



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**

**PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS  
CANINA EN LA CIUDAD DE CATACAMAS OLANCHO  
UTILIZANDO LA TECNICA DE MICRO-AGLUTINACION  
11 DE MARZO AL 24 DE JULIO, 2009**

**Trabajo de graduación**

**Autor**

**MARIANA AMAYA ALVARADO**

**Asesores**

**Msc. MAURICIO SILVA  
Msc. DELEANA VANEGAS  
Msc. CARLOS RUIZ**

**Managua, Nicaragua, Diciembre, 2009**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL**  
**MEDICINA VETERINARIA**

**PREVALENCIA DE LEPTOSPIROSIS CANINA EN LA CIUDAD DE  
CATACAMAS, OLANCHO, UTILIZANDO LA TECNICA DE  
MICROAGLUTINACION (MAT)  
11 DE MARZO – 24 DE AGOSTO, 2009**

**Autor:**

**MARIANA AMAYA ALVARADO**

**Asesor principal:**

**Msc. MAURICIO SILVA**

**Managua, Nicaragua- diciembre, 2009**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis primeramente a Dios, por prestarme la vida y regalarme sabiduría y paciencia.

A mi madre y padre por siempre confiar en mí sobre todo por apoyarme incondicionalmente, los amo.

A mis hermanos, los mejores del mundo: Lenin Amilcar, Darwin Isaac, y Stalin José todos Amaya Alvarado. Por estar siempre dispuestos a colaborar.

A mi pequeño sobrino que tanto quiero, Isaac Alejandro Amaya Santos.

A mis abuelos y resto de la familia.

A mi tía Odilia Alvarado Euceda, (QDDG) siempre estará en mi corazón.

A mi misma por ser este momento tan esperado en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitirme culminar mis estudios.

A mis padres y hermanos por su apoyo siempre para con migo.

A mi asesores MSC. Mauricio Silva, MSC. Deleana Vanegas, y MSC. Carlos Ruiz. Por ser mis orientadores en este proceso de tesis.

Agradezco de gran manera a la microbióloga de los laboratorios del IHIMV por su fina atención y colaboración en el laboratorio durante las prácticas de mi tesis.

Al profesor Lázaro Morejón por ser más que un maestro. Ser un amigo.

A la Dra. Mireya Lamping por sus consejos.

Al Dr. William Oporto por compartir sus experiencias laborales con migo.

A la Ing. Rosa Rodríguez, mi maestra y amiga.

A mi profesor de deportes por su apoyo y amistad, Lic. Sergio Ramírez.

Al Ing. Alberto Cediles por brindarme su apoyo al inicio en la carrera de Veterinaria.

A mis compañeros de pasantillas, realizadas en Honduras; Verónica, Irma, Noel, Naun y José Noel.

A mis compañeros y amigos, Eliezer Cabrera y Thesla Uriarte, por estar en las buenas y en las malas.

A mi amiga Julia Mayela Sánchez por ser como esa hermana que nunca tuve y brindarme su incondicional amistad en todo.

A Willie Molina Hernández por ser esa persona especial y alentadora.

A la familia Navas- Hernández, por tomarme como parte de ellos.

A la señora Moraima Miranda por abrirme las puertas de su casa con toda confianza.

## **INDICE DE CUADROS**

- Cuadro.1. Frecuencia para edades de los caninos muestreados
- Cuadro.2. Frecuencia de sexo en el MAT
- Cuadro.3. Frecuencia de raza en el MAT
- Cuadro.4. Frecuencia de barrio en el MAT
- Cuadro.5. Frecuencia de edad en el MAT
- Cuadro.6. Frecuencia de sexo en el cultivo de orina
- Cuadro.7. Frecuencia de raza en el cultivo de orina
- Cuadro.8. Frecuencia de barrios en el cultivo de orina

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig.1. Porcentaje de edades de los canes muestreados
- Fig.2 Porcentajes de sexo según la edad de los canes muestreados
- Fig.3. porcentaje de los títulos de anticuerpo para los serovares

## ÍNDICE DE ANEXOS

- A-1. Formulario de toma de muestras de sangre.
- A-2. Formulario de remisión de muestras de sangre
- A-3. Formulario para la recolección de agua.
- A-4. Encuesta realizada al momento de la recolección de orina
- A-5. Protocolo de laboratorio para la técnica MAT.
- A-6. Protocolo de laboratorio para el cultivo de orina para evaluación de Anticuerpos a Leptospirosis canina.

## INDICE DE IMÁGENES

- Imag.1. Aplicación de diuréticos.
- Imag.2. Recolección de orinas.
- Imag.3. Bolsas plásticas estériles.

Amaya, M. 2009. Contribuir a la mejora de la salud pública en la ciudad de Catacamas, Olancho, Honduras, mediante el diagnóstico de la prevalencia de Leptospirosis canina. Utilizando la técnica de Micro-aglutinación (MAT), para el registro y control de casos.

Palabras claves: Leptospirosis, caninos, prevalencia, MAT.

## RESUMEN

Con el objetivo de Contribuir a la mejora de la salud pública en la ciudad de Catacamas, Olancho, Honduras, mediante el diagnóstico de la prevalencia de Leptospirosis canina. Utilizando la técnica de Micro-aglutinación (MAT), para el registro y control de casos En el periodo del 11 de marzo al 24 de agosto del 2009. Para conocer la población canina con posibilidades de infestación con Leptospirosis según, sexo, edad, factores de riesgo. Y determinar el grado de infestación y una estrategia técnica y económica para el control y seguimiento contra la Leptospirosis. Se realizo un muestreo de 380 canes, correspondiente al 10% de la población canina en dicha ciudad. Extrayéndose 3 ml de sangre de la vena radial y safena externa, luego de procesarla para separar el suero mediante precipitación, fueron trasladados al laboratorio del INSTITUTO HONDUREÑO DE INVESTIGACIONES MEDICO VETERINARIO. Para su análisis mediante la técnica MAT. Luego se tomo una segunda muestra de orina a los animales reactivos, para realizar un cultivo haciendo uso de un medio de cultivo con antibiótico flurouracilo (5-fu) De acuerdo con los resultados obtenidos, de 380 canes, 5.1% son positivos y 94.9 % negativos a Leptospirosis encontrándose los siguientes serovares: canicola, icterohemorrágica, hardjo, grippotyphosa.

Amaya, M. 2009. Help for the publics in the Catacamas city, Olancho, Honduras. Descriptive study of canine Leptospirosis prevalence with the tecnic micro-agglutination (MAT) for the control and dates of case.

### **ABSTRACT**

The Leptospirosis is considere one of the most widespread zoonosis in the word. The dog acts as a potential disseminator of this disease since it maintains a close relationship with man, while other animals both domestic and wild. In orde to towns of the Catacamas city, Olancho, Honduras. Performed asamble of 380 dogs, corresponding to 10% of dogs in the eight towns. 3ml of blood was drawn from the external saphenous vein, the processed to separate the blood serum of plasma by precipitation, transferred to the laboratories of INSTITUTION HONDUREÑO OF INVESTIGE VETERINARI MEDICAL, for analysis by MAT and Rx orine. Acorrding to the results obtained by a MAT of 380 dogs, 94.9% negative and 5.1% positive to Leptospirosis found the following serovars canicola, icterohemorrhagiae, hardjo and grippotyphosa.

## I. INTRODUCCIÓN

La Leptospirosis es una enfermedad contagiosa del hombre y los animales, causada por una bacteria que se agrupa en serovariedades inmunológicamente distintos. Las infecciones pueden ser asintomáticas o presentar gran variedad de signos como; insuficiencia renal, hepática, fiebre, vomito, infertilidad, hemoglobinuria y muerte. El ecosistema juega un papel importante en el ciclo de transmisión de la Leptospirosis ya que la infección normalmente es adquirida al contacto de la piel o mucosas con aguas contaminadas con *Leptospira*. El crecimiento de las ciudades sin condiciones sanitarias adecuadas y los recientes eventos naturales en lo que se refiere a huracanes y grandes inundaciones han propiciado el neo apareamiento de ésta enfermedad (Bosio y Bergagna, 2000).

