1.12 Prevalencia

Debido a que las infecciones por *Leptospira* han aumentado el interés de los investigadores cada vez se han hecho más estudios observando la prevalencia de leptospirosis alrededor del mundo, principalmente se ha estudiado la situación en bovinos, donde se han llegado a resultados de hasta un 21 % en Nueva Zelanda (Fang *et al.* 2015), 29.3 % en bovinos de carne y 42.3 % en búfalos en Uganda (Atherstone *et al.*, 2014), 81 % en Malasia (Daud *et al.*, 2018). Mientras que en el continente Americano se han establecido prevalencias del 50.5 % en el Noreste de Brasil (Campos *et al.*, 2017), 39 % en Ontario, Canadá (Prescott *et al.*, 1989). En México también se han realizado trabajos en bovinos destacando el realizado por Segura-Correa *et al.* en (2003) en el estado de Yucatán en donde obtuvieron una prevalencia del 62.8 %. Y el trabajo realizado por Salinas *et al.* en (2007) en el estado de Nuevo León donde registraron una prevalencia del 46 %. En México también hay estudios realizados en pequeños rumiantes, principalmente en caprinos, entre los que se encuentran los realizados por García (2011) en la región de la Laguna donde obtuvo una prevalencia del 60 % en ovinos; Peña (2012) obtuvo una prevalencia del 25 % en el Estado de Veracruz. Gonzales (2013) obtuvo una prevalencia del 45.5 % en el estado de San Luis Potosí. Luna *et al.* en (2018) obtuvieron una prevalencia del 71 % en el estado de Guanajuato.

4.2 Lentivirus de los pequeños rumiantes (SRLV)

Los Lentivirus no oncogénicos pertenecen a la familia *Retroviridae*. Estos virus se caracterizan por su habilidad para transcribir de manera reversa la cadena de RNA viral a una cadena doble de DNA (dsDNA) gracias a la acción de la transcriptasa reversa. Estos incluyen virus que son capaces de ocasionar infecciones crónicas en humanos, felinos, equinos, bovinos y pequeños rumiantes.

Los Lentivirus son virus envueltos, pleomórficos y esféricos de aproximadamente 100 nm de diámetro. La envoltura posee pequeñas espículas dispersas equitativamente en su superficie.

4.2.1 Características genéticas

El genoma de estos virus está compuesto por un único RNA positivo trenzado diploide que contiene tres genes estructurales: *gag*, que codifica para antígenos específicos; *pol*, que codifica para transcriptasa reversa, integrasa, RNAsa H, proteasa y dUTPasa; finalmente *env*, gen que codifica para la glucoproteína de superficie de unión al receptor y a la entrada del virus de la célula huésped; tres genes reguladores (*tat*, *vif* y *rev*) y una región de repetición terminal larga (LTR) que provee las señalizaciones *cis* necesarias para la transcripción, integración y poliadenilación del RNA viral. (Figura 2).

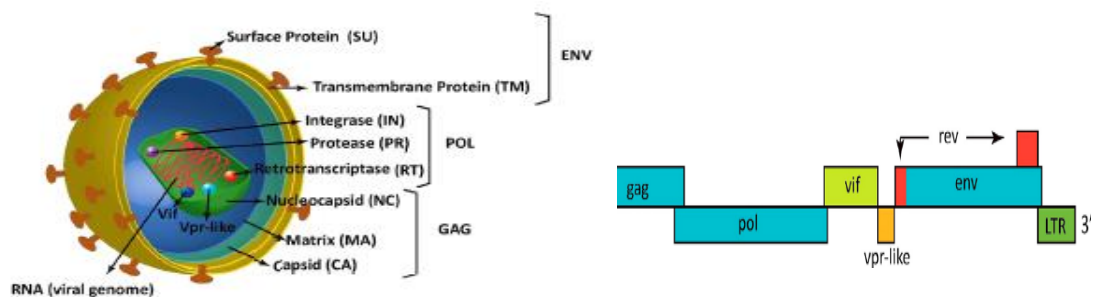


Figura 2. Estructura y genoma de Lentivirus en pequeños rumiantes (Minguijón et al, 2015)

El gen *gag* codifica para tres glucoproteínas del precursor Pr55^{gag} que son: la cápside (p25), la nucleocápside (p14) y la matriz (p17) que asegura la unión entre la cápside y la

envoltura viral. La proteína de matriz permite la adhesión de los precursores de *gag* con la membrana plasmática celular, esta proteína se localiza entre la membrana viral y la cápside. La cápside forma la base hidrofóbica del virión permitiendo una respuesta antigénica fuerte durante la infección (Michelle *et al.*, 1998)

El gen *env* codifica para la glucoproteína de la envoltura viral. La glucoproteína es sintetizada como un precursor (gp160) y es dividida por una proteasa de la célula blanco en dos subunidades: la glucoproteína de superficie (gp135) y la glucoproteína transmembranal (gp44). Estas glucoproteína contienen los epítomos necesarios para generar una respuesta humoral y para poder unirse al receptor de membrana celular. (Dalziel *et al.*, 1991)

El gen *pol* es importante para la replicación viral, este gen codifica para la transcriptasa en reversa, una DNA polimerasa dependiente de RNA, que permite la transcripción del RNA viral en DNA. Este gen también codifica para la enzima dUTPasa. Esta enzima es exclusiva de Lentivirus que afectan a animales no primates y aún no se conoce exactamente su función. Otra enzima codificada por el gen *pol* es la proteasa. Finalmente, el gen *pol* codifica para la integrasa. Esta proteína actúa después de la transcripción viral. Cuando los viriones migran hacia el núcleo, la integrasa es la responsable de integrar el genoma del virión con el DNA de la célula huésped. (Elder *et al.*, 1992; Turelli *et al.*, 1996; Stormann *et al.*, 1995)

El gen *rev* codifica para una proteína de 19 kDa derivado de un mRNA de 1.4 kb. Este gen consiste de cuatro exones: un segmento líder (exón 1), una región no traducible (exón 2) y dos exones traducibles (exón 3) y (exón 4). Debido a que este gen es muy antiguo, se ha podido constatar que su función permite el transporte de mRNA no maduro del núcleo al citoplasma. Esta proteína contiene señalizadores de exportación nuclear que le permiten atravesar la membrana nuclear y ejercer su función reguladora por medio de elementos de respuesta (RRE) localizados en este mismo gen. El RRE es capaz de asegurar la unión del RNA a su sitio de unión (Mazarin *et al.* 1990; Toohey and Haase, 1994).

El gen *tat* codifica para una proteína de 10 kDa. que se describió principalmente por su capacidad de estimulación de la expresión génica por promotores localizados en 5' LTR. La proteína *tat* regula la acumulación del RNA viral por medio de sitios de unión a activadores de proteína 1 (AP-1) y activadores de proteína 4 (AP-4) en la región U3 de los LTRs y por factores celulares como c-Fos y c-Jun (Gdovin and Clements, 1992; Carruth *et al.*, 1996).

Estos virus son capaces de ocasionar diferentes patologías según su hospedador siendo algunos como el SIDA en el humano y primate, neumonía progresiva crónica en ovinos (Maedi-Visna), artritis y encefalitis en caprinos, leucemia en felinos e inmunodeficiencia en bovinos.

4.2.2 Patogénesis

Las infecciones por Lentivirus, dependen de diferentes factores como: la cepa, el hospedador y el microambiente. Estos factores influyen sobre el tropismo del virus hacia un hospedador determinado o célula en particular.

La variabilidad genética de estos virus, se da debido a mutaciones y a la recombinación genética que se logra durante la replicación dentro de un animal. Esta variabilidad genera la capacidad vírica y juega un papel importante en el poder de virulencia y de antigenicidad del virus (Clements & Christine Zink, 1996)

La principal vía de transmisión de estos virus en pequeños rumiantes es por vía lactogénica, la ingesta de leche materna contaminada con virus. Otras vías menos frecuentes, sobretodo en ovinos con Maedi-Visna , son por contacto directo prolongado con animales infectados, debido a que el exudado respiratorio puede diseminar el virus en el hato(Michel *et al.*, 1998)

El virus es absorbido en por el intestino invadiendo los macrófagos en sangre periférica donde empieza a replicarse. El virus sale de macrófagos llegando a infectar sistema nervioso central y membranas sinoviales donde, por medio de una respuesta inmunitaria exagerada se presentan las principales lesiones de estas enfermedades. También puede

llegar a ocasionar daño en pulmones causando una neumonía intersticial (Michel *et al.*, 1998).

4.2.3 Interacción de los Lentivirus con el Hospedero

Los Lentivirus generan una respuesta humoral muy fuerte. Sin embargo, estos anticuerpos neutralizantes no suelen ser suficientes para poder acabar con la infección. También existe reacción del sistema de defensa celular. Sin embargo, las células CD8⁺ generan una respuesta más agresiva lo que provoca lesiones en el animal. Estas células citotóxicas son capaces de inhibir la replicación viral, pero también son las responsables de causar daño a los tejidos debido a la producción de citosinas. (Clements & Christine Zink, 1996)

Las citosinas son proteínas de señalización que actúan como mediadores del sistema inmunológico. Varios estudios han demostrado que la expresión, el polimorfismo y el perfil de inducción de las citosinas así como de sus receptores, afectan juegan un papel crucial en la patogénesis del virus. Las citosinas inducen y modulan el reclutamiento y diferenciación de monocitos a macrófagos favoreciendo la interacción de estas células con los virus, ayudando a la replicación y propagación de los virus en el organismo (Zhang *et al.*, 2002)

El sistema inmunológico innato también cumple una función importante durante la infección por Lentivirus. Como el sistema inmune innato reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), polimorfismo en los genes del sistema inmune afecta la susceptibilidad del hospedador a la infección. Esto se ha observado en genes que codifican receptores tipo Toll (TLR) teniendo una mayor susceptibilidad de infección (Mikula *et al.*, 2010)

Los TLR son una familia de señalizadores moleculares transmembrana que desencadenan la acción de ambos tipos de inmunidad (adquirida e innata) en respuesta a PAMP's. Mikula *et al.* (2010) indicaron un aumento en la susceptibilidad de ovejas raza Tsigai asociado a un polimorfismo en un solo nucleótido en TLR7 y TLR8. Mutaciones en estos genes afectan la unión de PAMP's a los receptores.

Existe otro sistema de defensa que han desarrollado los animales en respuesta a antígenos virales u otros elementos transponibles que afectan su genoma denominado factores de restricción. Estas proteínas bloquean la replicación viral de diferentes maneras como: atacando directamente la estructura viral o editando el material genético viral durante el proceso de transcripción reversa.

En ovinos, se han hecho estudios en los que se demuestra el efecto de la proteína TRIM5 α en la restricción de la síntesis de DNA del virus *Maedi*. Este factor pertenece a una familia de proteínas que restringen la replicación del virus asociándose a la cápside evitando así el desnudamiento viral (Jauregui *et al.*, 2012). Aunque no se ha demostrado en animales, se ha confirmado que una mutación en la proteína TRIM5 α en humanos disminuye su acción antiviral, acelerando la presentación de enfermedad (Van Manen *et al.*, 2008). Otra proteína de restricción específica contra retrovirus es la enzima editora de la Apolipoproteína B mediante mRNA semejante al polipéptido catalítico, que actúa contra gran cantidad de retrovirus incluyendo a los que afectan a pequeños rumiantes (Huthoff & Towers, 2008)

4.2.4 Replicación viral

Los mecanismos de replicación de estos virus son similares a los de otros retrovirus teniendo mayor tropismo por células dendríticas y macrófagos (Legastelois *et al.*, 1997). El primer paso para la replicación de estos virus es la interacción de los viriones con la célula diana; la glucoproteína de superficie del virus interacciona con los receptores específicos de la superficie celular. La interacción de los Lentivirus con los receptores causa un cambio en la conformación en la glucoproteína transmembranal, exponiendo el dominio hidrófobo en el extremo N-terminal (Cochrane *et al.*, 1990). La entrada del virus hacia la célula esta mediada por la fusión de la envoltura nuclear con la membrana celular. Una vez dentro de la célula, el virus empieza a desnudarse y el RNA viral es copiado por la transcriptasa reversa generando una cadena doble de DNA del genoma viral. La región LTR del genoma viral juega un papel importante en la integración del DNA viral al cromosoma del hospedador. Una vez que el DNA viral se integra al genoma celular, la célula puede permanecer latente con poca o sin actividad viral. La

LTR también contiene señales para la activación del proceso transcripcional, así como síntesis de RNA, encapuchamiento y poliadenilación. Estas secuencias se encuentran en la región U3 de las LTR. Para que se dé el proceso de transcripción, se requiere la expresión de los factores transcripcionales de la célula huésped. Los Lentivirus poseen sitios de unión específicos para los factores de transcripción Ap-1 y Ap-4. La unión a estas proteínas en la región LTR del virus *Maedi* es importante para activar la transcripción de estos virus en macrófagos. Los Lentivirus de pequeños rumiantes utilizan otros factores de transcripción como c-JUN y c-FOS que le dan un estímulo fuerte para el comienzo de la transcripción. La transcripción del RNA viral siempre resulta en la síntesis de un mRNA que actúa como el genoma viral así como un mRNA para los genes *pol* y *gag*. La síntesis del mRNA viral ocurre en el núcleo de la célula infectada siendo los genes *tat* y *rev* proteínas regulatorias de los niveles de mRNA inmaduro en citoplasma.

El gen *Tat* incrementa la expresión génica de los componentes postranscripcionales y transcripcionales. En algunos sRNA virales, la estructura TAR sirve como sitio de unión de la proteína Tat y de otras proteínas que incrementan la expresión de genes del promotor viral y aceleran la transcripción del RNA por la RNA polimerasa II. La proteína Tat del virus *Maedi* activa la transcripción por vía asociación a proteína AP-1 muy cercano a la caja TATA. También activa la transcripción de promotores heterólogos (Gdovin, 1992; Carruth, 1996).

La función de la proteína Tat es la de incrementar la expresión del mRNA viral durante la expresión de genes temprana. Esta etapa se caracteriza por presencia de RNA maduro e inmaduro en el núcleo pero únicamente presencia de RNA maduro en citoplasma. Este proceso resulta en la producción de proteínas reguladoras de Tat, Rev y Nef.

La proteína Rev es necesaria para poder continuar con la transcripción. Esta proteína facilita la exportación de mRNA inmaduro del núcleo hacia los polirribosomas. La proteína Rev actúa uniéndose al elemento de respuesta de REV presente en los genes *env* del Lentivirus, facilitando el transporte de mRNA inmaduro al citoplasma (Toohey & Haase, 1994).

4.2.5 Mecanismos de Evasión Viral

4.2.5.1 Mutación

Los retrovirus poseen una habilidad innata de evadir la respuesta inmune de los animales: la mutación. Estas mutaciones ocurren durante la replicación en la etapa de transcriptasa reversa. Esta variación se le atribuye a la falta de la capacidad correctora de errores de la transcriptasa reversa teniendo un margen de error de 0.2-2 mutaciones en genoma por ciclo (Ramírez *et al.*, 2013).

Este tipo de mutaciones se dan debido a una des-aminación de citosinas por miembros de APROBEC. Estas proteínas son empaquetadas en el virión y se asocian con el factor de transcripción en la célula diana, donde se des-aminan los residuos de citosina en uracilos en la cadena negativa, desarrollando una mutación en G-A en la cadena positiva. Este tipo de mutación se lleva a cabo en células diferenciadas, por ejemplo macrófagos. Los macrófagos poseen un desbalance en los desoxirribonucleosidos trifosfato (dNTP) presentando un exceso de desoxiuridina trifosfato(dUTP) (Turelli *et al.*, 1996). El uracilo es una base nitrogenada presente únicamente en el RNA. Sin embargo, este puede ser incorporado a un DNA debido a la incapacidad de la transcriptasa reversa de distinguir entre dUTP y dTTP. Algunos retrovirus como los Lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV) codifican para una desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa (dUTPasa), que cataliza la conversión de dUTP en dUMP, manteniendo una relación baja de dUTP: dTTP previniendo la mutación por parte de la transcriptasa reversa(Elder *et al.*, 1992). La inactivación de la dUTPasa ocasiona un incremento en el grado de mutaciones con la acumulación de adenina. Los virus que presentan una recombinación deficiente de dUTP tienen una replicación menos eficiente en macrófagos y fibroblastos, debido a que este juega un papel importante en la aparición de lesiones como artritis carpal bilateral(Blacklaws, 2012).