En todo el mundo se han descrito más de 220 serovares pero, frecuentemente, las infecciones se producen por un número limitado de serovares endémicos de una región o país y su presencia está íntimamente ligada a factores ecológicos y medioambientales De manera secundaria, también puede haber pérdidas económicas como consecuencia de la insuficiencia renal y hepática transitoria producida por estos microorganismos Por último, en animales jóvenes puede darse, aunque con poca frecuencia, un cuadro agudo grave que cursa con fiebre, ictericia, hemorragias y hemoglobinuria y que frecuentemente es de curso fatal (Jiménez y Díaz, 1998).

La Leptospirosis en humanos se conoce desde 1886, año en que Adolf Weil describe un síndrome ictero hemorrágico acompañado de insuficiencia renal. En 1905 Stemsom identificó espiroquetas en los túbulos renales de un paciente al que se le diagnosticó fiebre amarilla. En 1915 Inada & Ido cultivaron por primera vez el organismo y se pudo determinar que la rata era reservorio (Watt, 1990).

Estudios de prevalencia realizados en algunas naciones americanas arrojaron los siguientes resultados: México 14.1%, Argentina 3.8%, Brasil 9.8%, Cuba 12%, El Salvador 17.5%, Colombia 18.5%. Las encuestas serológicas han sido ampliamente utilizadas, para el caso en la región costera y Cordillera del Pacífico en Guatemala en 1963, se reportó un 3,45% de infectados (Benenson, 1997).

En Nicaragua 1995 se reportó un brote de 2,419 casos, con presentación clínica de neumonía hemorrágica en humanos. Siendo fácilmente confundida con otras enfermedades comunes como dengue hemorrágico. En Honduras los primeros indicios de Leptospirosis en humanos se registraron en octubre de 1995, reportándose cinco casos sospechosos por clínica y epidemiología en la comunidad de Albarrada municipio de El Corpus departamento de Choluteca y el primer caso en animales se registro en 1964 en un lote de cerdos importados de estados unidos (Pereira, 2009).

En el año 1975, Luis A. Espinoza realizó un estudio de Leptospirosis en bovinos, en el valle de Comayagua, Honduras encontrando una prevalencia de 38%, siendo los Serogrupos más frecuentes: L Bataviae, L Pyrogenes, L Canicola, L Pomona, L. Grippotyphosa, L Sejroe, y L. autumnales. A partir de 1985 el Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinaria (I.H.I.M.V) inicio la vigilancia de laboratorio en forma sistemática a través de la micro aglutinación, los datos en el 2001 mostraron que de 30,517 muestras en porcinos y de 62,140 en bovinos, se obtuvo una distribución de más de 16 serovares en todo el país (Velásquez, 2004).

En el mes de noviembre del año 1998 y a consecuencia del huracán Mitch se presentó un brote en todo el país de Honduras; identificándose 172 casos de Leptospirosis: Los municipios más afectados fueron: en la región norte, San Pedro Sula, La Lima y en la región central Tegucigalpa, siendo el grupo de edad más frecuente el de 15 a 49 años. Las serovariedades identificadas fueron: *L. icterohemorrhagica*, *L. hardjo*, *L. canicola*. En éste brote fallecieron 7 pacientes lo que significa una tasa de letalidad de 4.06% (Rosales, 2001-2002).

El perro no es el único animal afectado por la Leptospirosis, también el bovino, el cerdo, el caballo, y muy rara vez las ovejas, siendo el principal foco infeccioso las ratas, por lo tanto debe practicarse estrictamente las normas de bioseguridad para evitar contagios. Brindando estabilidad en cuanto a salud se refiere. La Leptospirosis en la población humana y animal, es una enfermedad de la que existe muy poca disponibilidad de datos oficiales en Honduras, por lo que origina la necesidad de determinar el nivel de exposición al contagio directo e indirecto y establecer las acciones de control y prevención correspondientes para que las mismas se realicen de forma sostenida en el ámbito nacional (Orellana, 2009).

En la actualidad no se puede considerar La Leptospirosis como una enfermedad exótica en ninguno de los países del Continente Americano. Actualmente la Organización Internacional de Enfermedades (OIE) la considera de reporte obligatoria, siendo la ciudad de Catacamas, Olancho, lugar donde las condiciones ambientales favorecen la presencia de la leptospira y por no existir hasta el momento ningún estudio de Leptospirosis canina, tomando en cuenta que esta especie convive directamente con los seres humanos, se decide llevar a cabo este trabajo de investigación, donde se pretende realizar un diagnóstico de prevalencia de Leptospirosis canina (Iglesias, 2009).

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. General**

- ❖ Diagnóstico de la prevalencia de Leptospirosis canina. Utilizando la técnica de Micro-aglutinación (MAT), para el registro, control y Contribuir a la mejora de la salud pública en la ciudad de Catacamas, Olancho, Honduras.

### **2.2. Específicos**

- ❖ Identificar la población canina con posibilidades de infestación con leptospira, según sexo, edad, factores de riesgo, con la recolección de datos a través del muestreo de sanguíneo.
- ❖ Determinar el grado de infestación de leptospira en la población canina de La Ciudad de Catacamas Olancho, a través de la obtención de títulos en la prueba inmunológica.
- ❖ Recomendar la implementación de una estrategia de control y seguimiento contra la enfermedad de Leptospirosis.

### **III. MATERIALES Y METODO**

#### **3.1 Descripción del área de práctica**

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Catacamas, Olancho a 254 kilómetros, sur este de la ciudad de Tegucigalpa, Capital de Honduras, con una población de 79,000 habitantes y ubicado a 14° 56' y 14° 23' latitud norte y 86° 19' longitud oeste, a una altura de 350 mts SNM, presenta una temperatura promedio de 25°C, con una humedad relativa de 67.66%, precipitación fluvial promedio anual de 1311.25.

#### **3.2 Diseño metodológico**

El estudio fue orientado por los Médicos Veterinarios y Microbiólogo del Departamento de Producción Animal de La Universidad Nacional de Agricultura (E.N.A.) en conjunto al departamento de Veterinaria de La Universidad Nacional Agraria (U.N.A.), Nicaragua. Los análisis de laboratorio fueron orientados por la especialista en Microbiología del Instituto Hondureño de Investigaciones Médico Veterinaria de Honduras (IHIMV). La colaboración para la extracción de sangre por parte de los pasantes de la carrera de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencia Animal (F.A.C.A.- U.N.A.) Y el Departamento de control y prevención del centro de salud de Catacamas, y la participación de los estudiantes de cuarto año de Ing. Agronómica- E.N.A.

Se recolectaron las muestras sanguíneas para realizar la técnica laboratorial MAT. Tomando el 10% de la población canina vacunada en la jornada de vacunación contra la rabia, en el periodo del 23 de marzo al 27 de marzo. Se incluyeron todos los perros residentes de 3 meses de edad o mayores, previo consentimiento de sus dueños. Luego con los animales que resultaron reactivos en el MAT, se les tomo una segunda muestra (orina) para reafirmar o descartar sospecha de infección por leptospira, mediante el cultivo de orina en conjunto a la recolección de aguas en los lugares de origen de los mismos para filtrarlas y aislar la bacteria leptospira.

### **3.3 Manejo de la investigación**

#### **3.3.1 Volumen y manejo de la muestra de sangre**

Para obtener las muestras de sangre se aprovecho la jornada de vacunación canina contra La Rabia en la ciudad de Catacamas, obteniéndose el 10% del total de perros vacunados. La muestra de sangre se extrajo de la vena safena y de la vena radial. El volumen de la sangre fue aproximadamente de 5 ml, sin anticoagulantes en tubos de ensayos con tapones de goma. Posteriormente se transporto al laboratorio de Sanidad Animal y luego por el método de precipitación con gotero se obtuvo el suero para luego ser depositado en viales con capacidad de 0.75 ml, no hemolizada, identificada, conservada y congelada a una temperatura de 4 a 8°C. Las muestras finalmente fueron transportadas para ser analizadas en el laboratorio de IHIMV.

La presencia de anticuerpos se detectó por medio de micro-aglutinación. Se usaron como antígenos los siguientes serotipos: *icterohemorrhagiae*, *canicola*, *australis*, *panama*, *tarassovi*, *ballum*, *grippotyphosa*, *bataviae*, *hardjo*, *Pomona* y *grippotyphosa*. Un suero se consideró seropositivo cuando el título (es decir, el inverso de la máxima dilución micro aglutinante) fue de 1/800 o más para algún serotipo

#### **3.3.2 Volumen y manejo de la muestra de orina**

Los animales que resultaron reactivos a la infección con *Leptospiras*, mediante la prueba laboratorial de micro-aglutinación (MAT). Se le tomo una muestra de orina para realizar un cultivo. Para realizar estas muestras se aplico diuréticos y se recolectaron aproximadamente, 5 ml de la orina en frascos previamente desinfectados. Se transportaron a una temperatura ambiente al laboratorio de sanidad animal para ser cultivados en un medio semilíquido con antibiótico fluorouracilo (5-fu).

### **3.3.3 Volumen y manejo de las muestras de aguas**

Para obtener las muestras de agua se visito los barrios y colonias donde habitan los caninos a los cuales se les extrajo la muestra sanguínea para que hubiera una concordancia de resultados, utilizando frascos estériles en una cantidad de 20 ml, la que fue transportada al laboratorio de sanidad animal de la universidad nacional de agricultura y luego al laboratorio de IHIMVH, para proceder hacer al cultivo.

### **3.3.4 Método estadístico**

Para la interpretación de datos fue necesario el uso de la estadística descriptiva utilizando distribución de frecuencia para las variables. La base de datos se obtuvo de las observaciones de campo y laboratorio. Se registraron en hojas de Excel, las cuales se analizaron en el paquete estadístico del programa SAS (Statistical Analysis System), seguidamente, el análisis de varianza y correlación lineal entre la prevalencia de Leptospirosis y las variables edad, sexo y factores de riesgo por la homogeneidad de varianza (Myers, 1985).

### **3.3.5 Variables a evaluar**

**Prevalencia:** indica el número de casos que prevalecen en cierto tiempo. El punto de prevalencia es el número total de casos existentes en ese punto del tiempo, no importando si los casos son nuevos, viejos o casi recuperados (García, 1990).

$$\% \text{ prevalencia} = \frac{\# \text{ Animal positivo}}{\# \text{ Total de animales muestreados}} * 100$$

# De animales positivos: es el porcentaje de animales que son confirmados a través de la prueba de micro aglutinación MAT y cultivo de orina.

# Total de animales muestreados.

$$\% \text{ prevalencia} = \frac{20}{380} * 100$$

### 3.3.6 Materiales y equipo

Para la recolección de muestras de sangre se utilizo, hieleras o termos, jeringas de 3 ml con aguja 23G x 1 1/2, alcohol, algodón, tubos de ensayos, pipetas, viales, agua destilada, frízer, guantes látex, gabachas. Para la recolección de orina; frascos estériles, igual para la recolección de las muestras de agua. Para inducir la micción, diuréticos. (Furosemida) 0.5 ml por cada 5 kilogramos de peso corporal.

#### 3.3.6.1 Materiales de laboratorio:

Micro pipeta multicanal 0-20 µl. Micro pipeta multicanal 300 µl. Micro placas, Tubos de ensayo, Laminas portaobjetos, Gabachas, guantes. Agua destilada, filtros tipo millipore de 0.22 µm, guantes, anteojos de seguridad y cubre bocas, pipetas serológicas, de 5 y 10 ml, tubos de calidad cultivo celular de 10 ml.

### **3.3.6.2 Equipo de laboratorio:**

Microscopio campo oscuro, Espectrofotómetro, Incubadora, Refrigeradora, autoclave, Erlenmeyer estériles de 25,50, 125, 250, 2000 ml, beaker estéril de 2 litros, botellas de vidrio estéril de aproximadamente 50 y 150 ml. Botellas de vidrio estériles de 500ml.

#### IV. Resultados Y Discusión

**4.1.** La prevalencia es de 5% correspondiente a los 380 canes muestreados en la ciudad de Catacamas, Olancho.

Estos resultados son menores a los reportados por Silva y Riedemann (2007), quienes realizaron estudios similares en Valdivia, Chile, usando el método empleado en este estudio, para ese caso analizaron 400 sueros caninos de los cuales y reportando una prevalencia de 14.8%.

En cambio Correa y Estrella (2008), realizando estudios en el distrito II de la ciudad de Managua. Analizaron 76 sueros caninos, mediante el mismo método, y obtuvieron una prevalencia menor con 3.3%.

En cuanto a los resultados obtenidos por, Polo (2008) en la zona18 de la capital de Guatemala, De 30 sueros caninos analizados mediante el MAT la prevalencia fue de 23.33%, igualmente comparando los resultados son mayores a los de esta investigación.

#### 4.2. Diagnostico mediante la técnica de micro - aglutinación (MAT)

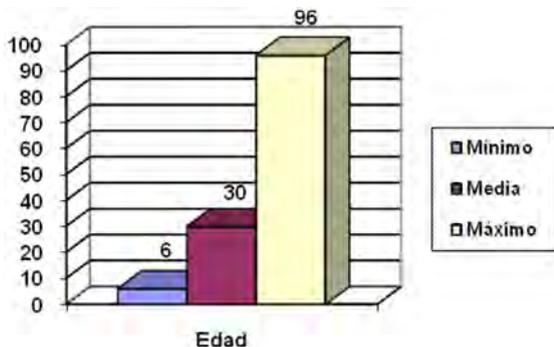
Se encontró el 5.1% positiva con Leptospirosis.

	N	Mínimo	Máximo	Media
Edad	160	6	96	29.67

##### 4.2.1. Edad

Se encontró que el 10% de la población muestreada presentaban edades menores de 6 meses; el 25% con edades de 30 meses y el restante 65% con edad igual o mayor a 96 meses.

Fig.1. porcentaje de afección por edad



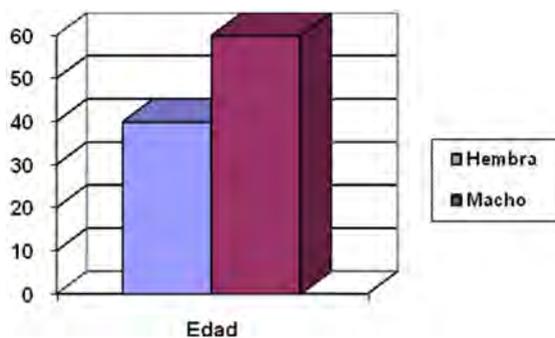
En cuanto a los resultados por Corea y Estrella (2008) Managua, Nicaragua, en donde el 80.3% de la población muestreada presentaba edades menores o iguales a 12 meses de edad, el 10.5% correspondía a canes de 30 a 48 meses de edad y el 9.2% a canes iguales o mayores de 96 meses.

#### 4.2.2. Sexo

Se encontró que el 40% de la población era hembra y el 60% machos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Corea y Estrella (2008) en el distrito II, Managua, Nicaragua. Con 76 sueros caninos y analizados con el MAT, de los cuales 66% fueron machos y 34% hembras.