4.2.5.2 Recombinación

La mutación por sí sola no podrá mantener la existencia del virus por lo que se requiere otro sistema de evasión. La recombinación genética puede ocurrir frecuentemente. Este mecanismo de diversificación genética puede alterar la mutación en virión. Puede crear

combinaciones genéticas que favorezcan la variedad genómica viral, además que puede eliminar mutaciones desfavorables para el virus. En la ausencia de una recombinación, los organismos tienden a acumular mutaciones perjudiciales reduciendo la capacidad viral de supervivencia en cada ciclo de replicación.

Una recombinación eficiente de los retrovirus resulta de una infección de dos virus diferentes en la misma célula que se logran empaquetar en cada virión. Durante la transcripción reversa siguiente, la transcriptasa reversa viral cambia el genoma ocasionando la generación de un DNA complementario. Esto causa que los viriones posean un genoma diferente a sus progenitores (Pisoni *et al.*, 2010).

4.2.6 Métodos de Diagnóstico

El diagnóstico de los Lentivirus de los pequeños rumiantes puede ser clínico, sin embargo solo una pequeña cantidad de animales presenta signos clínicos. La enfermedad rara vez se presenta antes de los dos años, exceptuando a en los cabritos donde la encefalitis es evidente después de unos cuantos meses posterior a la infección. En cuanto a la histología, los órganos diana presentan cambios histopatológicos asociados con inflamación crónica, infiltración de células mononucleares. Sin embargo, estas lesiones no son patognomónicas.

La mejor manera para el diagnóstico de Lentivirus de pequeños rumiantes, es mediante la utilización de técnicas serológicas. Una amplia variedad de técnicas de laboratorio están disponibles para este propósito. Estos incluyen Inmunodifusión en gel de agarosa (AGID), Ensayo Inmunológico Ligado a Enzimas (ELISA), Radioinmunoprecipitación (RIPA), Radioinmunoensayo (RIA) y Western Blott (WB). Cada uno de estas pruebas posee sus ventajas y desventajas y es a criterio del veterinario utilizar el más adecuado de acuerdo a la situación.

Las técnicas de ELISA y AGID han sido consideradas por la OIE como las pruebas estándar para la exportación internacional decretado en el Manual de Pruebas diagnósticas y de las Vacunas de Animales Terrestres del 2008.

4.2.6.1 Inmunodifusión en Gel de Agarosa

El estudio serológico más utilizado para el diagnóstico de Lentivirus es la técnica de AGID. Esta prueba está establecida por la Organización Mundial de Sanidad Animal, como la prueba prescrita para propósitos de regulación. Esta técnica utiliza todo el virus que ha sido aislado y desnaturalizado por detergentes y detecta anticuerpos contra las proteínas p25 (MVV), p28 (CAE) y la proteína gp135 antígeno de la envoltura. La sensibilidad y especificidad de la prueba se ha reportado que es de 91 % y 100 % respectivamente, sin embargo, estudios recientes han demostrado una sensibilidad de 76 % y una especificidad de 98 %. (de Andrés *et al*, 2005; Ramirez *et al*, 2013)

4.2.6.2 Ensayos Inmunológicos Ligados a Enzimas

Las pruebas de ELISA son métodos analíticos tanto cuantitativos como cualitativos que demuestran la reacción entre un antígeno y anticuerpos mediante el cambio de la coloración utilizando un conjugado unido a una enzima y un substrato que sirve para identificar la presencia y concentración de moléculas en fluidos biológicos. Este tipo de pruebas diagnósticas poseen una alta especificidad, esto debido a que los anticuerpos poseen una alta afinidad a su antígeno, por lo que es casi imposible que estos se puedan unir a moléculas diferentes que no sean un antígeno particular. Actualmente existen varios kits a nivel comercial por ejemplo: CAEV/MVV kit, IDEXX Suiza ELISA indirecto de virus completo. También existen kits de proteínas recombinantes como el kit específico para la proteína recombinante GAG p25 utilizado en el kit Elitest MVV/CAEV (HYPHEN Biomed, Neuville, sur, Oise, France). Pero en algunos casos, las pruebas enfocados en una sola cepa no suelen abarcar el espectro completo del virus y fallan en la detección de infecciones por parte de los genotipos E y A. Recientemente, han emergido nuevos genotipos, ampliando las posibilidades diagnósticas, llevando a la creación de nuevas pruebas de ELISA indirectas, como la creada a partir de una mezcla de genes *env* y *gag* de tres diferentes cepas del Lentivirus de los pequeños rumiantes. Las pruebas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos han sido de gran ayuda en la determinación de la condición de los hatos, sin embargo, en ciertos lugares con recursos limitados, esta tecnología puede ser inaccesible cuando se requiere para casos

aislados, por lo que estrategias de detección de anticuerpos en los hatos, a partir de leche bronca, una combinación de sueros (pool) y muestras de semen deben ser establecidos en estas áreas.

4.2.6.3 Técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la detección in vivo de infecciones por Lentivirus en pequeños rumiantes por técnicas moleculares basadas en PCR se utilizan muestras de leucocitos de sangre periférica o células mononucleares. Por lo que la eficiencia de la prueba depende principalmente en la especificidad de los primers, conocer la región viral a amplificar y la sensibilidad de la prueba. Sin embargo, una baja carga viral existente en los animales infectados, la baja proporción de células permisivas y la alta heterogenicidad pueden interferir en el diagnóstico por PCR. (Knowles, 1997).

Los iniciadores utilizados para el diagnóstico mediante PCR abarcan el genoma completo, incluyendo el **LTR** y los genes *pol*, *env* y *gag*. Sin embargo, como la enzima transcriptasa reversa carece de la función de corrección de errores, existen mutaciones en la replicación viral en un rango de 1 mutación por apareamiento incorrecto cada 10^5 nucleótidos. Por lo que, en la actualidad, se utilizan iniciadores frente a regiones más conservadas. Por ejemplo, *pol* y **LTR** poseen regiones más conservadas que *gag*. Siendo *env*, la región con mayor variabilidad (De Andrés et al., 2005).

Las pruebas de PCR tiene ventaja sobre las pruebas serológicas detectando verdaderos positivos en muestras de animales con anticuerpos calostrales. Leroux et al. en (1997) desarrollaron un RT PCR utilizando primers frente la región *pol* obteniendo muestras positivas en todos los animales examinados, siendo que anteriormente los mismos animales habían sido probados mediante pruebas serológicas en donde un animal había resultado seronegativo. En otro estudio realizado por Rosati et al. (1995) examinaron cuatro pares de primers diseñados frente a LTR, *env* y *gag* utilizando el DNA de células infectadas provenientes de diferentes áreas geográficas. Los primers utilizados amplificaron en un 100% frente a LTR, 62.5% frente a *gag* y 25% frente a *env*. Por lo que, a pesar de su alta variabilidad la región *env* puede ser utilizado como blanco en las pruebas de PCR (Ramirez et al. 2013).

Las pruebas de PCR tienen la capacidad de detectar animales infectados antes de que estos desarrollen anticuerpos frente al virus. De acuerdo a la patogenia de los Lentivirus de los pequeños rumiantes, los provirus suelen estar presentes antes de una respuesta humoral en los animales adultos, pero estos no siempre son detectados. Existen estudios en los que comparan pruebas serológicas con pruebas moleculares obteniendo un resultado positivo (mutuo) que van desde el 70% hasta el 94.7% y resultado negativo (mutuo) que va desde 87% al 100% (Reddy et al.1993; Rimstad et al 1993; Extramiana et al.2002; Travassos et al. 1999; Wagter et al 1998); por lo que se puede sugerir que una combinación entre serología y PCR puede mejorar el diagnóstico dentro de una población. Además, los productos de PCR pueden ser secuenciados, lo que puede ayudar en el desarrollo de nuevos primers con mayor rango de reconocimiento (Ramirez et al. 2013).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

- Campana de flujo Thermo Fisher Scientific® class II serie 1300
- Estufa de cultivo RIOSSA® serie E-41D
- Microscopio óptico Axioskop 40 ZEISS®
- Portaobjetos de microscopio Fisher Scientific®.
- Centrífuga refrigerada Biometrix® Micro17TR
- Refrigerador de 16 pies cúbicos 2-4 °C TORREY®
- Pipeta graduada 10 ml Pyrex®
- Ultracongelador de -20°C CFC0735ARW, ADMIRA®
- Micropipetas monocanal Bio/Pet® (1000/100µl); (200/20µl); (100/10µl); (10/0.5µl)
- Micropipeta multicanal Bio/Pet® (300/50µl)
- Tubos de polipropileno de microcentrífuga MCT-150-C
- Tubos para cultivo de 25 ml Fisher Scientific®
- Placas de poliestireno con 96 pocillos de fondo redondo
- Pipetor manual VWR Scientific Products®
- Matraz Erlenmeyer graduado Thermo Fisher Scientific® 250 ml
- Placas de Petri de 60 mm Thermo Fisher Scientific®
- Lector de ELISA ELx800; BIOTEK®
- Balanza analítica APX-200 Denver Instruments®.
- Potenciometro de sobremesa de calibración manual H12209-02 Hanna Instruments®
- Termociclador, MultiGene™ OptiMax Labnet
- Jeringas plásticas desechables BD™ 5ml
- Filtros de jeringa MILLEX™ MerckMillipore serie –AA (0.8µm) (0.45µm) (0.22µm)
- Cámara de PCR UV2 UVP.

- Autoclave
- Cámara Transiluminadora UVP; UV, MultiDoc-It, Digital Imaging System™
- Bloque térmico (55-60°C) AccuBlock, Labnet International®
- Puntillas desechables para micropipetas de 10, TF-300-R-S, AXYGEN 20, 200 T-200-Y, AXYGEN SCIENTIFIC®
- Vortex; Daigger®, Genie 2.

5.2 Material Biológico

- Suero de caprinos y ovinos domésticos facilitados por los propietarios de distintas UPP en el Estado de Nuevo León.
- Orina de caprinos y ovinos obtenidas mediante micción inducida por furosemida.
- Serovariedades de *Leptospira* (Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Gryppotyphosa, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Tarassovi, Wolffi) amablemente proporcionado por el Laboratorio Central Regional de Monterrey , A.C. de la UGRNL

5.3 Estuches comerciales

- SMALL RUMINANT LENTIVIRUS ANTIBODY TEST KIT, cELISA 2 placas, VMRD® 289-2.
 - Placas de microtitulación de 96 pocillos divididas en 12 tiras
 - Viales conteniendo suero Control positivo
 - Viales conteniendo suero Control negativo
 - Vial conteniendo conjugado (Ac-HRP antigp135) de Peroxidasa concentrado a 100x.
 - Frasco de solución de lavado concentrado 25x
 - Frasco con solución de dilución
 - Frasco con sustrato (TMB)
 - Frasco con solución de frenado

5.4 Reactivos

- Cloroformo al 99.8% Jalmek®
- Alcohol isopropílico 99.5%, Jalmek®.
- Etanol Anhidro 99.5%, Jalmek®.
- Solución de agarosa, Agarosa LE, AGR-LE-500 ASYGEN BIOSCIENCES: 1,5 % (w/v) en Buffer SB1X.
- Buffer de corrimiento para RNA/DNA:SB 1X
- Marcador de Peso molecular 500µl 100pb DNA, GenScript®
- Buffer SB 1X (50 ml. Buffer 20X, 35 gr. Ácido bórico (F.W. 61.83) y 6 gr de NaOH (F.W. 61.83), 1 litro de agua destilada, pH 8, estéril) y 950 ml agua destilada y esterilizada (buffer de electroforesis).
- Caldo Biotriptasa BDB Bioxon®
- Extracto de Carne BDB Bioxon®
- Cloruro de Sodio Jalmek®
- Hidroxido de Sodio Jalmek®
- Cloruro de Potasio monobásico Jalmek®
- Cloruro de Potasio dibásico Jalmek®
- Rojo de Fenol libre de ácido MPbio®
- Urolix Diurético Furosemida Tornel Laboratorios®
- Ácido Nalidixico 98% Sigma Aldrich™

5.5 Área de Estudio y Tamaño de muestra

El presente estudio fue realizado en hatos de ovinos y caprinos del estado de Nuevo León ubicado en el Noreste de México y comprende las latitudes 23° 11' Norte, 27° 49' Sur y longitudes 101° 14' Este y 98° 26' Oeste. El muestreo consideró al número total de hatos registrados en el padrón de beneficiarios del 2014 del Programa de Producción Pecuaria Sustentable y Ordenamiento Ganadero y Apícola (PROGAN) obtenidos por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a partir de los cuatro distritos de desarrollo rural (DDR) de (Galeana, Montemorelos, Anáhuac y Apodaca) en los que se divide el estado (**Figura 3**). Con base en los números de unidades de producción pecuaria registrados en el programa y el número de animales por cada unidad de producción se estableció el total de la población participante en este programa (N), obteniendo de esta manera el tamaño de la muestra (n).

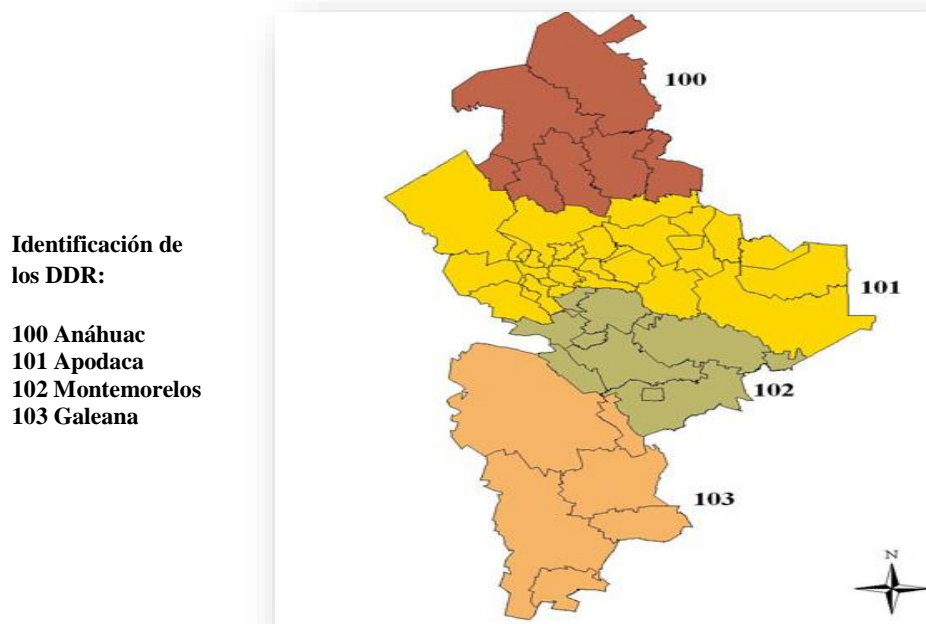


Figura 3. Estado de Nuevo León con las zonas de estudio divididos por DDR según el Programa de Producción Pecuaria y Ordenamiento Ganadero y Apícola

El número total de la muestra de ovinos y caprinos se obtuvo mediante el programa computacional EpiMuestra (Segura 2000). Debido a que no existen reportes previos de Leptospirosis ni Lentivirus en ambas especies en el Noreste de México, se consideró una prevalencia esperada de 50%, un nivel de confianza del 95% y precisión del 5%. En adición, se utilizó un muestreo en dos etapas (muestrearon hatos y el número de animales por hato), considerándose arbitrariamente, un efecto de diseño (D) de 2 (Segura y Honhold 2002).

La fórmula para estimar el tamaño de muestra total fue:

$$n = D * (Z^2 * p * q) / d^2$$

Donde n= tamaño de muestra; D = efecto de diseño; Z= valor de la tabla de Z con un nivel de confianza del 95% (1.96); p= prevalencia esperada (0.50); q= 1-p; d= precisión. El tamaño de muestra calculado fue 768 animales. Sin embargo, se muestrearon 840 animales, 441 cabras de 67 hatos y 399 ovinos de 52 hatos. Por tanto, se muestrearon en promedio 6.6 cabras y 7.7 ovinos por hato.