En Guatemala, Polo, (2007) de 30 sueros caninos 28.57% fueron hembras y 71.42% machos, confirmando la infección la presentan mayormente los machos.

**Fig. 2. Afección de sexo según le edad del perro**



#### 4.2.3. Sexo según la edad.

Los machos reactivos se encontraban en un promedio de 24 meses de edad y las hembras en 30 meses. Los resultados indican que la infección es más frecuente en machos con la edad entre 3 a 8. Estos resultados obtenidos son similares a los de Rubel. *et al* (1997), en Buenos Aires, Argentina. Resultaron que de 127 sueros caninos 45% fueron hembras con un promedio de 30 meses de edad y 63% macho con una edad promedio de 24 meses.

#### 4.2.4. Raza

Se manifestó 48 canes de RND, 15 pastor Alemán, 21 pit bull, 14 pequinés, 9 dálmatas, 10 doberman, 12 rotwailer, 15 labradores, 16 bóxer.

#### **4.2.5. Barrio**

De los 12 barrios muestreados, 4 de la zona central y 3 de las zonas periféricas presentaron mayor cantidad de canes afectados siendo estos los barrios; El centro, La Donald, El Espino, La Agrícola, ojo de Agua, Juan Pablo II, y La Cruz.

#### **4.3. Diagnostico mediante el cultivo de orina**

##### **4.3.1. Edad**

Los canes que presento mas crecimiento de leptospiras en la orina fueron los de 24 meses con 7 muestras con crecimiento, seguido de 48 meses con 3 muestras, 12, 34 y 60 meses de edad, con 2.

##### **4.3.1. Sexo**

El crecimiento de Leptospira con respecto al sexo corresponde a 5 hembras y 9 machos.de 14 casos.

##### **4.3.1. Raza**

Al realizar el cultivo de orina para la raza 1(RND) presentaron crecimiento 10 canes, 2 para la raza 8 (labrador) y 2 para la raza 9 (bóxer). Para un total de 14.

##### **4.3.1. Barrio**

En el barrio 1 de 19 casos se encontró 1 con crecimiento de Leptospira, en el barrio 5 de 13 se encontraron 2, en el barrio 6 de 15 se encontraron 3 en el barrio 7 se encontró 1, en el barrio 9 de 13 casos se encontraron 2, en el barrio 10, de 10 casos se encontró 1, en el barrio 11 de 8 se encontraron 2 y en el barrio 12 de 6 casos se encontraron 2 con crecimiento de leptospira.

#### **4.4. Discusión de la Inmunidad ante la Leptospira**

Ante la agresión producida por las *Leptospira*, el organismo reacciona primariamente con una respuesta sérica caracterizada por la producción de inmunoglobulinas (Ig) del isótopo IgM, que pueden detectarse por el método de aglutinación microscópica (MAT). Las IgM elevan su nivel tras la infección siendo detectable a los pocos días en la fase de bacteriemia, dificultando la multiplicación de *La Leptospira*, pero no la destruye, poco después disminuye, y comienzan a detectarse la IgG específicos, que produce la lisis de las *Leptospira*.

En la figura 1. Donde se ilustran los porcentajes de edades, se encontró la mínima de 6 mese, lo que nos indica, que esta edad no es muy frecuentemente infectada por *Leptospira* debido a que el cachorro posee inmunidad transferida por la madre durante la lactancia, en cuanto a los animales mayores de 96 meses ya han creado resistencia. Concluyendo que los canes en el promedio de 30 meses de edad estas expuestos a la infección porque los Ac. Que obtuvieron de la madre disminuyeron, es por esto que necesita reforzar su inmunidad con vacunas.

En la figura.2. Se refiere al sexo según la edad. En general se sabe que las hembras de cualquier edad son más resistentes que el macho, la diferenciación está íntimamente ligada con las hormonas sexuales, que han demostrado claramente afectar al sistema inmunitario. La principal célula afectada es el linfocito T, y hay evidencia que sugiere que las hormonas sexuales pueden alterar su balance, el hecho que la hembra reaccione mejor es debido a la producción de hormonas esteroides y su influencia sobre el tejido linfoides ( Sosa *et al*,2007).

#### 4.5. Títulos de anticuerpos de canes reactivos Leptospira

Ictero.	Pomona	Hardjo	Canicola	Bataviae 1/800	Panama	Australis	Bàllum	Tarassovi
		1/400						
		1/400						
		1/1600						
1/100			1/800					
1/200			1/800					
	1/100		1/200	1/100	1/200	1/400		
			1/400	1/400				
			1/400					
			1/800			1/100		
			1/400					
			1/400	1/100				
			1/400	1/400				
		1/200	1/400			1/400		
1/100			1/400	1/100		1/100		
1/200			1/400			1/100		
1/200	1/100		1/200			1/100		

Considerando los serovares de *Leptospira* en el país de Honduras. Mediante el MAT, los títulos encontrados fueron de 1/100 y superiores a títulos entre 1/400 y 1/1600, correspondiente la gran mayoría a los serovares canícula, icterohemorrhagiae, bataviae y hardjo. Indicando presencia de anticuerpos en el organismo de los canes, los cuales pudieron ser inducidos por vacunas debido a que estas contienen los serovares, *L. Canícula*, *L. Icterohemorrhagiae*, *L.Pomona*, y *L.Grippotyphosa*. O también pudieron haber creado inmunidad por estar expuestos a la enfermedad.

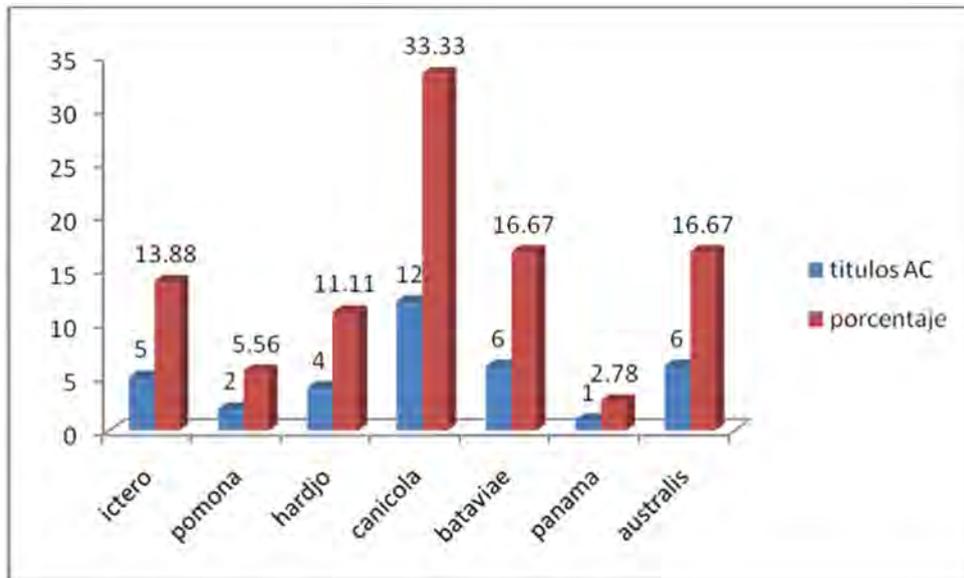
El mecanismo de acción de las vacunas se basa en estimular el sistema de defensa del organismo. Cuando un virus o cualquier otro agente infeccioso penetran en el cuerpo, las células de defensa (linfocitos T) lo reconocen y crean anticuerpos específicos para atacar cualquier agente que contenga esa partícula que han detectado, McDonough (2001).