Para la evaluación de los factores de riesgo se aplicó una encuesta recabándose información sobre el funcionamiento general del hato enfocado en bioseguridad, problemas reproductivos, vacunación y salud individual y grupal de los animales (Anexo 1).

5.6 Tipos de muestras colectadas

Para el presente estudio se colectaron muestras de sangre obtenidas por venopunción de la vena yugular tanto de caprinos como de ovinos utilizando tubos sin EDTA al vacío (Vacutainer, Becton Dickinson®, New Jersey, USA). Los tubos obtenidos se registraron con los datos de cada hato, especie, región del muestreo y registro del animal donde se obtuvo la muestra. Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración al laboratorio de virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su procesamiento.

Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm/ 5 minutos para separar el suero, el cuál fue depositado en tubos de microcentrifuga rotulados con la información del hato y animal de procedencia y almacenado en congelación a -20°C hasta su uso.

5.7 *Leptospira*

5.7.1 Elaboración del medio de cultivo

El medio utilizado para el cultivo y mantenimiento de la bacteria fue el medio líquido COX modificado, el cuál fue preparado de la siguiente manera 0.3 g de caldo biotriptasa (Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos), 6 ml de fosfato de potasio monobásico, 0.15 ml de rojo de fenol, 0.003 g de ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich™, Missouri, Estados Unidos). Todo se disolvió en un matraz de 250 ml con 150 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2. En cada tubo de cultivo se colocaron 9 ml de medio de cultivo Cox modificado y fue esterilizado por autoclave a 121 °C por 20 minutos.

5.7.2 Mantenimiento del cultivo de serovariedades de *Leptospira*

Para mantener la viabilidad de todas las serovariedades, estas fueron resembradas en un tiempo no mayor a 3 semanas colocando 1 ml de cada serovariedad en 9 ml de medio de cultivo líquido Cox modificado estéril.

5.7.3 Purificación de las serovariedades de *Leptospira*

La purificación de las cepas se llevó a cabo con el fin de mantener la pureza de las serovariedades que pudieran estar contaminadas. Con una jeringa de 3ml se obtuvieron 2 ml del cultivo contaminado y se fijó a un filtro para jeringa (Millex Millipore®) con una membrana de 0.45µl vaciando el contenido en un medio de cultivo estéril.

El cultivo se observó a través de microscopio de campo oscuro semanalmente para verificar el buen crecimiento de las bacterias y que no presentaran material contaminante.

5.7.4 Criterio del Estudio Serológico

Fue empleado la prueba de Microaglutinación en Placa (MAT), la cuál es la prueba de referencia para estudios epidemiológicos de hato establecido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Fueron considerados positivos aquellas muestras que denotaran una aglutinación mayor al 50 % a partir de una dilución 1:100 hacia una o más serovariedades de *Leptospira* observadas a través de un microscopio de campo oscuro. Se empleó un panel de nueve serovariedades provenientes de ocho serogrupos diferentes correspondientes a las cepas utilizadas en estudios anteriores en bovinos de la misma zona (Salinas *et al.*,2007). (Tabla 1).

Tabla 1

Lista de serovariedades utilizadas en la prueba de MAT

Especie	Serovariedad	Serogrupo	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Bratislava	Australis	Jes- Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrech IV
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L.interrogans</i>	Gryppotyphosa	Gryppotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Sejroe	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L interrogans</i>	Wolfii	Sejroe	3707

5.7.5 Procedimiento para la realización de la prueba de MAT

5.7.5.1 Preparación de solución Salina Tamponada de Fosfatos (PBS)

La solución de PBS posee dos soluciones base: 27 ml de fosfato de potasio monobásico al 71 mM y 63 ml de fosfato de potasio dibásico al 50 mM, después se aforó a 504 ml con agua destilada, se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

5.7.5.2 Preparación de dilución inicial

En un tubo de ensayo de 20 ml se colocó 2.4 ml de solución PBS y se agregó 100µl de muestra de suero, con esto se obtuvo una dilución inicial 1:25.

5.7.5.3 Trabajo en Microplaca

Se colocó 50 µl de solución PBS en Columnas G, F y E en la microplaca serológica. Se tomó 50 µl de la dilución inicial y se depositó en Columna H. Posteriormente, se colocó 50 µl de la dilución inicial en la siguiente fila homogenizando de 3 a 7 veces. De esta fila se obtuvo 50 µl y se colocaron en la siguiente fila. Se repitió el mismo procedimiento para la tercera y cuarta fila. Finalmente, se tomó otros 50 µl el cuál fue desechado. Con esto se obtuvieron las siguientes diluciones: Columna H 1:25, Columna G 1:50, Columna F 1:100 y Columna E 1:200.

5.7.5.4 Colocación de la batería de *Leptospira*

Para obtener la cantidad necesaria de cepa se utilizó la siguiente fórmula:

$N * 50\mu\text{l} * 4 \text{ pozos} = \text{cantidad en } \mu\text{l} \text{ de antígeno de } \textit{Leptospira} \text{ a utilizar}$

Dónde: N = número de muestras a procesar; 50 µl = cantidad de antígeno por pozo; 4 pozos = número total de pozos a colocar el antígeno

La cantidad de trabajo de la cepa se obtuvo y almacenó en reservorios de plástico dentro de una campana de flujo laminar nivel II para evitar contaminación del cultivo. Se colocó 50 µl de antígeno en cada pozo con muestra. Al final se obtuvo las siguientes diluciones: Columna H 1:50, Columna G 1:100, Columna F 1:200 y Columna E 1:400. Se colocó en una incubadora a 29 °C durante dos horas y se observó en microscopio de campo oscuro para ver aglutinación.

5.7.6 Técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa

5.7.6.1 Extracción de la muestra

Para la extracción de las muestras de orina se utilizó el siguiente protocolo:

La orina se centrifugó a 5000 rpm, durante 5 minutos y del sobrenadante se colocó 1 ml de orina y agregar una solución de 500 µl de tampón de lisis, homogenizar y romper las células por fricción mecánica con un agitador .. Incubar por baño María durante 1 hora a 65 °C. Después, añadir 500 µl de fenol-cloroformo a 4°C y agitar de manera manual o con agitador mecánico. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos y obtener del sobrenadante 350 µl y pasarlos a otro tubo para microcentrifuga nuevo. Añadir 65 µl de acetato de sodio 3M y 75µl de NaCl 1 M y agitar suavemente por inversión. Dejar en refrigeración por 30 minutos. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos. Tomar 500µl del sobrenadante en un tubo para microcentrifuga nuevo. Añadir 270µl de alcohol isopropanol y dejar a -20°C durante toda la noche. Centrifugar durante 10 minutos a 10,000 rpm, eliminar el sobrenadante y añadir 500µl de alcohol al 70% para lavar el pellet. Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante. Secar al vacío en su totalidad y resuspender el pellet en 20 µl de solución Tris-EDTA.

5.7.6.2 Amplificación

Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial de 94 °C por 10 minutos, 35 ciclos de 94 °C cada uno por 1 minuto, alineamiento a 55 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión adicional de 72 °C por 5 minutos (Castellar et al. 2016). Las reacciones se llevaron a un volumen final de 10 µl conteniendo 5 µl de PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific®, Estado Unidos), 0.5 µl de cada iniciador, 3 µl de agua ultrapura y 1 µl de DNA de la muestra. El producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa TAE al 1.5% (Axygen®, Estados Unidos). Para la detección de *Leptospira* en general se utilizaron los primers comerciales del gen *Sec Y* (5'- ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') y (5'- AGTTGAGCCCGCAGTTTC-3'). Para la confirmación de leptospirosis patógenas se

utilizaron los primers comerciales del gen *LipL32* (5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTAT-3') y (5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTT-3').

5.7.7 Técnica de Aislamiento

5.7.7.1 Preparación del medio de cultivo

Para el aislamiento se utilizó el medio de cultivo líquido modificado Fletcher, el cual fue preparado de la siguiente manera: 0.1 mg de NaCl, 0.06 mg de extracto de levadura, 0.04 mg de extracto de carne y 0.0025 mg de ácido nalidíxico enriquecido con 10 % de SCE. Esto se preparó con 200 ml de agua destilada, mezclando hasta obtener una solución homogénea. Se ajustó el pH a 7.3 utilizando una solución de NaOH al 1 M. y se esterilizó mediante autoclave a 121°C durante 20 minutos.

5.7.7.2 Procesamiento de las muestras de orina

De cada muestra de orina obtenida, se recolectó 1 ml y se colocó en un tubo con 10 ml. de medio de cultivo estéril. Posteriormente se colocó en una incubadora a 29°C. Se observó el crecimiento de las muestras cultivadas mediante microscopía de campo oscuro a una resolución de 10X una vez por semana durante 15 semanas. Las muestras que demostraron crecimiento y motilidad de *Leptospira* fueron catalogadas como positivas y sembradas en nuevo medio de cultivo líquido estéril donde posteriormente fueron caracterizadas serológicamente.

5.7.8 Caracterización Serológica

Las muestras que resultaron positivas al aislamiento fueron procesadas mediante la técnica de caracterización serológica, la cual consiste en la determinación del serogrupo que está afectando en una zona determinada. Esta técnica fue utilizada siguiendo los lineamientos establecidos por Miraglia *et al.* (2008) utilizando dos sueros anteriormente

caracterizados frente a las 9 serovariedades estudiadas en el presente trabajo y observando la reacción entre los anticuerpos monoclonales y las muestras aisladas mediante microscopio de campo oscuro a una resolución de 10X.

5.7.9 Separación de muestras contaminadas

Las muestras que fueran observadas con contaminación, fueron resembradas en medio de cultivo sólido, utilizando el medio de cultivo Fletcher anteriormente descrito agregando 3 g de agar bacteriológico. El medio fue vertido en placas de Petri de 50 mm hasta tener un fondo de 4 mm. Las muestras fueron sembradas de manera convencional mediante la utilización de un asa bacteriológica e incubada a 29 °C observándolas directamente hasta su crecimiento.

Una vez observado el crecimiento, las colonias fueron observadas en microscopio de campo oscuro para la identificación de *Leptospira*, las colonias que demostraran una morfología y motilidad asociada con *Leptospira* fueron resembradas en medio de cultivo Fletcher líquido e incubadas a 29 °C observando el crecimiento una vez por semana en microscopio de campo oscuro.

5.8 Lentivirus de Pequeños rumiantes

Para el diagnóstico de Lentivirus en pequeños rumiantes (Neumonía progresiva ovina y Artritis-Encefalitis Caprina) se utilizó un estuche comercial de diagnóstico de ELISA de competición el cual está enfocado en la detección de anticuerpos contra una región conservada del antígeno gp 135 de Lentivirus. Tiene como fundamento la interacción que tienen los anticuerpos presentes en el suero de los animales, los cuáles reaccionan a un antígeno comercial. Esta interacción inhibe la unión de la peroxidasa de rábano al antígeno, generando ausencia de color. Al no encontrarse anticuerpos en el suero, la peroxidasa interactúa con el antígeno generando una coloración fuerte, que indica un pequeño o nulo bloqueo de la peroxidasa indicando ausencia de anticuerpos. Mientras que una coloración débil debido a la inhibición de los anticuerpos monoclonales al antígeno indica una presentación de anticuerpos séricos en los animales.

5.8.1 Procedimiento para la realización de la técnica de ELISA de competencia

5.8.1.1 Trabajo en placa

El procedimiento para el trabajo en microplaca es el siguiente:

Se adicionan 50 µl de los reactivos (Conjugado, Sustrato, Stop) desde los pozos A1 hasta A3. Se colocan los controles positivo y negativo por duplicado en pozos A4, A5, A6 y A7, siguiendo con las muestras de suero a probar en el resto de la placa. Se tapa la placa y se deja incubando por 1 hora a temperatura ambiente.

Se vacía la placa desechando el contenido en un lugar apropiado. Y se agregan 250 µl de solución de lavado 1X en todos los pozos, se desecha el contenido, se repite el proceso tres veces. Se colocan 50 µl de conjugado en todos los pozos y dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a repetir el lavado. Se colocan 50 µl de sustrato en todos los pozos y se deja incubando por 20 minutos a temperatura ambiente, se agrega solución de Stop a cada pozo. Finalmente se coloca la placa en un lector de ELISA configurado a una densidad óptica de 650 nm.

5.8.2 Interpretación del resultado

Para la interpretación de los resultados se utilizó la siguiente fórmula:

$\% \text{ de inhibición} = 1 - \text{Densidad óptica de la muestra} / \text{Densidad óptica de control negativo}$

Si la muestra presenta un % de inhibición \geq a 35% la muestra es positiva

Si la muestra presenta un % de inhibición $<$ a 35% la muestra es negativa.

5.9 Análisis Estadístico

Para calcular la prevalencia se utilizó la siguiente fórmula: $\text{Prevalencia} = \text{Animales enfermos} / \text{Total de animales analizados} \times 100$.

Para determinar la asociación entre los factores de riesgo y la seropositividad a los agentes infecciosos se utilizó la prueba de χ^2 . Si el valor de P fue mayor a 0.05 ($P > 0.05$) se consideró que no hubo asociación; por el contrario, si el resultado fue menor a

0.05 ($P < 0.05$) se consideró que si hubo asociación entre los factores de riesgo y la seropositividad. En adición, se calcularon los ORs por factor de riesgo. Para identificar posibles factores de riesgo se realizó una encuesta a los productores.

Posteriormente se realizó un análisis multivariado, el cuál incluyo los factores de riesgo significativos en la prueba de chi-cuadrada (tamaño del hato, número de animales por corral, tipo de explotación, tipo de animales silvestres presentes en el hato, presencia del médico veterinario, bajo peso de los animales al nacer e introducción de nuevos animales al hato). Así como medidas de cuarentena o control y profilaxis, para calcular los “Odds Ratio” ajustados mediante regresión logística utilizando el programa computacional SPSS.

6 RESULTADOS

6.1 Tamaño de muestra

La toma de muestra se realizó de los cuatro DDR de Nuevo León. Sin embargo, debido a que el estado no posee una distribución homogénea de las unidades de producción caprina y ovina, se utilizaron las siguientes unidades de producción: en Anáhuac se tomaron 15 unidades de producción caprina y 7 ovinas y en Apodaca 24 unidades de producción caprina y 21 ovina. En Montemorelos se utilizaron únicamente 8 unidades de producción ovina. En Galeana fueron muestreadas 28 unidades de producción caprina y 16 ovinas. En total se muestrearon 119 unidades de producción pecuaria, que fue el resultado de la aplicación del efecto de diseño tomando en cuenta que la distribución de los animales era heterogéneo.

Se tomaron muestras de los diferentes hatos dependiendo de la cantidad de animales en la explotación. En los hatos menores de 100 animales se muestrearon 5 animales mientras que los hatos que contenían más de 100 animales se muestrearon 10 animales. Esto dio un total de 67 hatos caprinos (15 hatos de Anáhuac, 24 hatos de Apodaca, 28 hatos de Galeana) y 52 hatos ovinos (7 hatos de Anáhuac, 21 hatos de Apodaca, 16 hatos de Galeana y 8 hatos de Montemorelos) de todo Nuevo León.

Para motivos de comparación se obtuvieron 23 sueros de caprinos de la región Lagunera en Coahuila. Además se realizaron dos muestreos más en un hato con alta seroprevalencia de *Leptospira* en dos periodos diferentes: Marzo 2018 y Noviembre 2018 donde el propósito fue observar el comportamiento biológico de *Leptospira* a través del tiempo. Durante estos dos periodos se obtuvieron un total de 25 muestras de orina (12 caprinos y 13 ovinos) de los cuáles 19 (10 caprinos y 9 ovinos) fueron obtenidos durante el segundo periodo y 6 (2 caprinos y 4 ovinos) en el tercer periodo.

6.2 Detección serológica de *Leptospira* spp.

La seroprevalencia general obtenida, independientemente de la especie animal, tomando en cuenta títulos mayores a 1:100 y hacia cualquier serovariedad fue 13.6 % (114/840).

En los sueros analizados se observaron siete de las nueve serovariedades probadas en el estudio a diferentes títulos de dilución (**Tablas 2 y 3**). En general, la serovariedad más predominante fue Hardjo 8.1% (68/840), seguida por la serovariedad Icterohaemorrhagiae con una prevalencia de 1.9 % (16/840). Después, siguieron en importancia Bratislava y Pomona con 1.4% (12/840), Pyrogenes con 0.4 % (3/840), Canicola con 0.2 % (2/840) y finalmente Tarassovi con 0.1 % (1/840). No fue encontrado evidencia de presencia anticuerpos contra las serovariedades Gryppotyphosa y Wolfii.

Tabla 2

Prevalencia total de ovinos y caprinos en el Nuevo León, México frente a nueve serovariedades de *Leptospira*

Serovariedad	Reactores %		
	Ovinos (n=399)	Caprinos (n=441)	Total
Hardjo	26 (6.5)	42 (9.5)	68 (8.1)
Icterohaemorrhagiae	7 (1.7)	9 (2.0)	16 (1.9)
Pomona	9 (2.2)	3 (0.7)	12 (1.4)
Bratislava	4 (1.0)	8 (1.8)	12 (1.4)
Pyrogenes	1 (0.3)	2 (0.5)	3 (0.4)
Canicola	0	2 (0.5)	2 (0.2)
Tarassovi	1 (0.3)	0	1 (0.1)
Gryppotyphosa	0	0	0
Wolfii	0	0	0
Total	48 (12.0)	66 (15.0)	144 (13.6)

Tabla 3

Proporción de seropositivos total obtenida contra distintas serovariedades de *Leptospira spp* mediante MAT en ovinos (n: 399) y caprinos (n: 441) del estado de Nuevo León, México.

Serovariedad	Título de Dilución						Positivos (%)	
	1:100		1:200		1:400		Ovino	Caprino
	Ovino	Caprino	Ovino	Caprino	Ovino	Caprino		
Hardjo	17	27	7	12	2	3	26 (54.2)	42 (63.8)
Pomona	9	2	0	0	0	1	9 (18.8)	3 (4.5)
Icterohaemorrhagiae	7	9	0	0	0	0	7 (14.6)	9 (13.6)
Bratislava	3	6	0	2	1	0	4 (8.3)	8 (12.1)
Pyrogenes	1	2	0	0	0	0	1 (2.1)	2 (3.0)
Canicola	0	2	0	0	0	0	0	2 (3.0)
Tarassovi	1	0	0	0	0	0	1 (2.1)	0
Grippityphosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Wolfii	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	38	49	7	14	3	4	48 (12.0)	66 (15.0)

* Únicamente se muestran los seroreactores con títulos de dilución ≥ 100

Por especie animal, en caprinos se observó una prevalencia general del 15.0 % (66/441), donde Hardjo fue la más frecuente con una prevalencia del 9.5 % (42/441), seguido de la serovariedad Icterohaemorrhagiae con una prevalencia del 2.0 %; después le siguieron las serovariedades Bratislava 1.8 % (8/441), Pomona 0.7 % (3/441) y finalmente las serovariedades Canicola y Pyrogenes con 0.5 % (2/441). En ovinos la prevalencia general fue 12.0 %, donde Hardjo fue la más alta 6.5 % (26/399), seguida de Icterohaemorrhagiae 1.7 % (7/399), Pomona 2.2 % (9/399), Bratislava 1.0 % (4/399) y finalmente Pyrogenes y Tarassovi con 0.3 % (1/399).

Por DDR, en Apodaca se observó una prevalencia general del 21.0 % (69/329), siendo la principal serovariedad Hardjo 13.7 % (45/329), seguida de Pomona 2.4 % (8/329), Icterohaemorrhagiae 2.1 % (7/329), Bratislava 1.5 % (3/329), Pyrogenes 0.6 % (2/329) y finalmente las serovariedades Canicola y Tarassovi con 0.3 % (1/329) cada una. Por especie animal, en caprinos se obtuvo una prevalencia del 21.4 % (37/173) donde la

serovariedad con mayor presencia fue Hardjo 17.3 % (30/173), seguida de Bratislava e Icterohaemorrhagiae con prevalencia de 1.2 % (2/173) en ambas y finalmente las serovariedades Canicola, Pomona y Pyrogenes con prevalencias del 0.6 % (1/173). En ovinos, la prevalencia general fue 20.5 % (32/156), donde la serovariedad que más prevalencia tuvo fue Hardjo 9.6 % (15/156), seguida de Pomona 4.4 % (7/156), Icterohaemorrhagiae 3.2 % (5/156), Bratislava 1.9 % (3/156) y finalmente las serovariedades Pyrogenes y Tarassovi con 0.6 % (1/156), cada una.

En Galeana, la prevalencia general 12.5 % (39/314) siendo Hardjo la más frecuente 6.4 % (20/314), seguida de Icterohaemorrhagiae 2.5 % (8/314), Bratislava 2.5 % (7/314), Pomona 0.6 % (2/314) y finalmente, Canicola y Pyrogenes con 0.3 % (1/314). Por especie animal, en caprinos se obtuvo una prevalencia del 16.5 % siendo la serovariedad Hardjo la de mayor presencia con una prevalencia del 7.0 % (12/170), seguida de las serovariedades Bratislava e Icterohaemorrhagiae con 3.5 % (6/170), después Pomona con 1.2 % (2/170) y finalmente las serovariedades Canicola y Pyrogenes con 0.6 % (1/170). En ovinos la prevalencia fue 7.6 % (11/144), teniendo la serovariedad Hardjo la mayor frecuencia 5.6 % (8/144), seguida de Icterohaemorrhagiae 1.4 % (2/144) y Bratislava 0.7% (1/144).

En Anáhuac se observó de manera general una seroprevalencia del 3.7 % (5/134), siendo las principales serovariedades presentes Bratislava y Hardjo con prevalencias del 5.6 % (2/134), seguido de Icterohaemorrhagiae con prevalencia de 0.7 % (1/134). El resto de las serovariedades resultaron negativas en este distrito. Por especie animal, en caprinos únicamente la serovariedad Icterohaemorrhagiae resultó positiva observándose una prevalencia del 1.0 % (1/98); mientras que en ovinos las serovariedades que resultaron positivas fueron Bratislava y Hardjo con una prevalencia del 5.6 % (2/36) cada uno.

En Montemorelos se observó una prevalencia general del 1.6 % (1/63) (únicamente se muestrearon ovinos) donde Hardjo fue la única serovariedad reactiva.

Acorde al total de hatos (**Tabla 4**), el distrito rural con más hatos caprinos de casos seropositivos fue Apodaca el cual registró 37.5 % (9/24) y con la mayor prevalencia de seropositivos en hatos ovinos fue Anáhuac con 28.57% (2/7). Por otro lado, el distrito

rural con la menor cantidad de hatos caprinos seropositivos se registró en Montemorelos, mientras que en ovinos el distrito con menor seroprevalencia de hatos fue Galeana 6.3% (1/17).

Tabla 4

Distribución de la seropositividad contra *Leptospira* spp. en hatos ovinos y caprinos acorde con el Distrito de Desarrollo Rural (DDR) en el estado de Nuevo León, México.

DDR	Especie**	Seropositivos		Seronegativos		Total
Apodaca*	Caprino	9 (37.5%)	14 (31.1%)	15 (62.5 %)	31 (69.0%)	45
	Ovino	5 (23.8%)		16 (76.2%)		
Galeana*	Caprino	6 (21.4%)	7 (15.9%)	22 (78.3%)	37 (84.1%)	44
	Ovino	1 (6.3%)		16 (76.2%)		
Anáhuac*	Caprino	1 (6.7%)	3 (13.6%)	14 (93.3%)	19 (86.3%)	22
	Ovino	2 (28.6%)		5 (71.4%)		
Montemorelos	Caprino	0	7 (12.5%)	0	7 (87.5%)	8
	Ovino	1 (12.5%)		7 (87.5%)		
Total	Caprino	16 (23.9%)	25 (21.0%)	51 (76.1%)	94 (79.0%)	119
	Ovino	9 (17.3%)		43 (82.7%)		

*P<0.05

**P>0.05

Los resultados de la proporción de hatos seropositivos frente a distintas serovariedades de *Leptospira* acorde al tipo de explotación se muestran en la **tabla 5**. De todos los hatos seropositivos, se observó que la serovariedad Hardjo se presentó en la mayoría de los casos como mono-infección o co-infección múltiple con una o dos serovariedades de *Leptospira*. Solo resultó como mono-infección en cuatro casos de hatos caprinos del total analizado, no observándose esta condición en hatos ovinos o mixtos.

Por otra parte, Hardjo en combinación con Bratislava fue encontrada en igual proporción en un hato caprino, un hato ovino y un hato mixto. Esta misma serovariedad asociada con Pyrogenes se encontró en dos casos de hatos caprinos y un hato ovino, sin

presentarse en hatos mixtos. Dos casos de co-infección múltiple entre Hardjo e Icterohaemorrhagiae y Bratislava y Hardjo con Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes fue detectado únicamente en dos casos de hatos mixtos, no observándose casos en hatos caprinos y ovinos, como especies únicas de explotación. En un solo caso se observó la combinación entre Hardjo e Icterohaemorrhagiae y este fue en un hato de caprinos. Por otra parte, la asociación serológica entre Hardjo y Tarassovi solo se observó en un hato ovino. Las combinaciones entre Bratislava con Canicola y Bratislava con Pomona fueron observadas en un solo hato caprino, no presentándose en hatos ovinos ni mixtos. La serovariedad Icterohaemorrhagiae en combinación con Pomona se presentó únicamente en un hato mixto, sin observarse en hatos caprinos y ovinos.

Tabla 5

Proporción de hatos seropositivos hacia distintas serovariedades de *Leptospira* conforme al sistema de explotación de pequeños rumiantes en el estado de Nuevo León, México.

Combinación serovariedades		Tipo de hato			
		Ovinos (n=40)	Caprinos (n=55)	Mixto (n=12)	
Hardjo		0	4 (7.3)	0	
	Bratislava	1 (2.5)	1 (1.8)	1 (8.3)	
	Pyrogenes	1 (2.5)	2 (3.6)	0	
	Icterohaemorrhagiae	Bratislava	0	0	2 (16.7)
		Pyrogenes	0	0	2 (16.7)
			0	1 (1.8)	0
	Tarassovi	1 (2.5)	0	0	
Bratislava	Canicola	0	1 (1.8)	0	
	Pomona		0	1 (1.8)	0
Icterohaemorrhagiae			0	0	1 (8.3)
Total		3 (7.5)	10 (18.2)	6 (50.0)	

(*) Porcentaje del total de hatos seropositivos ya sea monoespecie o mixto

De los factores de riesgo analizados (**Tabla 6**), 9 factores tuvieron efecto en la presentación de leptospirosis en los diferentes hatos de pequeños rumiantes. Los factores de riesgo asociados a leptospirosis fueron región, tamaño de hato, tipo de explotación, sistema de producción, presencia de animales domésticos en el hato, presencia de animales salvajes en el hato, antecedentes de abortos, índice de preñez del hato, introducción de nuevos animales al hato, así como la presencia de medidas de bioseguridad y de médico veterinario.

Tabla 6

Factores de riesgo asociados a la presencia de *Leptospira* en pequeños rumiantes de Nuevo León, México.

Variable/Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor χ^2	P	Odds Ratio 95%
Presencia de jabalí /cerdo salvaje					10.1 (6.6-15.7)
1	65	7.7			
0	84	10	139.6	<0.0001	
Presencia de Bovinos					7.0 (4.4-10.9)
1	85	10.1			
0	215	25.6	86.7	<0.0001	
Índice de Preñez < 50%					5.2 (1.6-16.7)
1	111	13.2			
0	654	77.9	9.5	0.0021	
Sistema de producción lechera					3.0 (2.0-4.2)
1	76	9.0			
0	288	34.3	29.2	<0.0001	
Región Apodaca					2.7 (1.8-4.1)
1	69	8.2			
0	260	31.0	25.3	<0.0001	
Ausencia de médico veterinario					2.4 (1.6-3.6)
1	63	7.5			
0	247	29.4	19.1	<0.0001	
Tamaño del hato 61-100					2.1 (1.4-3.1)
1	45	5.4			
0	173	20.6	12.5	<0.0004	
Explotación extensiva					1.7 (1.1-2.6)
1	76	9.0			
0	394	46.9	6.1	0.013	
Antecedentes de aborto					1.9 (1.3-2.8)
1	59	7.0			
0	262	31.2	10.2	0.0014	
Sin antecedentes de aborto					1.0 (0.4-0.8)
1	55	6.5			
0	464	55.2	10.2	0.0014	
Asistencia del veterinario					0.4 (0.3-0.6)
1	51	6.0			
0	479	57.0	19.1	<0.0001	

1: Denota una respuesta afirmativa o positiva 0: Denota una respuesta negativa

* No existe asociación mediante Odds Ratio

Tabla 6

Factores de riesgo asociados a la presencia de *Leptospira* en pequeños rumiantes de Nuevo León, México. (Continuación).

Variable/Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor χ^2	P	Odds Ratio 95%
Explotación semi-intensiva					0.3 (0.1-0.9)
1	5	0.6			
0	86	10.2	5.7	0.017	
Sistema de producción de carne					0.3 (0.2-0.5)
1	38	4.5			
0	438	52.1	29.2	<0.0001	
Tamaño del ható 1-60					0.3 (0.2-0.5)
1	13	1.5			
0	254	30.2	25.3	<0.0001	
Región Anáhuac					0.2 (0.1-0.5)
1	5	0.6			
0	129	15.4	13.2	<0.0001	
Índice de preñez > 50%					0.2 (0.1-0.6)
1	3	0.4			
0	92	11.0	9.5	0.0021	
Región Montemorelos					0.1 (0.01-0.7)
1	1	0.1			
0	62	7.4	8.3	0.0039	
Región Galeana					*
1	39	4.6			
0	275	32.7	0.6	0.45	
Especie Caprina					*
1	66	7.9			
0	375	44.6	1.5	0.2147	
Especie Ovina					*
1	48	5.7			
0	351	41.8	1.5	0.2147	
Tamaño del ható 111-2000					*
1	56	6.7			
0	299	35.6	2.5	0.1107	
Explotación intensiva					*
1	33	3.9			
0	246	29.3	1.1	0.2981	
Presencia de cerdos domésticos					*
1	13	1.5			
0	108	12.9	1.0	0.326	
Presencia de venado salvaje					*
1	25	3.0			
0	220	26.2	3.3	0.0675	

1: Denota una respuesta afirmativa o positiva 0: Denota una respuesta negativa

* No existe asociación mediante Odds Ratio

Tabla 6

Factores de riesgo asociados a la presencia de *Leptospira* en pequeños rumiantes de Nuevo León, México. (Continuación).

Variable/Característica	Frecuencia	Porcentaje	Valor de χ^2	P	Odds Ratio 95%
Animales con bajo peso al nacer					*
1	79	9.4			
0	493	58.7	0.1	0.7669	
Sin animales con bajo peso al nacer					*
1	35	4.2			
0	233	27.7	0.1	0.7669	
Animales con retraso en el crecimiento					*
1	71	8.5			
0	512	61.0	3.2	0.0758	
Sin animales con retraso en el crecimiento					*
1	43	5.1			
0	214	25.5	3.2	0.0758	
Animales con malformaciones al nacer					*
1	33	3.9			
0	231	27.5	0.4	0.5393	
Sin animales con malformaciones al nacer					*
1	81	9.6			
0	495	58.9	0.4	0.5393	
Introducción de nuevos animales					*
1	84	10			
0	296	35.2	43.1	<0.0001	
No introducen nuevos animales					*
1	30	3.6			
0	430	51.2	43.1	<0.0001	
Presencia de cuarentena					*
1	27	3.2			
0	162	19.3	0.04	0.8339	
Ausencia de cuarentena					*
1	97	11.5			
0	554	66.0	0.04	0.8339	

1: Denota una respuesta afirmativa o positiva 0: Denota una respuesta negativa

* No existe asociación mediante Odds Ratio

6.3 Comportamiento serológico, bacteriológico y molecular de *Leptospira* en un hato mixto caprino-ovino seropositivo.

Un hato mixto caprino-ovino ubicado en el municipio de China, Nuevo León en el que qué previamente se determinó su estado serológico frente a *Leptospira* fue utilizado para analizar el comportamiento de la infección mediante serología, bacteriología y detección molecular de la leptospirosis desde el año 2016 hasta 2018.