Silva y Riedemann (2007) Valdivia Chile mediante el mismo método. De 400 sueros caninos. 59 obtuvo títulos 1:100 y superiores (seroprevalencia 14,8%); un 72,88% del total de éstos reaccionó a títulos entre 1/400 y >1/1.600, correspondiendo la gran mayoría (97,67%) a los serovares *ballum*, *canícula* e *icterohaemorrhagiae*.

En Guatemala, Polo (2007). De 30 sueros caninos, analizados con el MAT presentaron aglutinación a anticuerpos con títulos superiores de 1/200 con los serovares; *canicola*, *icterohemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *australis* y *pyrogenes*. En comparación a los resultados de esta investigación son similares.

En Nicaragua, Peláez. (2007) De 120 sueros de perros, la seroprevalencia estuvo dirigida a los serovares siguientes: Pomona, canicola y hardjo respectivamente con títulos aglutinantes entre 1\200 y 1\800. Estos resultados son menores en comparación con los obtenidos en esta investigación.

Fig.3. porcentaje de los títulos de anticuerpo para los serovares.



Los porcentajes para los títulos de anticuerpo para Leptospirosis, fueron los siguientes: Icterohemorragiae 13.88%, Pomona 5.56%, Hardjo 11.11%, Canicola 33.33%, panamá 1% Bataviae y Australis 16.67%.

Este cuadro nos indica que de los 10 serovares existentes en la zona, 7 son los más frecuentes en la infección de los caninos, y como resultado de la investigación, se sabe que la rata es el reservorio primario de los serovares Icterohemorragiae y Bataviae, señalando que tanto la población humana como la canina están expuestos al contacto con las orinas de los roedores. La mayor vía de transmisión para los perros son ellos mismos, debido que los resultados de este estudio indican que, *L. Canicola* es la representado con un alto porcentaje siendo esta propia de los canes.

La ciudad de Catacamas es una zona ganadera, lo que hace normal la presencia del serovar Hardjo. Siendo está la tercera en afectar a los perro, y puede ser por la convivencia de dichos animales, en el campo para beneficio de los ganaderos.

Al realizar este estudio, se descubrió que los canes presentaron más de un serovar al momento de MAT. Siendo las combinaciones de serovares más frecuentes; icterohemorrhagiae-canicola, hardjo-canicola y icterohemorrhagiae-canicola-hardjo. Estos resultados nos demuestran que los perros pueden infectarse con varios serovares además del canicola y servir como huéspedes accidentales, así también lo confirma, Acha, (2001), indicando que cada serovar tiene su o sus huéspedes animales predilectos, pero cada especie animal puede ser huésped de uno o más serovares.

Siendo estos resultados similares a los reportados por Rodríguez *et al* (2004) de 197 sueros analizados, en Cali, Colombia, los patrones con aglutinación fueron: gryppotyphosa-hardjo, canicola-hardjo, y canicola-icterohemorrhagiae-grippytyphosa.

Al comparar estos resultados con los reportados por Corea y Estrella (2008) hay una similitud con los serovares encontrados, siendo porcentuados de la siguiente manera: *canicola* 50%, *icterohemorrhagiae* 25% y *pyrogenes* 25%.

## V. CONCLUSIONES

- La prevalencia es de 5% correspondiente a la ciudad de Catacamas, Olancho, Honduras.
- No existe la relación significativa en cuanto a la positividad y las variables raza y barrios.
- Los canes en el promedio de 30 meses de edad están expuestos a la infección porque los Ac. Que obtuvieron de la madre disminuyeron, es por esto que necesita reforzar su inmunidad con vacunas.
- Los canes reactivos con títulos 1/800 o más en la técnica MAT. Fueron sometidos a un cultivo de orina.
- Los serovares encontrados mediante el MAT fueron; L.Canicola, L.Icterohemorragica, L.Hardjo, L. Gryppothyposa.

## **VI. RECOMENDACIONES**

### **Al ministerio de salud**

- ✓ Dar seguimiento a los casos positivos.
- ✓ Ejecutar la prevención y control de la enfermedad por medio de campañas.
- ✓ Concientizar a la población acerca de la gravedad de la enfermedad, el peligro que representa esta para la salud y para la vida humana, así como el rol de los caninos en la transmisión de La Leptospirosis.
- ✓ Realizar estudios epidemiológicos cada año en todos los animales domésticos y silvestres, no enfatizar solamente en los roedores.

### **A los médicos veterinarios**

- ✓ Tomar medidas profilácticas durante la práctica de sus labores.
- ✓ Informar a los propietarios acerca de las enfermedades zoonóticas, instruyéndoles las medidas que deben tomar para evitar la propagación de estas.

### **A la población**

- ✓ Mantener la higiene en el hogar, evitar aguas servidas, control de vectores.
- ✓ Evitar que el can se mantenga en las calles.
- ✓ Llevar un control veterinario.

## VII. LITERATURA CITADA

- Benenson, A. (1997) Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16° edición. Washington, DC: OPS, pág. 333-336.
- Bosio, G., Bergagna, G. (2000). Ingeniero Ambiental. Las enfermedades zoonóticas y su relación con el medio ambiente. (En línea). Consultado el 13 de marzo de 2009. Disponible en <http://www.ingenierioambiental.com/index.phd>.
- Braselli, A. (2000). Revisión de temas. Leptospirosis. Uruguay. (En línea). Consultado el 01 de mayo, 2009. Disponible en <http://www.infecto.edu.uy/revisióntemas/tema25/Leptospirosis>. Com.
- Céspedes, ZM. (2002). Prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de Leptospirosis humana. Lima Perú. (En línea). Consultado en 8 de mayo. Disponible en [http //www.scielo.Org.pe](http://www.scielo.Org.pe).
- Comisión Científica sobre Leptospirosis, (2002). Rep. Argentina (CCLA). Manual de Leptospirosis. CCLA editor. Bs. As, Argentina.
- Faines, S. (1994). Leptospira y Leptospirosis. Boca Ratón, Florida. pág. 243-252.
- Gean, G. Trolliet, JC. (2001) curso de producción animal IFAV UNRC. (En línea) Consultado el 24 de junio. Disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar).
- Huebner, RA. (1988). Manual Merck de veterinaria. Leptospirosis Canina. 3° edición. Barcelona, España, Centrum. Pág. 437-439.

- Iglesias, I. (2009). Portal Educativo. Leptospirosis canina. Rep. Argentina. (En línea). Consultado el 8 de mayo. Disponible en <http://www.amordemascota.com>
- Jiménez, GE., Díaz, RC. (1998). Detección de anticuerpos contra leptospira de 4354 sueros porcinos. (En línea). México. Consultado el 21 de abril 2009. Disponible en <http://fmvz.unam.mx/fmvz/reuvmex>.
- Myer, D. (1985). Manual de método para El diagnostica de La Leptospirosis AR Centro Panamericano de zoonosis 5p.
- Orellana, B. (2009). Manual de Laboratório para Diagnostico sorológico de Leptospirosis em Animales. IHIMV. Hn. 2009.
- Pelaez, O, Garcia, G., Batista, N. Blain, K. (2007) informe Del trabajo realizado en El Enfrentamiento Del brote epidêmico de Leptospirosis 27 de octubre- 14 de diciembre 2007. Ni (em línea) consultado El 28 de septiembre 2009. Disponible [www.conamornicaragua.org.ni/documentos\\_4/DICIEMBRE/INFORME\\_BRIGADA\\_MEDICA\\_CUBANA\\_FINAL\\_IMPRESIO.doc](http://www.conamornicaragua.org.ni/documentos_4/DICIEMBRE/INFORME_BRIGADA_MEDICA_CUBANA_FINAL_IMPRESIO.doc)
- Pereira, PG. (2009). Taller de Leptospirosis. Asamblea Bíblica. Ministerio de La Agricultura, Instituto de Medicina Veterinaria. 2009.
- Polo, O. (2007) Determinar la prevalencia de anticuerpo de Leptospira interrogans, en perros no vacunados por la prueba de micro-aglutinación (MAT) en clínicas veterinarias ubicadas en la zona 18 de la capital Guatemala. Universidad de San Carlos. (en línea). Consultado el 28 de septiembre 2009. Disponible en [www.pet.salud.cl/articulos/leptospirosis.htm](http://www.pet.salud.cl/articulos/leptospirosis.htm).