6.3.1 Serología

De un banco de sueros almacenados desde el año 2016 se analizaron al azar 7 sueros de caprinos y 8 ovinos. La seropositividad general obtenida fue del 53.3% (8/15), no obstante el índice de seropositivos por especie fue distinto resultando en 71.4% (5/7) en caprinos y 37.5% (3/8) en ovinos. De los ejemplares analizados se obtuvieron exclusivamente reacciones de seropositividad a diluciones de 1:100, observándose seropositividad contra las serovariedades Hardjo (4) y Canícola (1) en caprinos mientras que en ovinos contra Hardjo (3) y Pomona (1). Subsecuentemente hacia marzo del 2018 se volvió reanalizar el hato mediante la prueba de MAT, obteniéndose una prevalencia general del 51.9% (14/27) siendo las serovariedades Hardjo la más abundante con 22.2% (6/27) seguido de Canicola con 18.5% (5/27), Bratislava con 7.4 % (2/27) y finalmente Tarassovi con 3.7% (1/27). En esta ocasión se logró observar diluciones de seropositividad entre 1:100 y 1:200 en los animales seropositivos. Por especie animal, el 75.0% (9/12) de los caprinos resultó con anticuerpos antileptospira frente a las serovariedades Hardjo 44.4% (4/12), Canicola 22.2% (2/12), Bratislava 22.2% (2/12) y Tarassovi 11.1% (1/12). El 33.3% (5/15) de los ovinos resultó con anticuerpos frente a las serovariedades Canicola 20.0% (3/15) y Hardjo 13.3% (2/15). En noviembre del mismo año a partir del mismo hato se analizaron 90 sueros (40 ovinos y 50 caprinos). La seroprevalencia general fue del 75.5 % (68/90) (**Tabla 7**), resultando que las serovariedades Hardjo y Bratislava como las más abundantes 18.8 % (15/90), seguido de Icterohaemorrhagiae con 15.6 % (14/90), Canicola 14.4 % (13/90), Gryppotyphosa 5.6 % (5/90), Pomona 4.4 % (4/90) y Pyrogenes 2.2 % (2/90) (**Tabla 7**). A nivel de especie animal en caprinos se obtuvo una prevalencia del 90% (45/50) resultando la

serovariedad Bratislava la de mayor presencia 22.0% (11/50), seguido de Icterohaemorrhagiae 20.0 % (10/50), Hardjo 18.0 % (9/50), Canicola 12.0 % (6/50), Pomona 8.0% (4/50), Gryppotyphosa 6.0% (3/50) y Pyrogenes 4.0% (2/50). Mientras que en ovinos se obtuvo una prevalencia del 57.5% (23/40) observando que la serovariedad Canicola fue la de mayor presencia 17.5 % (7/40) seguido de Hardjo 15.0 % (6/40), Bratislava 10.0 % (4/40), Icterohaemorrhagiae 10.0 % (4/40) y Gryppotyphosa 5.0 % (2/40).

Tabla 7

Comportamiento serológico de la infección por serovariedades^(*) de *Leptospira* en un hato mixto ovino-caprino durante 3 años en Nuevo León, México.

Seroprevalencia	Periodo					
	2016 (Marzo)		2018 (Marzo)		2018 (Noviembre)	
	ovino	caprino	ovino	caprino	ovino	caprino
General	55.3% (n=15)		51.9% (n=27)		75.5% (n=90)	
Especie	37.5% (n=8)	71.4% (n=7)	33.3% (n=15)	75% (n=12)	57.5% (n=40)	90% (n=50)
Hardjo	3 ^(**)	4	2	4	6	9
Canicola	0	1	3	2	7	6
Pomona	1	0	0	0	0	4
Bratislava	0	0	0	2	4	11
Tarassovi	0	0	0	1	0	0
Icterohaemorrhagiae	0	0	0	0	4	10
Gryppotyphosa	0	0	0	0	2	3
Pyrogenes	0	0	0	0	0	2

(*) Se analizaron 9 serovariedades de *Leptospira* para todos los sueros

(**) Número de animales que reaccionaron a la MAT con dilución mínima 1:100 en la especie respectiva en distintos periodos.

6.3.2 Análisis Bacteriológico

De las 18 muestras de orina (8 caprinos y 10 ovinos) obtenidas en Marzo 2018, únicamente en una muestra de caprino se pudo observar la presencia y el movimiento característico de *Leptospira* mediante microscopía de campo oscuro. Esta observación se evidenció a partir de 4 días posteriores al cultivo. Esta muestra fue resembrada, previo filtración (0.45 μm), para su descontaminación e incubada a 29°C, realizando observaciones semanales hasta alcanzar una óptima concentración bacteriana. En esta muestra se determinó un crecimiento óptimo a partir de las 4 semanas de inoculación. De las 7 muestras (4 caprinos y 3 ovinos) de orina obtenidas en noviembre 2018, no se logró observar crecimiento de *Leptospira spp.* por lo que fueron consideradas como negativas.

6.3.3 Caracterización serológica

La cepa aislada del muestreo del cultivo de orina fue confrontada contra una batería de sueros previamente caracterizados por la presencia de aglutininas específicas contra todas y cada una de los serovares mostrados en la **Tabla 1**. Esta cepa reaccionó hacia sueros que reconocen a los serovares Hardjo y Tarassovi con títulos de 1:200 para ambos. Contra el resto de los sueros dirigidos contra otras serovares esta cepa no reaccionó. Ante la posibilidad de una coinfección o presencia de ambos serovares en la misma muestra de orina el aislado fue inoculado en medio de cultivo Fletcher sólido para lograr la separación de las cepas de *Leptospira*.

6.3.4 Cultivo en medio Fletcher sólido

El aislado de *Leptospira* en el segundo pasaje y resuspendido en el medio líquido de Fletcher fue filtrado (0.45 μm) previo a su inoculación en placas de petri con medio de Fletcher sólido. Se evidenciaron colonias, después de 7 días de incubación, de distintos tamaños, color y forma. De estas, fueron seleccionadas colonias típicas para su resiembra en medio líquido de Fletcher posterior a la observación en campo oscuro en una gota de medio de cultivo. Se permitió la incubación de 6 colonias, con morfología

y movimiento característico de *Leptospira*, durante 20 días y después fueron confrontados contra la batería de sueros anti-leptospira contra distintos serovares. De los 6 tubos 4 cepas reaccionaron contra el antisuero dirigido contra la serovariedad Hardjo y 2 contra la serovariedad Tarassovi; ambos con títulos de 1:200 en MAT.

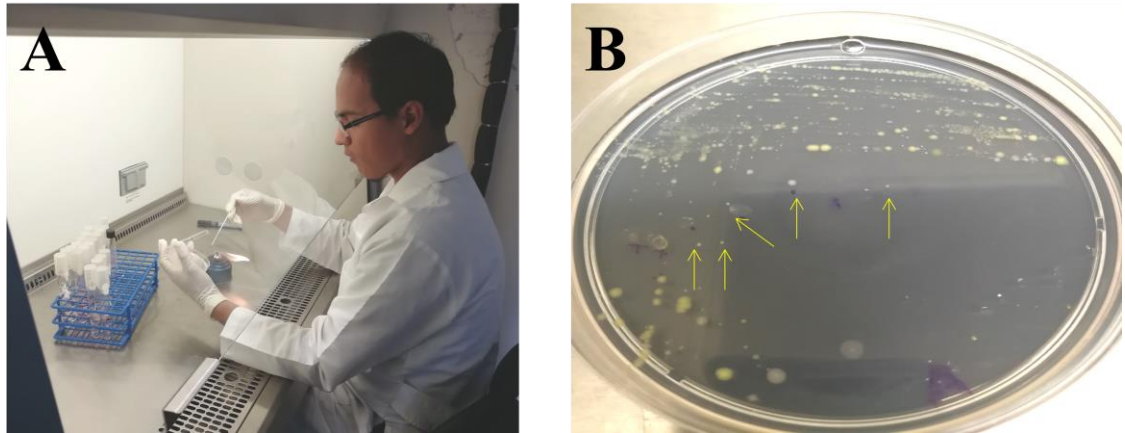


Figura 4. A) Resuspensión y siembra en medio de Fletcher sólido del aislado de *Leptospira* obtenido de la orina de un caprino. B). Después de 7 días de incubación se observó una variedad tamaño, color y forma de colonias bacterias. Fueron seleccionadas colonias típicas, mismas que fueron observadas en campo oscuro para evidenciar movimiento típico de *Leptospira* y subsecuentemente resembradas.

6.3.5 Detección molecular de la infección por *Leptospira* a partir de orina.

De las 18 muestras de orina obtenidas durante Marzo 2018 (8 caprinos y 10 ovinos) así como la muestra de *Leptospira* aislada, únicamente dos muestras amplificaron utilizando el gen *Sec Y*, siendo estas muestras correspondiente a la orina del animal del cual se obtuvo el aislamiento y el propio aislado (**Figura 5**). Posteriormente, una vez que se logró separar bacteriológicamente las dos serovariedades (Hardjo y Tarassovi) se volvió a realizar la prueba PCR para determinar si las colonias correspondían a *Leptospira* patógena utilizando el gen *Lip L32* resultando únicamente Hardjo positiva (**Figura 6**). Del periodo de Noviembre dentro del cual se obtuvieron 7 muestras de orina (4 caprinos

y 3 ovinos) ninguna muestra amplificó utilizando los primers para amplificar parte del gen *Sec Y*, así como tampoco con los primers para amplificar parte del gen *LipL32*. Dado lo anterior las muestras fueron consideradas negativas a la PCR.

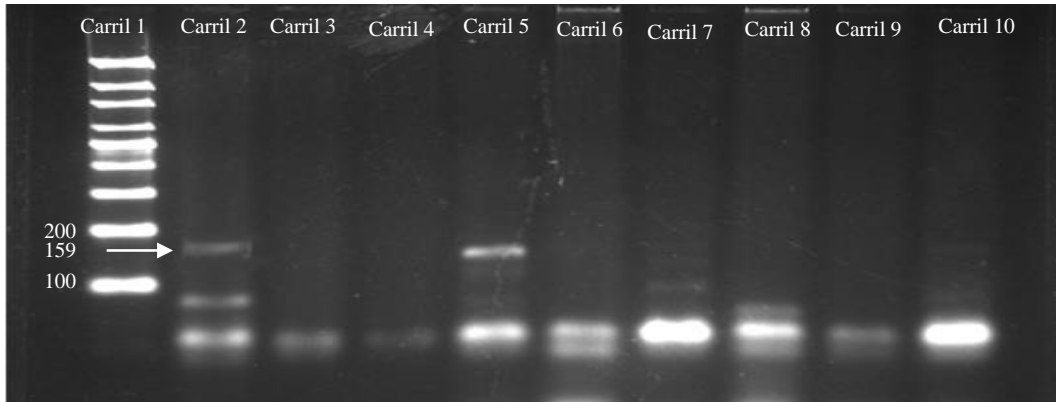


Figura 5. PCR para la amplificación del gen *sec Y* de *Leptospira* en muestras de orina de ovinos y caprinos procedentes de un hato con alta seroprevalencia de Nuevo León, México. Se amplificó un segmento de 159 pares de bases del gen *Sec Y* carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control (+) *Leptospira interrogans* serovar Hardjo; carril 3: control (-) H₂O; carril 4: orina cabra (-); carril 5 orina cabra (positiva), carril 6: cabra orina (-), carril 7: orina ovino (sospechoso), carril 8: orina ovino (-), carril 9: orina ovino (-), carril 10: orina ovino (+).

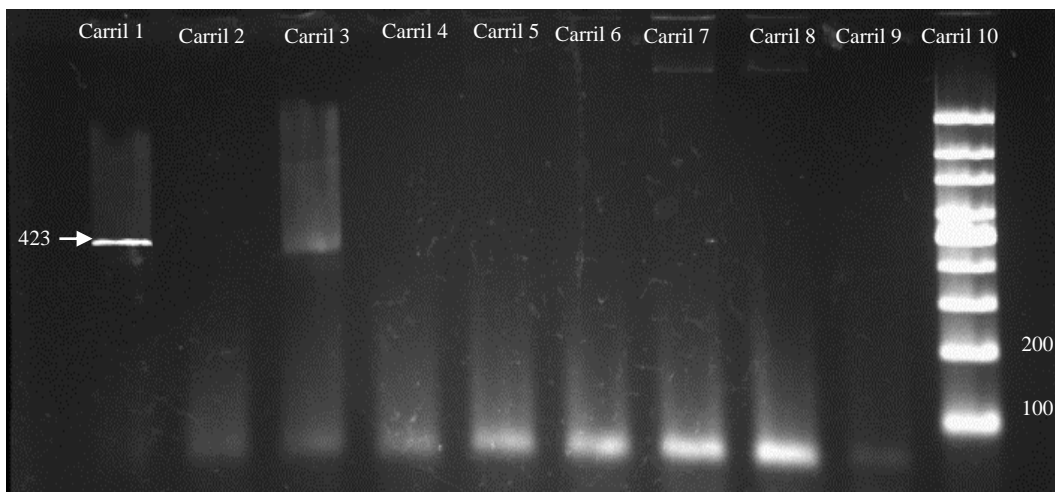


Figura 6. PCR para la amplificación del gen *LipL 32* (423pb) de *Leptospira* en muestras de cultivo de orina de ovinos y caprinos procedentes de un hato con alta seroprevalencia en Nuevo León, México. Carril 1: control (+) *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, carril 2: control (-) H₂O; carril 3: cultivo de orina de cabra serovar Hardjo (+); carril 4: cultivo de orina de cabra serovar Tarassovi (-); carril 5 cultivo de orina de cabra, carril 6: cultivo de orina de ovino (-), carril 7: cultivo de orina de ovino (-), carril 8: Cultivo de orina borrego (-), carril 9: cultivo de orina de ovino (-), carril 10: marcador de peso molecular.

6.4 ELISA de competencia para Lentivirus

Las muestras fueron ordenadas en pools de acuerdo al total de hatos muestreados teniendo 21 muestras de ovinos y 38 muestras de caprinos para un total de 59 muestras, las cuales 8 corresponden a hatos mixtos de ovinos y caprinos (cuatro ovinos y cuatro caprinos).

La prevalencia general de Lentivirus obtenida, independientemente de la especie animal fue 41 % (24/59).

Por especie animal, en ovinos, se observó una prevalencia general del 24 % (5/21). Mientras que en caprinos se observó una prevalencia general del 50 % (19/38).

Por DDR, en Anáhuac fue observado de manera general una seroprevalencia del 17 % (1/6). Por especie animal, en Anáhuac, en ovinos no hubo positivos mientras en caprinos se obtuvo una prevalencia del 33 % (1/6).

En Apodaca se obtuvo una prevalencia general del 39 % (7/18). Por especie animal, en ovinos, se observó una prevalencia del 18 % (2/11) mientras que en caprinos se observó una prevalencia del 71 % (5/7). En Montemorelos no obtuvieron resultados positivos.

En Galeana se obtuvo una prevalencia general del 43 % (10/23). Por especie animal, en ovinos, se observó una prevalencia del 50 % (1/2) mientras que en caprinos se observó una prevalencia del 43 % (9/21) (**Tabla 8**).

Al estudio se agregaron 4 hatos de caprinos de la región de la Laguna, evidenciándose seropositividad en 3 de los hatos, lo cual resultó en un 75% de seropositividad en este grupo de animales. No fue posible obtener muestras de ovinos para analizarse frente a Lentivirus (**Tabla 8**)

Tabla 8

Seropositividad contra Lentivirus en combinados de sueros de caprinos y ovinos acorde al tipo de hato por especie en el Noreste de México.

Región	Tipo de Hato	Seropositivos		Seronegativos		Total
Anáhuac	Caprino	1 (33.3)	16.7%	2 (66.7)	83.3%	6
	Ovino	0		3 (100.0)		
Apodaca	Caprino	5 (71.4)	38.9%	2 (28.6)	61.1%	18
	Ovino	2 (18.2)		9 (81.8)		
Montemorelos	Caprino	0	0	0	100.0%	5
	Ovino	0		5 (100.0)		
Galeana	Caprino	9 (42.9)	43.47%	12 (57.1)	56.5%	23
	Ovino	1 (50.0)		1 (50.0)		
Laguna	Caprino	3 (75.0)	75%	1(15.0)	15.0%	4
	Ovino	0		0		
Total	Caprino	18 (51.4)	37.5%	17 (48.6)	62.5%	56
	Ovino	3 (14.3)		18 (85.7)		

De los factores de riesgo analizados, siete fueron significativos en la presentación de Lentivirus en los diferentes hatos de pequeños rumiantes. Los factores destacados fueron: antecedentes de abortos, índice de preñez, animales con bajo peso al nacer, la ausencia del médico veterinario, además de medidas de bioseguridad como cuarentena, la especie caprina y la introducción de nuevos animales dentro del hato (**Tabla 9**).

Tabla 9

Factores de riesgo asociados a la presencia de Lentivirus en pequeños rumiantes de Nuevo León, México

Variable/Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor χ^2	P	Odds Ratio 95%
Antecedentes de abortos					38.0(7.11-203.0)
1	19	33.9			
0	7	12.5	26.2	<0.0001	
Índice de preñez < 50%					34.1(7.22-161.1)
1	16	28.6			
0	3	5.3	26.8	<0.0001	
Animales con bajo peso al nacer					32.9(7.29-148.6)
1	17	30.4			
0	4	7.1	27.1	<0.0001	
Ausencia del médico veterinario					27.4(5.31-141.8)
1	19	33.9			
0	9	16.1	22.0	<0.0001	
Ausencia de cuarentena					24.0(5.5-105.0)
1	18	32.1			
0	7	12.5	26.0	<0.0001	
Especie Caprina					6.4(1.6-25.2)
1	18	32.1			
0	17	30.4	7.7	0.0054	
No introduce nuevos animales					5.0(1.6-16.1)
1	14	25			
0	10	17.9	7.8	0.0053	
Introducción de nuevos animales					0.2(0.06-0.6)
1	7	12.5			
0	25	44.6	7.8	0.0053	
Explotación extensiva					0.2(0.05-0.6)
1	8	14.3			
0	27	48.2	8.5	0.0035	
Especie ovina					0.2(0.03-0.6)
1	3	5.4			
0	18	32.1	7.7	0.0054	
Presencia de cuarentena					0.04(0.0009-0.2)
1	3	5.3			
0	28	50.0	26.0	<0.0001	
Asistencia del médico veterinario					0.03(0.007-0.2)
1	2	3.6			
0	26	46.4	22.0	<0.0001	

1: Denota una respuesta afirmativa o positiva 0: Denota una respuesta negativa

* No existe asociación mediante Odds Ratio

Tabla 9

Factores de riesgo asociados a la presencia de Lentivirus en pequeños rumiantes de Nuevo León, México (Continuación)

Variable/Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor de χ^2	P	Odds Ratio 95%
Animales sin bajo peso al nacer					0.03(0.006-0.1)
1	4	7.1			
0	31	55.4	27.1	<0.0001	
Índice de preñez>50%					0.03(0.006-0.1)
1	5	8.9			
0	32	57.1	26.8	<0.0001	
Sin antecedentes de abortos					0.02(0.004-0.1)
1	2	3.6			
0	28	50	26.2	<0.0001	
Región Anahuac					*
1	1	1.8			
0	5	8.9	0.3	*	
Región Apodaca					*
1	7	12.5			
0	11	1.3	0.9	*	
Región Montemorelos					*
1	0	0.0	*	*	
0	5	8.9			
Región Galeana					*
1	10	17.9			
0	13	23.2	0.4	*	
Región Laguna					*
1	3	5.4			
0	1	1.8	0.1	*	
Sistema de producción lechera					*
1	14	25.0			
0	20	35.7	1.3	0.3	
Sistema de producción carne					*
1	7	12.5			
0	19	33.9	1.3	0.3	
Tamaño de hato 1-60					*
1	3	5.4			
0	10	17.9	1.5	0.2	
Tamaño de hato 61-100					*
1	9	16.1			
0	14	25.0	0.04	0.8	
Tamaño de hato 111-2000					*
1	9	16.0			
0	11	19.6	0.7	0.4	

1: Denota una respuesta afirmativa o positiva 0: Denota una respuesta negativa

* No existe asociación mediante Odds Ratio

Tabla 9

Factores de riesgo asociados a la presencia de Lentivirus en pequeños rumiantes de Nuevo León, México (Continuación)

Variable/Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Valor de χ^2	P	Odds Ratio 95%
Tipo de explotación intensivo					*
1	8	14.3			
0	1	1.8	12.1	0.0005	
Tipo de explotación semi-intensivo					*
1	5	8.9			
0	7	12.5	0.4	0.5	
Animales con retraso en el crecimiento					*
1	13	23.2			
0	17	30.4	0.9	0.3	
Animales sin retraso en el crecimiento					*
1	8	14.3			
0	18	32.1	0.9	0.3	

1: Denota una respuesta afirmativa o positiva 0: Denota una respuesta negativa

* No existe asociación mediante Odds Ratio

7 DISCUSIÓN

Los estudios epidemiológicos, dirigidos a detectar y conocer los factores de riesgo para la presencia en la población de agentes infecciosos multiespecie, son muy importantes para el diseño de políticas de salud animal enfocadas en prevenir o controlar las enfermedades provocadas por estos (Avalos-Ramírez, et al., 2010 (A); Michiels et al., 2018). En el noreste de México, los caprinos y ovinos son de trascendental importancia para la ganadería de la región dado que ambas especies son capaces de adaptarse a las diferentes condiciones agro-climas y de los agostaderos de esta zona y en ocasiones son la única actividad pecuaria productiva para los ganaderos (Avalos-Ramírez, et al., 2010 (B)). Entre otros factores, la productividad de los hatos de pequeños rumiantes del Noreste de México puede verse comprometida o está influenciada por la presencia de enfermedades infecciosas, particularmente aquellas que provocan infecciones lentas, latentes o crónicas (Avalos-Ramírez, et al., 2010 (B)). El presente estudio fue llevado a cabo con el propósito de conocer la frecuencia serológica y factores de riesgo asociadas a la presencia de *Leptospira* e infecciones por Lentivirus a nivel de hato de caprinos y ovinos de Nuevo León, México. Ambos agentes tienen la habilidad de infectar múltiples hospederos con efectos muy variados en todos y cada uno de estos por lo que su entendimiento epidemiológico en la zona noreste y de México en general es de importancia para preservar la salud y productividad de los animales afectados.

7.1 Leptospirosis

La detección de anticuerpos contra *Leptospira* spp. fue llevada a cabo en el suero de ovinos y caprinos sin antecedentes de vacunación y provenientes de los cuatro DDR del estado de Nuevo León. La serovariedad Hardjo es una cepa adaptada al bovino, persistiendo la infección por periodos largos (Adler, 2015). La presencia de anticuerpos contra esta cepa en pequeños rumiantes aparentemente indica un “salto interespecie” ocasionado por la interacción de bovinos, ovinos y caprinos. Sin embargo, se ha establecido que los pequeños rumiantes presentan una respuesta subclínica a esta serovariedad. Por lo que los convierte en portadores asintomáticos de la enfermedad

poniendo en riesgo la salud de otras especies susceptibles, incluyendo el ser humano (Vijayachari *et al.*, 2008).

Los ovinos y caprinos son mayormente susceptibles a las serovariedades Pomona, Bratislava e Icterohaemorrhagiae, causando los signos característicos de la enfermedad. Sin embargo, se observó que fueron muy pocos los animales seropositivos a estas serovariedades (Sanhueza *et al.*, 2017). El principal reservorio de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae son los roedores, los cuales suelen habitar en zonas donde las condiciones sanitarias son muy pobres (Vijayarachi *et al.*, 2008). Estos animales son oportunistas y aprovechan los desperdicios de los animales para alimentarse por lo que generalmente puede merodear en los lugares de almacenamiento del alimento y contaminarlo por medio de la orina (Adler & de la Peña, 210). En épocas de lluvia, las corrientes de agua suelen arrastrar las bacterias hasta los cuerpos de agua de donde beben los animales ya sean domésticos o silvestres, por lo cual éstos pueden infectarse y así continuar con el ciclo de diseminación. Es muy común que los animales silvestres interactúen con los animales domésticos con la consiguiente posibilidad de adquirir la infección. En la zona estudiada, algunos de los animales salvajes comunes son los jabalíes (*Sus scrofa*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y el coyote (*Canis latrans*) los cuales se han reportado como animales susceptibles a las serovariedades Bratislava, Pomona y Canicola e Icterohaemorrhagiae, respectivamente (Ellis, 2015; Garza, 2013; 2015).

En el presente estudio se encontró que el 60 % de animales seronegativos generaron una aglutinación a títulos de 1:50, Sin embargo, aunque estos animales fueron considerados como seronegativos, bajo ciertas condiciones es necesario revisar cual sería el punto óptimo de corte para considerar a las diferentes especies de rumiantes como positivas. Esto debido a las variaciones inherentes a la prueba y tipo de infección (aguda ó crónica), entre otros factores que pueden afectar la interpretación diagnóstica y por ende su aplicación en la epidemiología de la leptospirosis (Lilenbaum *et al.*, 2009; Adler & De la Peña, 2010).

El hato mixto de ovinos-caprinos estudiado analizado durante tres años mostró una dinámica serológica contrastante frente a diversos serovares de *Leptospira*. Si bien durante los dos primeros muestreos la seroprevalencia en el hato fue similar (55.3% vs 51.9%), la sero-reacción de los animales fue distinta; siendo que durante el primer muestreo (abril 2016) únicamente se encontró seroreacción contra Hardjo, Canicola y Pomona mientras que en el segundo muestreo (marzo 2018) se logró detectar además de Hardjo y Canicola la presencia de anticuerpos contra Tarassovi, Bratislava. En el tercer muestreo del hato mixto (noviembre 2018) se evidenció un aumento en la seroprevalencia así como en el rango de serovariedades detectadas. Por una parte los serovares Hardjo y Canicola se mantuvieron constantes pero los serovares Bratislava e Iceterohaemorrhagiae aumentaron considerablemente en su frecuencia de aparición. Lo anterior nos indica que, en un hato mixto infectado, ante un escenario de escasa Bioseguridad, la frecuencia serológica contra *Leptospira* puede variar así como la proporción de animales seropositivos hacia distintos serovares. Por otra parte, nos puede sugerir que las infecciones crónicas por *Leptospira* no muestran cambios aparentes en la signología clínica de los animales y ante la carencia de profilaxis y tratamiento dirigidos, permite que este tipo de infecciones se puedan seguir diseminando que inclusive permite el contacto con otras serovariedades hacia el hato. La seropositividad y factores de riesgo para la transmisión de *Leptospira* está por una multitud de factores entre los que destaca la humedad relativa del medio ambiente y precipitación pluvial (Pratt, N. and Rajeev, S., 2018). El hato mixto ovino-caprino mostró hacia el tercer muestreo un substancial aumento en la seropositividad contra *Leptospira* en general acompañada por un mayor y con una mayor dispersión de seroreactividad contra diversas leptospiros. La fecha (noviembre del 2018) de muestreo pudo haber influido en la seropositividad dado que hacia esa fecha de manera local durante el mes de septiembre (otoño) se registra la mayor precipitación pluvial y una humedad relativa (50-73 \pm 5) adecuada (Fuente: Centro de Biotecnología Reproductiva de la UGRNL) que persiste hasta la época de invierno. Estas condiciones micro-climáticas locales pueden favorecer la sobrevivencia de *Leptospira*, una mayor dispersión-movimiento de hospederos potencialmente infectados y mayor riesgo de infección a través del contacto directo o indirecto con los rumiantes ovinos y caprinos. El efecto del medioambiente sobre la seroprevalencia y

riesgo de infección por *Leptospira* ya ha sido recientemente confirmado en distintas partes del mundo y distintas especies animales (Simbizi, et al., 2016; Sohail, M.L., et al., 2018; Vitale, M., 2018; Topazio, J., et al., 2015).

En el hato mixto se tuvo la oportunidad de analizar bacteriológica y molecularmente muestras de orina solo durante el año 2018 (marzo y noviembre). Solo fue posible aislar, en la orina de un ejemplar caprino hembra durante el primer muestreo, los serovares de Hardjo y Tarassovi los cuales fueron confirmados mediante serología y PCR. No obstante, dos muestras de orina de dos ovinos resultaron como sospechosas y positivas directamente en el PCR. Esta muestra fue obtenida durante el segundo periodo de muestreo. Sin embargo, ninguna otra muestra durante el tercer muestreo resultó positiva al aislamiento o la detección molecular. El aislamiento en cultivos de *Leptospira* es la prueba de oro para detectar animales infectados (Ellis, 2015), no obstante es un proceso laborioso debido a diferentes factores que se tienen que cumplir para poder lograr el crecimiento óptimo y supervivencia de la bacteria *in vitro*. Debido a lo fastidioso del proceso, el uso de equipo y medios de cultivo especializado el aislamiento como proceso diagnóstico es raramente usado (Girault, et al., 2017). No obstante, se requiere desarrollar o innovar protocolos de cultivos que permita incrementar las probabilidades de aislamiento de cepas de campo para apoyar estudios de tipificación bacteriana, epidemiología, de patogenicidad y para actualizar la base de cepas usadas como bacterinas en la prevención basada en la vacunación con cepas locales o regionales (Arent, et al., 2013; Nally et al., 2018; Schuller, et al 2015). Para propósitos de prevención y control la detección temprana de leptospirosis es importante, siendo la técnica de PCR una herramienta útil con resultados confiables. Shafighi *et al.* (2014) obtuvieron un 43 % de positividad en orina de bovinos utilizando iniciadores específicos del gen *rrs* (16S) en Irán. Mientras que Chávez *et al.* (2018) en Nicaragua obtuvieron un 15 % de positividad en muestras de suero de bovino utilizando iniciadores dirigidos contra el gen *LipL32*. Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo un menor porcentaje de positividad mediante la técnica de PCR en comparación con la prueba de MAT, en el segundo muestreo. Es por eso que la prueba de MAT sigue continua como la prueba de rutina para estudios epidemiológico (Pratt and Rajev, 2018 ; Sabarinathsa et al., 2018; Simbizi, et al., 2016)

El aislamiento de *Leptospira* no sólo es un proceso laborioso, sino que también difícil debido a diferentes factores que se tienen que cumplir para poder lograr el crecimiento óptimo y supervivencia *in vitro*. El aislamiento obtenido en este trabajo demuestra la presencia y circulación de *Leptospira* en el hato. Además, que la presencia de animales silvestres que conviven directamente con estos animales sugiere que la bacteria puede propagarse a los hatos aledaños. Es por eso, que este estudio es útil para realizar estudios relacionados, que incluyan la prevalencia tanto en perros domésticos presentes en los hatos, como en los ganaderos que mantienen contacto directo con animales infectados.

Las prevalencias de *Leptospira* para los caprinos y los vinos fueron 15% y 12 %. Sin embargo, no se encontró diferencia entre estas especies.

Dentro de los Distritos de Desarrollo Rural, los animales en Apodaca presentaron mayor posibilidad (OR=2.34) de leptospirosis que los animales muestreados en Anáhuac y Montemorelos. Esto posiblemente debido a que, la región de Apodaca está representada por el área metropolitana de Monterrey, la cual es una región muy industrializada y con mayor presencia de trabajadores por hato. Además, es una región con gran movimiento de ganado tanto de exportación como de importación, y estar más en contacto con otros animales domésticos como bovinos, caninos, cerdos y animales silvestres como venados y jabalíes.

Galeana fue la región con el segundo mayor número de animales positivos a leptospirosis. Sin embargo, los ORs, indicaron que no se encontró diferencia entre DDR.