- Robles, AM. (2008). Tratamiento para Leptospirosis. Doxiciclinas en La Leptospirosis. Argentina. (En línea). Consultado el 21 de abril 2009. Disponible en [http://www.foyel.com/cartillas/28/doxiciclina\\_en\\_la\\_leptospirosis](http://www.foyel.com/cartillas/28/doxiciclina_en_la_leptospirosis).
- Rodríguez, JP. (1997). Leptospirosis canina. La Habana, Cuba. (En línea). Consultado el 21 de abril 2009. Disponible en <http://www.oei.org.co/oeivirte/edumat.htm>.
- Rosales, S. (2001-2002). Seroprevalencia de Leptospira interrogans en grupos de riesgo en la ciudad de Tegucigalpa, Honduras. (En línea) consultado el 21 de abril 2009. Disponible en [http://www. Biblioteca virtual en salud.com](http://www.BibliotecaVirtualEnSalud.com)
- Rubel, D., Seijo, A., Lernigoi, B., Viale, A., Colli, C., (1997). Leptospira interrogans en una población canina del gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. (en línea) consultado el 25 de septiembre 2009. Disponible en [www.scielosp.org/pdf/rpsp](http://www.scielosp.org/pdf/rpsp).
- Samartino, L. (2008). Epidemiología de la Leptospirosis humana y animal. Gramado, Rio Grande do Sul Brasil, octubre 2008. (en línea). Consultado el 25 de septiembre 2009. Disponible en [www.sovergs.com.br/palestra/Dr\\_luis\\_samartino.%](http://www.sovergs.com.br/palestra/Dr_luis_samartino.%)
- Sandow, K. (2007). Leptospirosis Canina. Granma, Cuba. (En línea). Consultado el 16 de marzo de 2009. Disponible en [www.monografias.com](http://www.monografias.com).
- Sapìa, LC. (1997). Foyel mascotas. Leptospirosis Canina. Argentina (en línea). Consultado el 8 de mayo 2009. Disponibles en [http://www.foyel.com/cartillas/6/leptospirosis\\_canina](http://www.foyel.com/cartillas/6/leptospirosis_canina).

- Sierra, M. (1999). Estudio de Leptospirosis en Honduras, dic.- febr. Secretaria de salud. Departamento de epidemiologia. (En línea). Consultado el 8 de mayo 2009. Disponible en [http// www.bvs.hn/level-php](http://www.bvs.hn/level-php).
- Solórzano, JO. (1998). Estudio de Leptospirosis en Honduras, nov.- dic. Secretaria de Salud. Departamento de Epidemiologia. Consultado el 8 de mayo 2009. Disponible en [http// w.w.w.bvs.hn/level-php](http://w.w.w.bvs.hn/level-php).
- Velásquez, RT. (2004). Seroprevalencia y Factores Asociados a la Transmisión de Leptospirosis en Trabajadores de La Procesadora Municipal de Carnes (PROMUCA) De San Pedro Sula, Honduras. Msc. UNAN. Nicaragua. Pág. 47. Consultado el 11 de marzo 2009. Disponible en [http//www.minsa.gob.ni/bns/tesis\\_sp/35.pdf](http://www.minsa.gob.ni/bns/tesis_sp/35.pdf)
- Watt, GP, Padre L, Tuazon M, Calubaquid C. (1990) Skeletal and cardiac muscle involvement in severe, late Leptospirosis. Pág. 69-266.
- Zunino, E., Palomino, C. (1984). Leptospirosis. Análisis de 36 casos. (En línea). Consultado el 20 de abril 2009. Disponible en [http// la salud de las Américas](http://la.salud.de.las.Americas). Edición 1998. vol.1.
- Zamora. Riedemann, S. (1990). Encuesta Serológica de Leptospirosis Humana de alto riesgo en Chile. Rev. Med. Chile.

# **VIII. ANEXOS**

**ANEXO 1. Formulario de Toma de Muestras de sangre**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA  
JORNADA DE VACUNACIÓN CONTRA LA RABIA  
FORMULARIO PARA TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA CANINA**

**Historial clínico:**

**Generalidades**

Nombre del propietario: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

**Datos del Paciente**

Nombre: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_

Vacunas anteriores: \_\_\_\_\_

Fecha de última vacuna: \_\_\_\_\_

Ritmo Respiratorio: \_\_\_\_\_ Ritmo Cardíaco: \_\_\_\_\_ Temperatura: \_\_\_\_\_

-----  
Sustentante

-----  
Asesor

**ANEXO 2. Formulario de Remisión de Muestras de sangre.**

**SECRETARIA DE AGRICULTURA Y GANADERIA  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA (SENASA)  
SUB-DIRECCIÓN DE SALUD ANIMAL  
Remisión de Muestras  
Estudio Serológico Leptospirosis Canina**

RESULTADOS DEL DIAGNOSTICO DE LEPTOSPIROSIS						FORM. B.T.3.N°.	
B. GENERALIDADES DE LOS CANINOS EXAMINADOS Y RESULTADOS DE LEPTOSPIROSIS							
Identificación		Canino	Edad	Vacuna contra Leptospirosis		Resultados	Observaciones
Tubo	Animal			Si	No		

Fecha _____ / _____ / _____ / Día    Mes    Año	Firma y sello CMVH del Médico Veterinario Responsable _____ Castro _____ Nacional de Agricultura	_____ Dra. Marlen Universidad
--	---	-------------------------------------

### **ANEXO 3. Formulario Para la recolección de Agua**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA  
MUESTRAS DE AGUA DE LA CIUDAD DE CATACAMAS, OLANCHO,  
HONDURAS C.A  
ANÁLISIS DE LEPTOSPIROSIS**

# de muestra	Barrio
1	barrio el porvenir (rio Catacamas)
2	barrio la hoya
3	barrio la cruz
4	barrio sunilaba
5	barrio el centro
6	barrio los laureles
7	barrio las flores
8	barrio ojo de agua
9	barrio el espino (rio Talgua)
10	agua potable de la universidad nacional de agricultura

-----  
Sustentante

-----  
asesor

**ANEXO 4. Encuesta realizada al momento de la recolección de orina.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA**  
**ENCUESTA DESCRIPTIVA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES A LA QUE**  
**ESTÁN EXPUESTOS LOS PERROS MUESTREADOS.**

Encuestador.....fecha.....Nombre encuestado.....  
Teléfono..... Dirección..... Nombre del canino.....  
edad.....Sexo.....Raza.....

**I. ORIGEN DEL AGUA DE CONSUMO Y USO DOMESTICO.....**

1. Potable 2. De pozo 3. Rio o quebrada

**II. QUE HACE CON LA BASURA.....**

1. La quema 2. La bota 3. La entierra

**III. TIENE NIÑOS EN CASA.....**

1.0 a 3 2. 4 a 7 3. 8 a 12 4. No

**IV. EL PERRO SE MANTIENE.....**

1. encerrado 2. En la calle 3. Sale muy poco

**V. OTROS ANIMALES TRASPATIO.....**

1. Cerdos 2. Bovinos 3. Caballos 4. Gallinas 5. Gatos y perros 6. No

**VI. EN QUE COME EL PERRO.....**

1. plato 2.suelo

**VI. CON QUE FRECUENCIA LAVA EL PLATO DEL PERRO.....**

1. todos los días 2. Una vez por semana 3. Una vez por mes 4. Nunca

**VII.EL PERRO TOMA AGUA .....**

1. del grifo 2. De la pila 3.del charco

**OBSERVACIONES:.....**

.....