Dentro de los sistemas de producción, las explotaciones lecheras poseen 3.04 (CI_{95%} 2.00-4.16) más riesgo de infección con leptospiras que las explotaciones dedicadas a la producción de carne. Esto podría deberse principalmente a diferencias en el manejo en los sistemas de leche y carne. En los sistemas extensivos y de pastoreo, el riesgo de infección de un animal es 1.68 (CI_{95%} 1.11-2.55) veces mayor, debido al contacto constante que, en esos sistemas, se tiene con otros animales. En adición, como se mencionó anteriormente, el manejo por parte del granjero (aunque no se tomó en cuenta dentro de los factores de riesgo), puede influir directamente en la presencia de la enfermedad. Otro factor que afectó la prevalencia de *Leptospira* fue el tamaño de hato.

Se encontrándose que los hatos con más de 60 animales tuvieron 2.08 (IC95% 1.38-3.14) veces más riesgo de presentar infección por *Leptospira*.

La presencia de otras especies de animales domésticos como silvestres influye de manera significativa en la diseminación de leptospirosis dentro de los hatos de caprinos y ovinos. En este estudio, se demostró que la presencia de animales domésticos en los hatos tienen 2.49 (CI95% 1.58-3.94) veces más posibilidades de infecciones por *Leptospira*; encontrándose que, la presencia del bovino causa 6.96 (CI95% 4.43-10.93) más probabilidades de infección por *Leptospira* en los hatos caprinos y ovinos. Por otro lado, la presencia de animales silvestres aumenta 1.69 (CI95% 1.10-2.61) veces la probabilidad de infección, dentro del cual la presencia del jabalí causa 10.13 (CI95% 6.56-15.66) veces mayor probabilidad de infección por leptospirosis en los hatos de caprinos y ovinos. Sin embargo, en otro estudio realizado por Campos et al. (2017), establecen que el principal reservorio de *Leptospira* es el roedor. En esto también concuerdan Ellis (2015), Adler (2015), Santos et al (2013) y Adler & de la Peña (2010).

Se observó una asociación entre problemas reproductivos como abortos y bajo índice de preñez y los hatos con una alta tasa de positivos (**Tabla 5**). Los hatos con antecedentes de aborto tuvieron 1.89 (CI95% 1.27-2.82) veces mayor probabilidad de contraer una infección por leptospirosis y los hatos con un índice menor del 30% de preñez tuvieron 5.20 (IC95% 1.61-16.72) veces más riesgo de contraer leptospirosis que los hatos con mayor índice de preñez. Aunque los animales presentaran problemas reproductivos, los animales se observaban clínicamente sanos, lo que sugería una infección subclínica. Sin embargo, en este estudio se observó que la mayoría de los animales eran positivos a la serovariedad Hardjo perteneciente al serogrupo Sejroe, el cuál es una cepa adaptada a los pequeños rumiantes y es el principal causante de problemas reproductivos en animales clínicamente sanos (Martins & Lilenbaum, 2014).

Uno de los factores importantes en la circulación de *Leptospira* es la comercialización de los animales, la compra y venta de animales, así como el transporte y la introducción de nuevos animales a los hatos. La introducción de animales sanos a los hatos tiende a bajar la prevalencia (Jaramillo & Martinez 2010). Sin embargo, existen excepciones, cuando los animales llegan aparentemente sanos y se omiten las medidas de

bioseguridad, lo que facilita la entrada de infecciones al hato. En este estudio se observó que la introducción de nuevos animales causa 4.06 veces más riesgo de infección por leptospirosis que los hatos donde no introducen animales. Esto discrepa con el estudio realizado por Schoonman et al. (2010) el cuál observaron que la introducción de nuevos animales fue un factor protector.

Dentro de las medidas de bioseguridad observadas en los hatos, el proceso de cuarentenar a los animales infectados no fue significativo. Por otro lado, la asistencia del médico veterinario demostró ser un factor protector 0.41 (IC95% 0.27-0.62). Se ha reportado que, teniendo buenas prácticas de manejo del hato, así como la asistencia frecuente de un médico veterinario, puede afectar la seroprevalencia general además de la distribución de las diferentes serovariedades, aún cuando las prácticas no sean específicas contra leptospirosis, la seroprevalencia tiende a disminuir (Martins and Lilenbaum, 2017).

Los estudios serológicos de leptospirosis en los rumiantes pequeños tienen el potencial de identificar a los animales reactivos y las serovariedades más predominantes dentro del hato. Con esta información, se pueden elaborar programas de tratamiento y control disminuyendo, de esta manera, los niveles de contaminación bacteriana en el ambiente y evitando nuevas infecciones. A la leptospirosis se le ha considerado como una enfermedad profesional, asociada con labores de medicina, granja, hasta de rescate ante catástrofes naturales; por lo que futuros estudios deben enfocarse en el papel que juegan los pequeños rumiantes en la transmisión de leptospirosis en los humanos.

7.2 Lentivirus

Acorde a los resultados obtenidos en Lentivirus, la prevalencia en los caprinos fue 51%, siendo esta mucho mayor que la obtenida para los ovinos (14.29%). Por lo tanto, los caprinos tuvieron 6.35 veces más riesgo de infección por Lentivirus que los ovinos en el Noreste de México (**Tabla 9**).

Dentro de los distritos de desarrollo rural, se obtuvo una mayor prevalencia en la región de Coahuila 100%, seguido de Galeana 43%, Apodaca 39% y Anáhuac 17%, siendo la región de Montemorelos la que obtuvo la menor prevalencia general al no detectarse ningún animal positivo. Sin embargo, los datos obtenidos por Odds Ratio revela que no hay diferencia significativa entre las prevalencias por DDR. Por lo que, en Nuevo León, el DDR no actúa como un factor de riesgo de Lentivirus de los pequeños rumiantes en los hatos.

En cuanto a los sistemas de producción tampoco se encontró asociación entre las prevalencias y los sistemas productivos de leche y de carne. Sin embargo, Rowe et al. (1997) afirman que existe mayor riesgo en explotaciones dedicadas a la industria lechera, debido a que los animales tienen mayor duración de vida productiva, además de que las infecciones por Lentivirus tienden a ser de carácter crónico.

La cantidad de animales dentro de un hato es un factor muy importante debido a que la vía de transmisión de este virus es por contacto directo entre animales infectados; sin embargo, en el presente estudio, no se encontró asociación entre el tamaño de hato y la prevalencia. No obstante, hay estudios en los que se reporta que el tamaño de hato sí influye. Junkuzew et al. (2016) observaron que los hatos con 70 o más animales tenían 3.09 veces mayor predisposición a padecer Lentivirus que los hatos con menor número de animales.

Dentro de los tipos de explotación, Brulisauer et al. (2005) mencionan que los animales sujetos a sistemas intensivos y semi intensivos poseen 4.21 veces y 2.21 veces más riesgo de infección por Lentivirus que los sistemas extensivos, esto debido al constante hacinamiento que los primeros sistemas utilizan. Sin embargo, en este trabajo no se encontró asociación entre la prevalencia y los sistemas de producción intensiva y semi intensiva. Por otro lado, se observó que los sistemas de explotación extensivas reducen 0.18 (0.05-0.59) veces el riesgo de infección por Lentivirus en los hatos de caprinos y ovinos, por lo que este actúa como un factor protector de esta enfermedad.

Se observó una asociación entre problemas reproductivos y la circulación de Lentivirus en los pequeños rumiantes. Los animales con antecedentes de aborto tuvieron 38 (7.11-

203.0) veces más probabilidades de infección por Lentivirus que los hatos donde no es frecuente este problema. Los hatos con índice de preñez menor al 50 % tuvieron 34.13 (7.22-161.1) veces mayor probabilidad de seropositividad a Lentivirus que los hatos con un mayor índice de preñez. Además, los hatos con animales con antecedentes de bajo peso al nacer estuvieron 32.93 (7.29-148.6) veces más a riesgo de una infección por Lentivirus.

Otro elemento determinante de la circulación de Lentivirus de los pequeños rumiantes es la introducción de nuevos animales dentro del hato. Brulisauer et al. (2005) encontraron que los hatos que habían adquirido animales de otros hatos, dentro de un periodo de dos años, eran 3.46 veces más susceptibles a infección por Lentivirus que los hatos que no habían adquirido nuevos animales. Sin embargo, en este estudio se encontró que los hatos que habían adquirido animales con anticuerpos eran 0.20 veces más susceptibles que los hatos que no habían adquirido animales, actuando como un factor protector. Los animales con anticuerpos específicos, aportan una mayor protección frente a la infección en los hatos. Pero esto no se debe de tomar como un hecho, debido a que algunos animales pueden actuar como portadores del virus diseminándolo en el hato.

Las medidas de bioseguridad empleadas en los diferentes hatos de la región tuvieron una asociación directa en la circulación del virus. La medida de cuarentena actuó como un factor de protección (OR=0.04), así como la presencia del médico veterinario (OR=0.03). Según Junkuszew et al. (2016), la presencia del médico veterinario así como el número de empleados y años de experiencia en el manejo dentro de los hatos está estrechamente relacionado con la presencia y circulación del virus. También mencionan que la presencia de otros animales domésticos dentro del hato disminuye drásticamente la circulación del virus. La ausencia de estas medidas de bioseguridad aumenta en gran medida la presencia de la infección por Lentivirus en los pequeños rumiantes. Por eso, es necesario concientizar a los productores sobre este agente, así como darle a conocer las medidas de prevención, como la vacunación, descontaminación, cuarentena y vías de ingreso a los hatos; además, de los manejos necesarios para aminorar la circulación del virus.

Se encontró asociación ($P < 0.05$) entre la prevalencia de *Leptospira* spp. y Lentivirus, esto sugiere que ambos agentes patógenos pueden estar presentes simultáneamente en los pequeños rumiantes dentro de un área con condiciones climáticas y de manejo similares. Sin embargo, es necesario realizar estudios para saber si existe una sinergia o si estos dos agentes compiten dentro del animal.

Al realizar la comparación entre las regiones estudiadas (Nuevo León y Coahuila) no se encontró una asociación entre las prevalencias ($P > 0.05$) por lo que se puede deducir que no hay diferencias entre las variables que permiten la presencia y circulación tanto de *Leptospira* spp. como de Lentivirus en los pequeños rumiantes de dichas regiones.

Según el autor de este trabajo, este es el primer reporte de *Leptospira* spp y Lentivirus de los pequeños rumiantes en el Noreste de México. Los resultados serológicos y moleculares sugieren fuertemente la presencia y circulación de estos dos agentes en los diferentes hatos de ovinos y caprinos en esta zona del país. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para conocer el papel que tienen los pequeños rumiantes en la epidemiología de serovariedades de *Leptospira* ya sea en estas u otras especies animales. Por otra parte, y dado el potencial zoonótico que posee *Leptospira*, es necesario determinar el papel que eventualmente pueden tener en la salud pública, principalmente en las zonas rurales, teniendo en cuenta la posible contaminación de agua alimento y contacto directo con excreciones contaminadas a partir de animales infectados crónicamente

Desde otra perspectiva, y dada su presencia, su amplia diseminación y relativa alta seropositividad en los hatos de rumiantes pequeños de esta zona del país sería importante esclarecer los efectos económicos que tanto *Leptospira* como Lentivirus podrían actualmente estar provocando a los caprinocultores y si esto se refleja en otras partes de México. Por lo que es necesario, realizar estudios similares en el resto de país para conocer no solo la situación epidemiológica de estos agentes infecciosos sino que, ante la nula aplicación de protocolos de bioseguridad, permitan establecer las bases del control y erradicación de estas infecciones y sus consecuencias.

8. CONCLUSIÓN

Se encontraron seroprevalencias relativamente baja para *Leptospira* y alta a Lentivirus de pequeños rumiantes en hatos caprinos y ovinos del Noreste de México. Se identificaron las serovariedades de *Leptospira* circulantes en los hatos de esta región. También se demostró mediante el aislamiento bacteriano y PCR la presencia de *Leptospira* patógenas (*Leptospira interrogans* serovar Hardjo y Tarassovi) y coinfectado a un ejemplar caprino hembra dentro de un hato mixto ovino-caprino. Por lo que se puede inferir que la infección por *Leptospira* puede persistiendo de forma crónica en estos animales, mismos que pueden actuar como reservorios de la bacteria y transmitirla a otros animales domésticos y silvestres con los que puedan tener contacto, incluyendo el ser humano. Es factible que el manejo y falta de programas de bioseguridad hayan influido en la alta seroprevalencia de Lentivirus de pequeños rumiantes en la región. Por lo que, es necesario asesorar a los productores acerca de la importancia de estas enfermedades, así como establecer estrategias de control y prevención, incluyendo la vacunación de los animales, enfocados principalmente en reforzar la prevención.

9. Referencias

- Adler, Ben & de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140: 287–296.
- Adler, B., 2015. Current Topics in Microbiology and Immunology : *Leptospira* and Leptospirosis, Fourth. ed, Archives of Neurology. Springer, New York.
- Alstom J, Broom J (1958) Leptospirosis in man and animals. E&S Livingstone, Edinburgh
- Arent, Z.J., Andrews, S. Adamama-Moraitou, K., Gilmore, C. Pardali, D., Ellis W.A. 2013. Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? *Epidemiol. Infect.* **141**:1148-1153
- Atherstone C, Picozzi K, Kalema-Zikusoka G. 2014. Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in cattle and African buffaloes in Southwestern Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 90(2): 228-290.
- Avalos-Ramírez, R., Cedillo-Rosales, S., Salinas-Meléndez, J.A., Morales-Loredo, A., Cervantes-Vega, R., Domínguez-Díaz, D. , Alvarez-Ojeda, G. 2010.(A) Bioseguridad en hatos caprinos: Protocolos aplicados en majadas de Nuevo León. Consorcio Técnico del Noreste de México, A.C., Nuevo León , México. ISBN: 978-607-9154-01-1
- Avalos-Ramírez, R., Cedillo-Rosales, S., Salinas-Meléndez, J.A., Morales-Loredo, A., Cervantes-Vega, R., Domínguez-Díaz, D. , Alvarez-Ojeda, G. 2010. (B) Parasitosis y Enfermedades comunes de caprinos en majadas de Nuevo León: Prevalencia y descripción. Consorcio Técnico del Noreste de México, A.C., Nuevo León , México. ISBN: 978-607-9154-02-8,
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2003. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3: 757–771.

- Blacklaws, B.A., 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 259–269.
- Brulisauer F, Vogt H, Perler L, Rufenacht J. 2005. Risk Factors for the infection of Swiss goat herds with small ruminant lentivirus: a case-control study.
- Campos, Â.P., Miranda, D.F.H., Rodrigues, H.W.S., da Silva Carneiro Lustosa, M., Martins, G.H.C., Mineiro, A.L.B.B., Castro, V., Azevedo, S.S., de Sousa Silva, S.M.M., 2017. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 49: 899–907.
- Carruth, L.M., Morse, B. a, Clements, J.E., 1996. The leucine domain of the visna virus Tat protein mediates targeting to an AP-1 site in the viral long terminal repeat. *J. Virol.* 70: 4338–4344.
- Castiblanco-Valencia, M.M., Fraga, T.R., Silva, L.B. Da, Monaris, D., Abreu, P.A.E., Strobel, S., Józsi, M., Isaac, L., Barbosa, A.S., 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J. Infect. Dis.* 205: 995–1004.
- Centro de Biotecnología Reproductiva Bovina de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León (2018). [Unidad de Monitoreo Ambiental de temperatura, precipitación pluvial y humedad relativa]
- Clements, J.E., Christine Zink, M., 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 100–117.
- Cochrane, A.W., Chen, C.H., Rosen, C.A., 1990. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1198–1202.

- Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9
- Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B., 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 291–318.
- Cullen, P.A., Haake, D.A., Bulach, D.M., Zuerner, R.L., Adler, B., 2003. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immun.* 71: 2414–2421.
- Dalziel, R.G., Hopkins, J., Watt, N.J., Dutia, B.M., Clarke, H.A.K., McConnell, I., 1991. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J. Gen. Virol.* 72: 1905–1911.
- Daud A, Fuzi N, Arshad M, Kamarudin S, Mohammad W, Amran F, Ismail N (2018) Leptospirosis seropositivity and its serovars among cattle in Northeastern Malaysia, *Vet World*
- De Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 107: 49–62.
- Dos Santos Paixão, M., Alves-Martin, M.F., Tenório, M. da S., Starke-Buzetti, W.A., Alves, M.L., da Silva, D.T., Ferreira, A.G., e Silva, M.F., Sousa, L.O., Lucheis, S.B., 2014. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. *Prev. Vet. Med.* 115: 69–73.
- Elder, J.H., Lerner, D.L., Hasselkus-Light, C.S., Fontenot, D.J., Hunter, E., Luciw, P.A., Montelaro, R.C., Phillips, T.R., 1992. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *J. Virol.* 66: 1791–4.
- Ellis, W.A., 1994. Leptospirosis as a Cause of Reproductive Failure. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 10: 463–478.