-----

Tutor

**ANEXO 5. Protocolo de laboratorio para la técnica MAT.  
TÉCNICA MICRO AGLUTINACIÓN PARA EL DIAGNOSTICO DE  
LEPTOSPIROSIS ANIMAL**

**Microbiólogo a cargo:**

**Revisado por:**

**elaborado por:**

**Procedimiento:**

**Abreviaturas:**

Lep. Leptospira

MAT. Micro aglutinación

EMJH. Medio de cultivo Ellinghausen y Mc Collugh, modificado y Harris.

PBS. Buffer de fosfato, para amortiguar el PH. Y realizar las diluciones de las muestras.

**Materiales:**

Micro pipeta multicanal 0-20  $\mu$ l.

Micro pipeta multicanal 300  $\mu$ l.

Micro placas

Tubos de ensayo

Laminas portaobjetos

Gabachas, guantes

**Equipo:**

Microscopio campo oscuro

Incubadora

Refrigeradora

**Reactivos:**

Saf,

Antígenos,

Medio de cultivo

Medio de cultivo EMJH semisólido

Solución de cloro al 2%

**Preparación de reactivos:**

Preparación de Saf

En la mayoría de los laboratorios de leptospira, esta solución se emplea para diluir los sueros y antígenos en las pruebas serológicas.

A. solución amortiguadora de sorense (sol. stock)  
Fosfato Di sódico (anhidro)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....8.33 grs.  
Fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....1.09 grs.  
Agua destilada.....1 lt.

B. Solución salina ( $\text{NaCl}$ ).....8.5 grs.  
Agua destilada.....1 ly.

La solución salina amortiguada con fosfato Saf.

Se prepara mezclando 40 ml. de A con 460 ml. de PH. Final debe ser 7.2

Para usarla como diluyente en pruebas serológicas, se podrá mantener a temperatura ambiente en botellón de tapa de rosca. También se le podrá distribuir en tubos de ensayos y auto clavar a 121c durante 15 minutos, cuando se quiera usar como material diluyente para aislar leptospira por cultivo.

Limites de aplicación.

La preparación de antígenos para la prueba de MAT será exitosa si en gran medida se usan las correctas técnicas asépticas que se recomienda para la preparación del medio de cultivo. Los cultivos que se usan para preparación de antígenos deberán ser no más de 14 días y realizar su control de calidad.

Secuencia de operación.

- 1.Hacer selección adecuada del panel de cepas de transferencia (preferiblemente hacer selección adecuada del panel de cepas de referencia preferiblemente autóctonas), tomando en consideración la circulación de Serogrupos en la región.



- 3.** Tomo la placa de 96 pocillos fondo o en U.
- 4.** Rotular la placa con números de las muestras y Serogrupos según protocolo diseñado en el paso # 2.
- 5.** En la placa de micro aglutinación en el pocillo 1 adicionara un volumen de 192  $\mu$ L de PBS (pH 7.2/7.4) y 8  $\mu$ L de suero.
- 6.** Adicionar un volumen de 50uL de PBS desde el pocillo 2 hasta el pocillo 7.
- 7.** Se hará diluciones, tomar 50  $\mu$ L del pocillo 1 y pasarlo al segundo pocillo, y así sucesivamente hasta el pocillo 7 o más. Destacar 50  $\mu$ L del último pocillo. Quedando realizadas las discusiones siguientes. Pocillo 1. 1/25, pocillo 2.1/50, pocillo 3. 1/100, pocillo 4. 1/200, pocillo 5. 1/400, pocillo 6. 1/800, y así sucesivamente.
- 8.** Adicionar a partir del pocillo 2 un volumen de 50  $\mu$ L del cultivo de leptospira del Serogrupos crecido en medio liquido (EMJH) a 28  $^{\circ}$ C, en fase logarítmica (aprox. Entre 3-7 días), con una concentración aproximada de  $2 \times 10^8$  a  $8 \times 10^8$  Leptospira/ml, equivalente a 200 células por campo. Evitar utilizar cultivos envejecidos con auto aglutinación. Quedando las diluciones finales como, pocillo 2.01/100, pocillo 3.01/200, pocillo 4.1/400, pocillo 5.1/800, pocillo 6.1/1600, pocillo 7.1/3200, y así sucesivamente. Nota, en el pocillo 1 no adicionar antígeno.
- 9.** Controles de positivos y negativos.
  - control de cepas, En un pocillo colocar un volumen de 50  $\mu$ L de PBS y 50  $\mu$ L del cultivo del Serogrupos de referencia.
  - Suero control positivo, En una hilera de pocillos se realizara los pasos del 5 al 8, utilizando como muestra un suero con titulo altos de anticuerpo ( $> 1/160$ ) frente al Serogrupos que se evalúa en esa placa.
  - Suero control negativo, en una hilera de pocillos realizara los pasos del 5 al 8, utilizando como muestra un suero sin título de anticuerpos reconocidos por MAT.
- 10.** Homogenizar muy suavemente la placa.
- 11.** Incubar a 37 $^{\circ}$ c por 1 hora, o de 28-30 c por 2 horas.

**12.** Realizar la lectura de los resultados utilizando el microscopio de contraste de fase con condensador de campo, preferiblemente con ocular se 20X y objetivo 10X. El título final.

Del suero en estudio, será la mayor dilución donde se observe el 50% de leptospira libre. Comparara siempre con el control de cepa.

Negativo. Sin aglutinación

+. Aglutinación con 75% células libres.

++. Aglutinación con 50% de células libres.

+++. Aglutinación con 25% de células libres.

++++. Aglutinación con 0-25% de células libres.

## **ANEXO 6: Protocolo de laboratorio para el cultivo de orina para evaluación anticuerpos a leptospira canina**

### **TÉCNICA DE LABORATORIO PARA EL CULTIVO DE ORINA CANINA PARA EVALUACIÓN DE LEPTOSPIRA.**

#### **Materiales.**

Agua destilada, autoclave, beaker estéril de 2 L, botellas de vidrio estéril de aproximadamente 50 y 150 ml. Botellas de vidrio estériles de 500ml, Erlenmeyers estériles de 25,50, 125, 250, 2000 ml, filtros tipo millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ , gabacha, guantes, anteojos de seguridad y cubre bocas, pipetas serológicas, de 5 y 10 ml, tubos de calidad cultivo celular de 10 ml.

#### **Equipo.**

Autoclave, balanza, baño de agua ajustado a 56 , incubadora ajustada a 29 y 37 , jeringa repetitiva estéril de 10 ml. Microscopio de campo oscuro, pH neutro, sistema de filtración 0.22 $\mu\text{m}$ .

#### **Reactivos.**

5-fluorouracilo (5-fu), agar purificada, agar sangre en placas petri. Albumina sérica bovina factor, anfotericina B, medio de enriquecimiento para EMJH, metanol, rifampicina, suero normal de conejo.

#### **Preparación del medio base:**

Pese 2.3 g de medio de EMJH en una balanza. En un erlenmeyer estéril de 2L con 900 ml de ABFA y disolverá 2.3g de medio EMJH, mantendrá en agitación continua.

Ajuste el pH a 7.4 con NaOH al 10 %.

Para la producción de los medios semisólidos con antibióticos remover una porción del medio disuelto de la siguiente manera: V1 remover 14 ml del medio y para la V2 remover

25 ml del mismo, no lo descartara, utilizara estos 39 ml de medio para la preparación de la solución madre de 5- FU y almacenara en refrigeración. Refrigerar el medio preparado y continuará inmediatamente con los siguientes puntos.

**Solución madre de 5- flurouracilo:**

En un erlenmeyer estéril de 50 ml adicione 0.4 g de 5 FU a 20 ml de medio base previamente preparado en el apartado.

Agregue 0.8 ml de NaOH 2 m y disuelva suavemente en baño de agua a 56 por aproximadamente 2 horas.

Ajuste el pH a 7.4 con HCl y llévelo a un volumen de 40 ml midiendo el volumen en una probeta estéril de 50 ml.

Filtre pasando la solución por un filtro de 0.22 µm.

Envase en una botella de vidrio estéril de 50 ml.

Rotular el envase con un marcador permanente con la siguiente información: nombre del producto, fecha de preparación, fecha de expiración.

Almacene esta solución a 4 por 1 mes.

**Preparación del medio de enriquecimiento:**

Reconstituya 10 frascos de medio de enriquecimiento para EMHJ con 10 ml de ABFA cada uno, use inmediatamente o refrigérelo a 2 a 8 por 2 semanas.

Rotule el envase con un marcador permanente indicando el nombre del producto, fecha de preparación, fecha de expiración.

## **Preparación del medio de cultivo:**

### **Medio de cultivo líquido con antibióticos:**

#### **A. Modificación V1:**

A.1 Tomar el medio base preparado del medio base y autoclavelo por 20 min. A 15 psi según procedimientos de operación del autoclave.

A.2 Colocar el erlenmeyer con el medio auto clavado en un baño de agua, que previamente haya alcanzado los 56 °C, hasta agregar los antibióticos al medio de enriquecimiento.

A.3 Tomar un erlenmeyer estéril de 250 ml, agregue 100 ml de medio de enriquecimiento, agregue 4 ml de RNS y 10 ml de la solución madre de 5-FU, agítelo suavemente hasta homogenizar.

A.4 Esterilizar por filtración usando un filtro de 0.22 µm.

A.5 Agregar asépticamente este medio de enriquecimiento modificado al medio base auto clavado y guardado a 56 °C.

#### **B. Modificación V2:**

B.1 Preparar el medio V2 siga los mismos paso descritos par la modificación V1, pero además de agregara al medio de enriquecimiento los 4 ml de RNS y los 10 ml de 5-FU, agregue 10 ml de la solución madre de rifampicina y 2 ml de la solución madre de anfotericina B, agítelo suavemente hasta homogenizar.

#### **Control de calidad:**

Incubar todos los tubos dispensados del o los medios de cultivo preparados. Seleccionar 4 tubos al azar y examínelos por microscopia de campo oscuro en busca de contaminación y evaluando la apariencia del medio. Si se observa el medio con crecimiento bacteriano o con

particulaciòn, descarte el medio y prepárelo de nuevo porque el medio de cultivo debe observarse limpio de partículas y bacterias. Anotara el resultado.

**Control de crecimiento:**

Tomar 2 grupos de 4 tubos por cada medio de cultivo preparado.

Incubar estos 8 tubos de cultivo con 4 gotas de un subcultivo de 5 días de las cepas icterohemorrágica y hardjo diluidos 1/10 en lept. Diluyente.

Incubar a 29 por 5 días y revisarlos por crecimiento satisfactorio por microscopia de campo oscuro y ausencia de contaminación.

Si el medio de cultivo se observa libre de contaminaciones se puede liberar el lote del medio de cultivo para su uso. Si el medio se observa contaminado y con crecimiento muy pobre o ausente de las cepas inoculadas, descártelo y prepare nuevo medio de cultivo.

**CUADRO 1. FRECUENCIA PARA EDADES DE LOS CANINOS MUESTREADOS**

edades	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Valido	Porcentaje acumulado
6	3	1.9	1.9	1.9
7	2	1.3	1.3	3.2
8	6	3.8	3.8	7.0
9	4	2.5	2.5	9.6
10	2	1.3	1.3	10.8
12	31	19.6	19.7	30.6
18	8	5.1	5.1	35.7
24	37	23.4	23.6	59.2
34	1	.6	.6	59.9
36	18	11.4	11.5	71.3
48	27	17.1	17.2	88.5
60	16	10.1	10.2	98.7
84	1	.6	.6	99.4
96	1	.6	.6	100.0
Total	157	99.4	100.0	
Missing System	1	.6		
Total	158	100.0		

**Cuadro 2. Frecuencia de sexo en el MAT**

		RMAT	Total
		1	
Sexo	Hembra	64	64
	Macho	96	96
Total		160	160

**Cuadro 3. Frecuencia de raza en el MAT**

		RMAT	Total
		1	
Raza	1	46	46
	2	15	15
	3	21	21
	4	14	14
	5	9	9
	6	10	10
	7	12	12
	8	15	15
	9	16	16
Total		158	158

**Cuadro 4. Frecuencia de barrios en el MAT**

		RMAT	Total
		1	
Barrio	1	19	19
	2	17	17
	3	7	7
	4	15	15

5	15	15
6	18	18
7	8	8
8	15	15
9	15	15
10	11	11
11	10	10
12	8	8
Total	158	158

**Cuadro 5. Frecuencia de edad en el cultivo de orina**

		Rx Orina		Total
		2	3	
Edad	6	3	0	3
	7	2	0	2
	8	6	0	6
	9	4	0	4
	10	2	0	2
	12	29	2	31
	18	8	0	8
	24	30	7	37
	34	0	1	1
	36	18	0	18
	48	24	3	27
	60	15	1	16
	84	1	0	1
	96	1	0	1
Total		143	14	157

**Cuadro 6. Frecuencia de sexo en el cultivo de orina**

		Rx Orina		Total
		2	3	
Sexo	Hembra	58	5	63
	Macho	85	9	94
	7	1	0	1
Total		144	14	158

**Cuadro 7. Frecuencia de razas en el cultivo de orina**

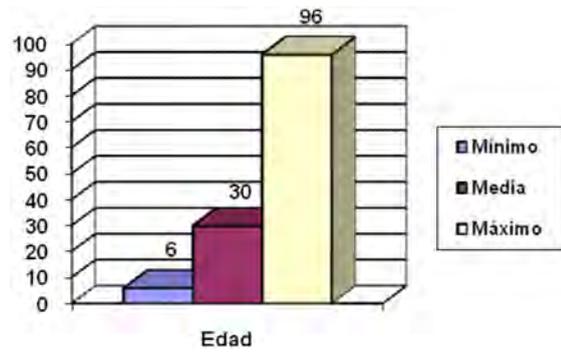
		Rx Orina		Total
		2	3	
Raza	1	36	10	46
	2	15	0	15
	3	21	0	21
	4	14	0	14

5	9	0	9
6	10	0	10
7	12	0	12
8	13	2	15
9	14	2	16
Total	144	14	158

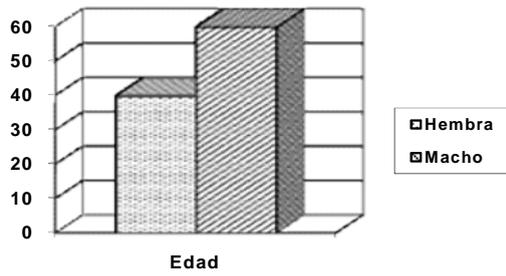
**Cuadro 8. Frecuencia de barrios en el cultivo de orina**

		Rx Orina		Total
		2	3	
Barrio	1	18	1	19
	2	17	0	17
	3	7	0	7
	4	15	0	15
	5	13	2	15
	6	15	3	18
	7	7	1	8
	8	15	0	15
	9	13	2	15
	10	10	1	11
	11	8	2	10
	12	6	2	8
Total		144	14	158

**Edades encontradas en los canes muestreados**



Promedio de edades caninas



Edad según sexo, de canes muestreados.



Aplicando el diuretico.



Extraccion de orina





Utilizando bolsas esteriles