- Extramiana A, Gonzales L, Cortabarría N, García M, Juste R. 2002. Evaluation of a PCR technique for detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk, and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rum Res.* 44: 109-106.
- Fernandes, L.G. V, Vieira, M.L., Kirchgatter, K., Alves, I.J., de Morais, Z.M., Vasconcellos, S.A., Romero, E.C., Nascimento, A.L.T.O., 2012. Omp11 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. *Infect. Immun.* 80: 3679–3692.
- Ganter, M., 2015. Zoonotic risks from small ruminants. *Vet. Microbiol.* 181: 53–65.
- García N. 2011. Estudio Epidemiológico de Leptospirosis Caprina en la región Lagunera del estado de Coahuila. Tesis Presentada como requisito parcial para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Autónoma Antonio Narro, Torreón Coahuila, México.
- Gdovin, S.L., Clements, J.E., 1992. Molecular mechanisms of visna virus Tat: Identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a post-transcriptional effect. *Virology* 188: 438–450.
- Gigli, I, Fujita, T, and Nussenzweig, V., 1979. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Am.J.Physiol* 273: 883–892.
- Girault,D., Soupe-Gilbert, M.E., Geroult, S. Colot, J. Goarant, C.. 2017. Isolation of *Leptospira* from blood culture bottles *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 88 (2017), pp. 17-19
- Gonzales E. 2003 Estudio Epidemiológico y factores de riesgo de leptospirosis caprina en el estado de San Luis Potosí. tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Producción Agrícola. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano, San Luis Potosí, México.

- Guernier, V., Goarant, C., Benschop, J., Lau, C.L., 2018. A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity, PLoS Neglected Tropical Diseases.
- Huebener R (1915) Beitrage Zur Aetiologie der Weischen Krankheit . MitT I. Deut Med Wochenschr. 41: 1275.
- Huthoff, H., Towers, G.J., 2008. Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5 α . Trends Microbiol. 16: 612–619.
- Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H (1916) The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). J Exp Med 23:377-402.
- Inada R, Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H (1917) The rat as a carrier of *Spirocheta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Spirochaetosis Ichterohaemorrhagica. J Exp Med 23:377-402
- Jauregui, P., Crespo, H., Glaria, I., Lujan, L., Contreras, A., Rosati, S., de Andres, D., Amorena, B., Towers, G.J., Reina, R., 2012. Ovine TRIM5 Can Restrict Visna/Maedi Virus. J. Virol. 86: 9504–9509.
- Junkuszew A, Dudko P, Bojar W, Olech M, Osinski Z, Gruszecki T, Kania M, Kuzmak J, Czerski G. 2016. Risk Factors associated with small ruminant lentivirus in eastern Poland sheep flocks. Prev Vet Med. 127: 44-49
- Kitamura H, Hara. Ueber der Erreger von "Akiyami", Tokyo Med J. 2056/2057
- Larson, C.R., Dennis, M., Nair, R. V., Llanes, A., Peda, A., Welcome, S., Rajeev, S., 2017. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni from a dog from Saint Kitts. JMM Case Reports 4: 1–5.
- Lee, S.H., Kim, S., Park, S.C., Kim, M.J., 2002. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore -Forming Protein on Mammalian Cells. Infect. Immun. 70: 315–322.

- Legastelois, I., Cottin, V., Mornex, J.F., Cordier, G., 1997. Alveolar macrophages from sheep naturally infected by visna-maedi virus contribute to IL-8 production in the lung. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59: 131–139.
- Leroux C, Lerondelle C, Chastang J, Mornex J. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. 28: 115-121
- Lo, Y.Y., Hsu, S.H., Ko, Y.C., Hung, C.C., Chang, M.Y., Hsu, H.H., Pan, M.J., Chen, Y.W., Lee, C.H., Tseng, F.G., Sun, Y.J., Yang, C.W., Pan, R.L., 2013. Essential calcium-binding cluster of *Leptospira* LipL32 protein for inflammatory responses through the Toll-like receptor 2 pathway. *J. Biol. Chem.* 288: 12335–12344.
- Luna M, Socci G, Morales J, Oliveros J, Luna E. 2018. Anticuerpos contra *Leptospira* spp. en caprinos lecheros en Guanajuato, México. *Rev Investig Vet Perú.* 29(2): 611-618.
- Martins, G., Lilenbaum, W., 2017. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. *Res. Vet. Sci.* 112: 156–160.
- Martins, G., Lilenbaum, W., 2014. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. *Trop. Anim. Health Prod.* 46: 11–17.
- Mazarin, V., Gourdou, I., Querat, G., Sauze, N., Audoly, G., Vitu, C., Russo, P., Rousselot, C., Filippi, P., Vigne, R., 1990. Subcellular localization of rev-Gene product in visna virus-infected cells. *Virology* 178: 305–310.
- Michel Pépin, Christian Vitu, Pierre Russo, Jean-François Mornex, Ernst Peterhans. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research, BioMed Central*, 1998, 29 (3-4), pp.341-367
- Michiel, R., Van Mael, E., Quinet, Ch., Welby, S., Cay, A.B. 2018. Seroprevalence and risk factors related to small ruminant lentivirus infections in Belgian sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine* 151:13-20.

- Minguijón, E., Reina, R., Pérez, M., Polledo, L., Villoria, M., Ramírez, H., Leginagoikoa, I., Badiola, J.J., García-Marín, J.F., de Andrés, D., Luján, L., Amorena, B., Juste, R.A., 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbiol.* 181: 75–89.
- Oliveira, F.C., Azevedo, S.S., Pinheiro, S.R., Batista, C.S., Moraes, Z.M., Souza, G.O., Gonçalves, A.P., Vasconcellos, S.A., 2010. Risk factors associated with leptospirosis in cows in the state of Bahia, Northeastern Brazil [Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil]. *Pesqui. Vet. Bras.* 30: 398–402.
- Palaniappan, R.U.M., Chang, Y., Artiushin, S., Timoney, J.F., McDonough, S.P., Barr, S.C., Divers, T.J., Simpson, K.W., McDonough, P.L., Mohammed, H.O., Jusuf, S.S.D., 2002. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans* Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans* 70: 5924–5930.
- Parma, A.E., Seijo, A.C., 2004. Recommendations for the detection of. *Society* 37: 131–134.
- Patra, K.P., Choudhury, B., Matthias, M.M., Baga, S., Bandyopadhyaya, K., Vinetz, J.M., 2015. Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. *BMC Microbiol.* 15: 244.
- Peña J. Estudio Epidemiológico de leptospirosis caprina en la zona del estado de Veracruz. 2012. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de Maestro en Ciencia Animal. Universidad Veracruzana, Veracruz, Veracruz, México.
- Pisoni, G., Bertoni, G., Manarolla, G., Vogt, H.R., Scaccabarozzi, L., Locatelli, C., Moroni, P., 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology* 407: 91–99.
- Pratt, N., Rajeev, S. 2018. *Leptospira* seroprevalence in animals in the caribbean region: A Systematic review. *Acta Tropica.* 182:34-42.

- Prescot F, Miller R, Nicholson V, Martin S, Lesnick T. 1988. Seroprevalence and with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Can J Vet Res.* 52(2): 210-215.
- Ramírez, H., Reina, R., Amorena, B., de Andrés, D., Martínez, H.A., 2013. Small ruminant Lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis, *Viruses.* 5:1175-1207.
- Rimstad E, East N, Torten M, Higgins J, de Rock E, Pedersen N. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infections in goats *Am Vet Res.* 54 (11): 1858-1862.
- Reddy P, Sapp W, Heneine W. 1993. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 31(11): 3042-3043
- Rosati S, Kwang J, Keen J. 1995. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Vet Diagn Invest.* 7: 437-443.
- Sabarinath, T., Behera, S.K., Deneke, Y., Atif Ali, S., Kaur, G., Kumar, A., Kumar, G.R., Kumar, K.S., Sinha, D.K., Verma, M.R., Srivastava, S.K., Chaudhuri, P., 2018. Serological evidence of anti-*Leptospira* antibodies in goats in various agro climatic zones of India. *Small Rumin. Res.* 169: 74–80.
- Sanhueza J, Heuer C, Wilson P, Benschop J, Collins-Emerson J. 2017. Seroprevalence and Risk factors for *Leptospira* Seropositivity in Beef cattle, Sheep and Deer Farmers in New Zeland. *Zoonoses Public Hlth.* 64 (5): 370-380.
- Schuller, S. Francey, T. Hartmann, K. Hugonnard, M. Kohn, B. Nally, J.E. Sykes, J. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.*, **56**:159-179.
- Segura-Correa J.C. y Honhold N. 2000. Métodos de muestreo para la producción y salud animal. Universidad Autónoma de Yucatan. Mérida, Yucatán, México. 142pp.

- Segura-Correa V, Solis-Calderon J, Segura-Correa J. 2003. Seroprevalence and risk factors for leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico. *Tropical Animal Health Production*. 35(4): 293-299.
- Shafighi, T., Zahraei Salehi, T., Abdollahpour, G., Asadpour, L., Akbarein, H., Salehzadeh, A., 2014. Molecular detection of *Leptospira* spp. in the urine of cattle in northern Iran. *Iran. J. Vet. Res.* 15: 402–405.
- Simbizi, V., Saulez, M.N., Potts, A. Lötter, C., Gummow, B. (2106). A study of Leptospirosis in South African horses and associated risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*. 134:6-15.
- Sohail, M.L., Khan, M.S., Ijaz, M., Naseer, O., Fatima, Z., Ahmad, A.S., Ahmad, W. (2018). Seroprevalence and risk factor analysis of human leptospirosis in distinct climatic regions of Pakistan. *Acta tropica*. 181:79-83.
- Stimson A (1907) Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Pub Health rep (Washington)* 22: 541.
- Stormann, K.D., Schlecht, M.C., Pfaff, E., 1995. Comparative studies of bacterially expressed integrase proteins of caprine arthritis-encephalitis virus, maedi-visna virus and human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 76: 1651–1663.
- Travassos C, Benoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. 1999. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum. Res.* 32: 101-106.
- Uhlenhuth P, Fromme W (1915) Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit. *Med Klin (München)* 44:1202.
- Topazio, J., Tonin, A.A., Machado, G., Noll, J.C.G., Ribeiro, Moura, A., B., Carmo, G.M., Grosskopf, H.M., Martins, J.L.R., Badke, R.T., Stefani, L.M., Lopes, L.S., Da Silva, A.S. 2015. Antibodies to *Leptospira interrogans* in goats and risk factors of the disease in Santa Catarina (West side), Brazil. *Research in Veterinary Science*. 99:53-57.

- Toohey, K.L., Haase, A.T., 1994. The rev gene of visna virus is required for productive infection. *Virology*. 200: 276-280.
- Tung, J.Y., Yang, C.W., Chou, S.W., Lin, C.C., Sun, Y.J., 2010. Calcium binds to *LipL32*, a lipoprotein from pathogenic *Leptospira*, and modulates fibronectin binding. *J. Biol. Chem.* 285: 3245–3252.
- Turelli, P., Pétursson, G., Guiguen, F., Mornex, J.F., Vigne, R., Quérat, G., 1996. Replication properties of dUTPase-deficient mutants of caprine and ovine lentiviruses. *J. Virol.* 70: 1213–1217.
- Van Manen, D., Rits, M.A.N., Beugeling, C., Van Dort, K., Schuitemaker, H., Kootstra, N.A., 2008. The effect of Trim5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 4.
- Van Thiel P (1948) The leptospiroses. Universitaire Pers Leiden, Leiden.
- Vitale, M., Agnello, S., Chetta M., Amato, B., Vitale, G., Bella, C.D., Vicari, D., Presti, V.D.M.L. 2018. Human leptospirosis cases in Palermo Italy. The role of rodents and climate. *Journal of Infection and Public Health.* 11:209-214.
- Wagter L, Jansen A, Bleumink- Pylum N, Lenstra J, Houwers D, PCR detection of lentiviral GAG segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet Res Commun.* 1998. 22:355-362.
- Weil A (1886). Ueber Einer eigenhuemliche, mit Miltumor, Icterus un Nephritis einhergende, acute infektiionskrankheit. *Deutsch Arch Klin Med* 39:209.
- Whaley, B.Y.K., Ruddy, S., 1976. Modulation of the alternative complement pathway by β 1H globulin. *J. Exp. Med.* 144: 1147–1163.
- Yang, C.-W., 2007. Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney Int.* 72: 918–925.

ANEXO

ENCUESTA

Fecha _____

El presente documento tiene la idea de recabar información referente al manejo en general, así como aspectos de manejo reproductivo y sanitario que afectan la productividad del rancho. La información que se obtenga, pretende detectar factores de riesgo, además de aportar ideas para mejorar la salubridad y productividad del Rancho. **Toda Información Recolectada Es Confidencial**, solo será utilizada para fines de investigación y con el debido consentimiento de los dueños del rancho

Nombre del Rancho: _____

Ubicación: _____

Especie Animal con la que trabaja: Caprino Ovino Ambas

¿Identifica su rebaño? Si No

1.Total de Animales dentro del rancho: Hembras___ Sementales___ ≤1 año: H___ S___

2.Sistema de Producción: a) Carne b) Leche c) Otro: _____

3.Tipo de Explotación: a) Pastoreo b) Semi-pastoreo c) Intensivo

4.¿Coexisten otros animales domésticos en su rancho? Si No

¿Qué animales tiene? Bovinos_____ Cerdos_____ Otros_____

5.¿Sabe si existen animales silvestres dentro de su predio o en sus alrededores?
Si No

Si la Respuesta es “Si” ¿Que animales? Jabalí Venado Otros_____

6.¿Vacuna contra enfermedades? Si No

7.¿Qué enfermedades? _____

8.¿Los problemas que afectan la reproducción en su rancho son muy frecuentes?
Si No

9.¿Las hembras son cruzadas por monta o inseminación?, ¿Cuántas quedan preñadas? _____

10.¿Cantidad de abortos en el rancho?: Este año___ Año pasado___ No sabe___

11.Los abortos en sus animales ¿En qué periodo de la gestación suceden?

a) (0-1 mes) b) (2-3 meses) c) (4-5 meses) d) No Sabe

12.¿Cuáles son los animales que más abortan?

Hembras primera monta

Hembras > 1 parto

No sabe

13.¿Cuándo hay abortos cual es el destino de las placentas y fetos abortados?

- a) Los quema o entierra b) No se recogen c) Otro_____

14.De los corderos/ cabritos recién nacidos ¿cuántos mueren?

- a) Menos del 10% b) Entre el 10 y 20% c) Mas del 20%

15.¿Cuál es la causa más común de abortos en su rancho?

16.En sus Animales ¿Qué edad presenta más enfermedades?

- a) Menores de 1 año b)1-2 años c) Mayor a 2 años

	De las siguientes practicas sanitarias y de manejo ¿Cuáles realiza en su rancho?	Si	No	A Veces	Nunca
17	Utiliza una aguja por animal				
18	Aísla a sus animales enfermos				
19	Restringe la entrada de visitantes a su rancho				
20	Separa las hembras que van a parir antes de la fecha de su parto				
21	Envía al laboratorio muestras de animales que abortan o mueren para saber la causa de aborto o muerte				
22	¿Ha observado y/o registrado bajos pesos al nacer los animales?				
23	¿Ha observado retraso en el desarrollo de algunos de sus animales destetados?				
24	¿Ha observado malformaciones de los animales recién nacidos?				
25	¿Separa a los animales destetados de acuerdo a la edad?				
26	¿Lava y desinfecta los instrumentos antes de usarlos?				
27	¿Ha introducido nuevos machos o hembras a su rancho?				
28	¿Cuarentena y realiza pruebas de laboratorio a				

	nuevos animales que ingresan para detectar enfermedades?				
29	Tiene un Médico Veterinario exclusivo en su rancho				